

# ESTUDI DE L'ACTIVITAT ANTITUMORAL DE NOUS COMPOSTOS BASATS EN METALLS DE TRANSICIÓ

**MARTA GONZÁLEZ BÁRTULOS**

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/620757>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**TESI DOCTORAL**

**Estudi de l'activitat antitumoral de nous  
compostos basats en metalls de transició**

**Marta González Bártulos**

**2016**





**TESI DOCTORAL**

**Estudi de l'activitat antitumoral de nous  
compostos basats en metalls de transició**

**Marta González Bártulos**

**2016**

Programa de Doctorat de BIOLOGIA MOLECULAR, BIOMEDICINA I SALUT

Dirigida per

Dirigida per

**Dra. Anna Massaguer Vall-llovera**

**Dr. Xavi Ribas Salamaña**

Memòria presentada per optar al títol de Doctora per la Universitat de Girona

Aquesta tesi doctoral conté un annex





## Agraïments

Bé. Ara sí. Ja ha arribat el moment. Aquest és l'espai personal en el qual vull agrair a moltes de les persones que, potser si o potser no, han sigut conscients que m'han fet avançar al llarg d'aquest camí.

Primer de tot, gràcies a les cèl·lules. Sí, sé que no m'entenen, però per a mi són com personetes, ja ho saben els meus companys de "cuxius cel·lulars"... Al cap i a la fi, en algun moment de la seva "llarga vida" varen formar part d'una persona. Gràcies per sobreviure en el vostre manteniment i motivar-me cada dia per veure el vostre estat (tot i que alguna creixia com volia...), i ho sento per desitjar-vos la mort en cada tractament, era per una bona causa ☺.

A la Dra Anna Massaguer i als Drs Xavi Ribas i Miquel Costas per donar-me la oportunitat de realitzar el doctorat, pel vostre enorme interès mostrat en tots i cada un dels resultats i per deixar-me viure aquesta experiència. A la Marta Soler, a la Lidia Feliu i a la Marta Planas pels seus pèptids i per l'esforç en intentar potenciar els compostos. A l'Esther L, a la Sílvia, a la Rosa i a en Rafel, perquè sé que també he pogut comptar amb vosaltres.

Als meus companys de despatx. A la Glòria pels teus tupperes al despatx i per les malediccions a les cèl·lules, a en David Soler (M- $\alpha$ ) per les nostres frases, els nostres debats i el millor pastís de formatge que mai he tastat. A l'Imma tècnic per la seva ajuda quan ens feia falta (i el soroll del seu ordinador), a en Santiaguín i a la Txell (van en pack) perquè el meu camí al llarg d'aquesta "aventura" sempre el recordaré al seu costat i això m'encanta. Ah! I per la carrot cake d'en Santi i la pasta de xoco de la Txell. A l'Anna Vert pels seus "tupperes molones" i la seva tranquil·litat. A la Vero, pels seus cafès i les seves proteïnes. A la Mariona i al seu "cor". A la Clara, la Dolors i la Cristina, una altra generació però igualment importants. A la Montse pels nostres cafès i rialles i el seu tó de movil "la petita rambla del poble sec".

Als meus pupilos. A la Marina per tenir tanta força (una part ens la donen), i a la Maria, a la Núria, a en Pau, a la Sofie i a en Sam.

Als companys del despatx veí a cultius i als companys dels despatxos "de baix", en general, pels àpats de desconexió i sopars. A en Roger i als seus

cistells, a en Pau i la seva ampolla d'aigua-cervesa, a la Sandra i al suro; i a la Jess per la paciència, santa paciència. Gràcies per ajudar-me quan he tingut qualsevol dubte amb les "cel·luletes", gràcies, sempre estaves disposada. A la Sara, a l'Ariadna, a en Luis (Maño), a l'Elena, en David i a la Mireia F.

I ja fora de la Facultat, als meus amics de la Friendszone. A l'Agnès, a l'Aïda, a la Susana, a en Sisu, a en Pibe, a l'Ivan i al petit Joelet, a en Siset i a la Júlia. Gràcies per tot. Pels sopars, els dinars, els berenars, les castanyades, els panellets, les fires, els bolets, les trucades, les quedades, les abraçades. Als amics Valldarencs, a la Marina (tata), a en Joan, a la petita Julieta, a la Laura, a l'Alexis, a l'Albertito, a la Vero i a en Domènec. Gràcies també per tot. Pels dies de platja, de piscina, de minigolf, de cadaquès, de bodegues, pels nostres sopars, pels mojitos i piñas coladas, pels nostres arrossos i la "nostra llar". A tots, amics, heu sigut un immens recolzament per mi, m'heu donat molta força i sé que sempre que ho necessiti us tindrè al meu costat.

A la resta de personetes que m'ompliu l'estiu quan recarrego piles. A l'Esther i en Ramon, a la Isis i la Valèria, a la Núri i en Domingo i a la família Alonso.

Als més propers per una banda. A en Juan C i a la Mercedes, a en Carlos, a l'Albertito de nou, i a la Olaya i la petita Vera. Vam començar el camí amb aquesta aventura. Gràcies per l'amor que m'heu donat des del minut 1.

I als més propers per l'altra banda. Als meus tiets Josep Maria (sé que m'estàs llegint) i Agustí i a la tieta Fina i a la Quimeta. Als meus cosins Laura i Josep Maria, Santi, Eva i Diego. A les meves tietes Conce i Delia, als meus tiets Paco i Toni. Als meus cosins Isaac i Sergio (sé que també m'estàs llegint, sempre penso en tu, no t'oblido. Moltes vegades, no ho saps i m'has donat forces), Laura i Carlos. Als avis que ja no estan aquí, a l'Adelino i la Chon, a la Margarita i en Zacaries. Gràcies pel vostre amor incondicional des d'aquí o des d'allà.

I finalment als de casa. A la meva germana Susana, a en Francesc Xavier, a la petita Ainet, a en Rigo, a la meva parella Vicky (Victor) a la meva mare Manoli i al meu pare Jaume. Gràcies per fer que em llevi cada dia, pel vostre amor, pel vostre suport, per la vostra il·lusió, per confiar en mi quan jo no he pogut confiar en mi mateixa i per treure forces d'allà on no n'hi havia per a que la petita de la casa en aquell moment tirés endavant.

Sé que no ha estat fàcil. Papa, vas marxar just quan estava a punt de començar una etapa de la meva vida que “desitjava molt”, però la desitjava al teu costat. No vaig poder donar-te la bona notícia que viuria aquesta aventura. Sé que t’hauries alegrat moltíssim, que et sentiries orgullós de mi i de que tingués aquesta oportunitat. De fet, el meu interès per la ciència ve de tu. De les teves preguntes, dels estels, de l’univers, dels documentals, de tantes coses... Aquest camí ha estat agre-dolç, agre perquè no estaves aquí i perdia forces, i dolç perquè m’encantava el que estava fent i et recordava i les recuperava. Siguis on siguis sé que cada dia has estat al meu costat i que ara mateix estàs somrient. Gràcies per estimar-me tant i deixar-me ser una part de tu.

***Gràcies a tots els que heu passat pel meu costat i m’heu donat una petita empenta per acabar d’enllestir un petit gran desig de la meva vida.***

Aquesta tesi ha estat realitzada amb el suport del projecte d’investigació Consolidar ingenio (CSD/CSD2010-00065) del Ministeri d’Economia i Competitivitat (MINECO) i el Plan Nacional de I+D+I (SAF2012-38914) del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) de l’Estat espanyol.



## Publicacions derivades de la tesi

La recerca científica realitzada al llarg d'aquesta Tesi Doctoral ha derivat en 5 publicacions científiques. En la tesi es presenten els resultats recollits en la 1<sup>a</sup> publicació (els articles es troben adjunts a l'Annex 1).

**1.** Pro-oxidant activity of amine-pyridine-based iron complexes efficiently kills cancer and cancer stem-like cells. González-Bártulos M, Aceves-Luquero C, Qualai J, Cussó O, Martínez MA, Fernández de Matos S, Menéndez JA, Villalonga P, Costas M, Ribas X, Massaguer A. PLoSOne. 2015 Sep 14;10(9)

**2.** Delivering aminopyridine ligands into cancer cells through conjugation to the cell-penetrating peptide BP16. Soler M, González-Bártulos M, Figueras E, Massaguer A, Feliu L, Planas M, Ribas X, Costas M. OrgBiomolChem. 2016 Apr 26;14(17):4061-70

**3.** Design, Preparation, and Characterization of Zn and Cu Metallopeptides Based On Tetradentate Aminopyridine Ligands Showing Enhanced DNA Cleavage Activity. Soler M, Figueras E, Serrano-Plana J, González-Bártulos M, Massaguer A, Company A, Martínez MÁ, Malina J, Brabec V, Feliu L, Planas M, Ribas X, Costas M. InorgChem. 2015 Nov 16;54(22):10542

**4.** Identification of BP16 as a non-toxic cell-penetrating peptide with highly efficient drug delivery properties. Soler M, González-Bártulos M, Soriano-Castell D, Ribas X, Costas M, Tebar F, Massaguer A, Feliu L, Planas M. OrgBiomolChem. 2014 Mar 14;12(10):1652-63

**5.** Enzyme-triggered delivery of chlorambucil from conjugates based on the cell-penetrating peptide BP16. Soler M, González-Bártulos M, Figueras E, Ribas X, Costas M, Massaguer A, Planas M, Feliu L. OrgBiomolChem. 2015 Feb 7;13(5):1470-80



## Abreviatures

ABC	de l'anglès, ATP-binding cassette
ACS	american cancer society
AML	acute myeloid leukemia
ATCC	american type culture collection
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related
Calceïna-AM	calcein-aceto-methyl ester
CAT	catalase
CSC	cancer stem cells
CS-like cells	cancer stem-like cells
CPP	cell penetrating peptides
CPHP	cell penetrating homing peptides
CREB	cAMP response element-binding
DCYTB	duodenal cytochrome B
DFO	deferoxamine
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DMT-1	divalent metal transporter 1
DNA	deoxyribonucleic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor



EMT	epithelial-mesenchymal transition
ER	endoplasmic reticulum
FBS	fetal bovine serum
FeCl <sub>2</sub>	iron (II) chloride
Glut1	glucose transporter 1
GPx	glutathione peroxidase
GRed	glutathione reductase
GSSG	oxidized glutathione
GSH	reduced glutathione
H <sub>2</sub> DCF-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
HIF	hypoxia-inducible factor
HMLE	human mammary epithelial cells
HMLER	Ras-transformed HMLE cells
I	interaction index
IC <sub>50</sub>	inhibitory concentration 50
IFN- $\alpha$	interferon alpha
IL-2	interleukin 2
LCFAs	long-chain fatty acids
LH-RH	luteinizing hormone-releasing hormone
MEGM	mammary epithelial cell growth medium

MET	mesenchymal-epithelial transition
MMP	matrix metalloproteinases
MMR	DNA mismatch repair
mRNA	messenger RNA
MTD	maximum tolerated dose
MTT	3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenil-tetrazolium
NAC	N-acetyl-L-cysteine
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- $\kappa$ $\beta$ cells	nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated $\beta$
NOX	NAPPH oxidases
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor
p53	turnover supressor protein
PBS	phosphate-buffered saline
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptors
pH2AX	phosphorylated H2AX
PI	propidium iodide
PIK	Phosphatidylinositol kinase
RNasa	ribonuclease
RPMI	roswell park memorial institute medium

RTKs	receptor tyrosine kinases
ROS	reactive oxygen species
RR	ribonucleotide reductase
SERM	selective estrogen receptor modulator
SOD	superoxide dismutase
TBE	tris/borate/EDTA
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta 1
TFR1	transferrin receptor 1
TON	turnover number
TrxR	thioredoxin reductase
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	world health organization
WOK	water oxidation catalyst

## Índex de figures

Figura 1.1	4
Figura 1.2	5
Figura 1.3	6
Figura 1.4	7
Figura 1.5	16
Figura 1.6	17
Figura 1.7	18
Figura 1.8	19
Figura 1.9	21
Figura 1.10	25
Figura 1.11	26
Figura 1.12	27
Figura 1.13	29
Figura 1.14	31
Figura 1.15	32
Figura 1.16	33
Figura 1.17	33
Figura 1.18	34
Figura 1.19	34
Figura 1.20	36
Figura 1.21	37
Figura 1.22	39

<b>Figura 1.23</b> .....	<b>40</b>
<b>Figura 1.24</b> .....	<b>41</b>
<b>Figura 1.25</b> .....	<b>44</b>
<b>Figura 1.26</b> .....	<b>45</b>
<b>Figura 1.27</b> .....	<b>45</b>
<b>Figura 1.28</b> .....	<b>46</b>
<b>Figura 1.29</b> .....	<b>49</b>
<b>Figura 1.30</b> .....	<b>50</b>
<b>Figura 3.1</b> .....	<b>75</b>
<b>Figura 4.1</b> .....	<b>83</b>
<b>Figura 4.2</b> .....	<b>87</b>
<b>Figura 4.3</b> .....	<b>89</b>
<b>Figura 4.4</b> .....	<b>91</b>
<b>Figura 4.5</b> .....	<b>93</b>
<b>Figura 4.6</b> .....	<b>96</b>
<b>Figura 4.7</b> .....	<b>97</b>
<b>Figura 4.8</b> .....	<b>99</b>
<b>Figura 4.9</b> .....	<b>100</b>
<b>Figura 4.10</b> .....	<b>103</b>
<b>Figura 4.11</b> .....	<b>105</b>
<b>Figura 4.12</b> .....	<b>108</b>
<b>Figura 4.13</b> .....	<b>110</b>
<b>Figura 4.14</b> .....	<b>111</b>
<b>Figura 4.15</b> .....	<b>112</b>

<b>Figura 4.16</b> .....	<b>114</b>
<b>Figura 4.17</b> .....	<b>115</b>
<b>Figura 4.18</b> .....	<b>117</b>
<b>Figura 4.19</b> .....	<b>118</b>
<b>Figura 5.1</b> .....	<b>122</b>



## Índex de taules

<b>Taula 1.1.</b> .....	<b>43</b>
<b>Taula 1.2.</b> .....	<b>44</b>
<b>Taula 4.1.</b> .....	<b>84</b>
<b>Taula 4.2.</b> .....	<b>85</b>
<b>Taula 4.3.</b> .....	<b>109</b>
<b>Taula 4.4.</b> .....	<b>109</b>
<b>Taula 4.5.</b> .....	<b>115</b>
<b>Taula 4.6.</b> .....	<b>118</b>





## Índex de continguts

<b>Publicacions derivades de la tesi</b> .....	<b>i</b>
<b>Abreviatures</b> .....	<b>iii</b>
<b>Índex de figures</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índex de taules</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUM</b> .....	<b>xvii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xix</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xxi</b>
<b>1 INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
1.1 El càncer.....	3
1.2 Teràpies antineoplàsiques.....	8
1.2.1 Cirurgia oncològica.....	8
1.2.2 Radioteràpia oncològica.....	9
1.2.3 Quimioteràpia.....	9
1.2.3.1 Tipus de fàrmacs antineoplàsics.....	10
1.2.3.1.1 Teràpia convencional.....	10
1.2.3.1.2 Teràpia hormonal.....	12
1.2.3.1.3 Immunoteràpia.....	13
1.2.3.1.4 Teràpia dirigida.....	13
1.3 Estrès oxidatiu.....	15
1.3.1 Espècies reactives d'oxigen.....	16
1.3.2 Sistema antioxidant.....	19
1.3.3 Estrès oxidatiu i càncer.....	21
1.3.4 Teràpia Redox com a possible teràpia antitumoral.....	26
1.4 Metalls i càncer.....	29
1.4.1 Compostos metàl·lics en el tractament del càncer.....	29

1.4.1.1	Compostos de Platí.....	30
1.4.1.2	Compostos de Ruteni .....	31
1.4.3	El ferro .....	38
1.4.3.1	Tractament de la siderèmia elevada amb agents quelants .....	42
1.4	Cèl·lules mare tumorals .....	46
1.4.1	Transició Epiteli-Mesènquima .....	48
1.4.2	CSC de mama induïdes per EMT.....	51
<b>2</b>	<b>OBJECTIUS .....</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>57</b>
3.1	Compostos metàl·lics .....	59
3.2	Cultius cel·lulars.....	61
3.3	Assaig de citotoxicitat.....	62
3.4	Activitat hemolítica.....	63
3.5	Assaig clonogènic.....	64
3.6	Anàlisi de l'activitat caspasa .....	64
3.7	Anàlisi del cicle cel·lular .....	65
3.8	Detecció d'Espècies Reactives d'Oxigen per citometria .....	66
3.9	Detecció d'Espècies Reactives d'Oxigen per microscòpia confocal .....	67
3.10	Efecte de l'agent antioxidant N-Acetil-L-cisteïna en la producció d'Espècies Reactives d'Oxigen.....	68
3.11	Efecte de l'agent antioxidant NAC en la viabilitat cel·lular .....	69
3.12	Capacitat dels lligands per unir-se al ferro .....	69
3.13	Efecte del ferro en la citotoxicitat dels lligands .....	71
3.14	Efecte del ferro en l'activitat oxidativa dels lligands .....	71
3.15	Interacció amb el DNA plasmídic.....	72
3.16	Anàlisi del dany al DNA cel·lular .....	74
3.17	Internalització del lligand 1-CF per microscòpia confocal .....	75
3.18	Quantificació de la internalització del lligand 1-CF per citometria de flux.....	76

3.19	Anàlisi isobologràfic de la combinació de drogues .....	76
3.20	Anàlisi estadístic .....	77
<b>4</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>79</b>
4.1.	Anàlisi de la citotoxicitat dels compostos encèl·lules tumorals.....	81
4.1.1	Anàlisi de la citotoxicitat dels complexos de Fe(II), Mn(II), Cu(II) i Co(II) i els respectius lligands enfront cèl·lules tumorals humanes .....	81
4.1.2	Anàlisi de l'activitat citotòxica dels lligands 1, 2, 3, 4 i 5 enfront un panell de cèl·lules tumorals i cèl·lules sanes .....	85
4.1.3	Anàlisi de la citotoxicitat dels lligands enfront cèl·lules de leucèmia, limfoma i glioma .....	86
4.1.4	Anàlisi de la capacitat dels lligands per inhibir la clonogeneïtat de les cèl·lules tumorals .....	87
4.1.5	Estudi del mecanisme de mort cel·lular induïda pels compostos 1, 2 i 5 .....	89
4.1.6	Efecte dels lligands 1, 2 i 5 sobre el cicle cel·lular .....	92
4.1.7	Estudi de l'activitat oxidativa dels lligands 1, 2 i 5 .....	93
4.1.8	Estudi de l'efecte de l'agent antioxidant NAC en l'activitat oxidativa i citotòxica dels lligands en cèl·lules tumorals .....	97
4.1.9	Estudi de la capacitat dels lligands per unir-se al ferro làbil intracel·lular .....	99
4.1.10	Anàlisi de l'efecte del ferro en l'activitat citotòxica dels lligands.....	100
4.1.11	Anàlisi de l'efecte del ferro en l'activitat oxidativa dels lligands.....	104
4.1.12	Anàlisi de la interacció dels lligands amb el DNA plasmídic .....	105
4.1.13	Anàlisi del dany al DNA cel·lular .....	109
4.1.14	Internalització del lligand 1-CF .....	110
4.2	Anàlisi de la citotoxicitat dels compostos en cèl·lules mare tumorals..	113
4.2.1	Anàlisi de l'activitat citotòxica de l'agent doxorubicina i dels lligands en les línies cel·lulars HMLEShCntrl, HMLEShEcad, HMLERShCntrl i HMLERShEcad.....	113

4.2.2	Anàlisi isobogràfic de la combinació de doxorubicina i el lligand 1 .....	116
<b>5</b>	<b>DISCUSSIÓ</b> .....	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>141</b>
<b>8</b>	<b>ANNEX 1</b> .....	<b>163</b>

## Resum

En l'actualitat el càncer és una de les principals causes de mort en els països desenvolupats i per tant, hi ha un enorme interès en desenvolupar noves estratègies terapèutiques que millorin l'efectivitat dels actuals tractaments antitumorals. S'ha descrit que les alteracions metabòliques de les cèl·lules tumorals fan que estiguin sotmeses a un major estrès oxidatiu que les cèl·lules sanes i per tant són més vulnerables a agents pro-oxidants que puguin alterar el seu equilibri redox. Darrerament, aquesta diferència en l'estat redox s'està explorant com a diana pel desenvolupament de nous tractaments pel càncer.

En aquest context, ens vam proposar analitzar l'activitat antitumoral de diferents famílies de complexes amb metalls de transició amb base aminopiridina que actuen com a eficients i robusts catalitzadors d'oxidació de substrats orgànics. Els primers resultats van mostrar que, en contra de la hipòtesi de partida, només els complexes de manganès presenten una activitat citotòxica rellevant, la qual és similar a la dels corresponents lligands lliures de metall. Donada la seva activitat antitumoral enfront un ampli panell de diferents línies cel·lulars de càncer humà, es van seleccionar tres lligands (**1**, **2** i **5**) per caracteritzar el seu mecanisme d'acció. És important destacar que aquests lligands presenten la mateixa activitat citotòxica en cèl·lules epitelials mamàries induïdes a mesenquimals, models cel·lulars de cèl·lules mare canceroses, les quals solen presentar resistència a la majoria de tractaments antitumorals. Els resultats també van indicar que l'activitat citotòxica dels lligands és menor en cèl·lules no tumorals. Es va comprovar que els compostos **1**, **2** i **5** inhibeixen la capacitat de les cèl·lules tumorals de proliferar i generar colònies. En els estudis de mort cel·lular, es va determinar que aquests lligands indueixen l'apoptosi de les cèl·lules, la qual s'associa a l'activació de la caspasa 3/7. Mitjançant anàlisis dels nivells d'espècies d'oxigen reactives (ROS) intracel·lulars per citometria de flux es va demostrar que els lligands són potents inductors d'estrès oxidatiu, incrementant fins a 7 vegades els nivells de ROS intracel·lulars. Addicionalment, es va determinar que després de tractar les

cèl·lules amb els lligands, els nivells de ferro làbil intracel·lular disminueixen significativament. Per tant, la capacitat dels lligands de generar ROS a l'interior de la cèl·lula s'associa a la seva gran afinitat per unir-se al ferro intracel·lular i generar els complexos de coordinació de ferro redox actius a l'interior de les cèl·lules. Per contra, la formació de complexos de ferro a l'exterior de la cèl·lula inhibeix l'activitat dels lligands.

Aquests complexos presenten una elevada capacitat per induir talls en la doble cadena de DNA mitjançant mecanismes oxidatius, el que indica que aquest és una de les seves principals dianes biològiques. Aquesta activitat s'ha demostrat tant directament a nivell de DNA plasmídic com a nivell cel·lular. En resum, aquest estudi ha permès caracteritzar el mecanisme pel qual els lligands **1**, **2** i **5** presenten una activitat antitumoral contra un elevat nombre de tipus cel·lulars. Aquest mecanisme inclou la quelació del ferro intracel·lular i la posterior activitat pro-oxidant dels complexos de ferro generats intracel·lularment, els quals exerceixen una potent activitat citotòxica tant en cèl·lules tumorals com en cèl·lules mare tumorals. Per tant, els resultats descrits a la present tesi doctoral proporcionen evidències funcionals d'una nova família de metal·lodrogues amb una eficient activitat antitumoral dirigida a alterar l'estat redox de les cèl·lules tumorals i a generar la seva mort per mecanismes oxidatius.

## Resumen

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados y por tanto, hay un enorme interés en desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la efectividad de los actuales tratamientos antitumorales. Se ha descrito que las alteraciones metabólicas de las células tumorales hacen que éstas estén sometidas a un mayor estrés oxidativo que las células sanas y por tanto, son más vulnerables a agentes pro-oxidantes que puedan alterar su equilibrio redox. Últimamente, ésta diferencia en el estado redox se está investigando como diana para el desarrollo de nuevos tratamientos para el cáncer.

En este contexto, nos propusimos analizar la actividad antitumoral de diferentes familias de complejos con metales de transición con base aminopiridina que actúan como eficientes y robustos catalizadores de oxidación de sustratos orgánicos. Los primeros resultados mostraron que, contra la hipótesis de partida, sólo los complejos de manganeso presentan una actividad citotóxica relevante, la cual es similar a la de los correspondientes ligandos libres de metal. Dada su actividad antitumoral frente un amplio panel de diferentes líneas celulares de cáncer humano, se seleccionaron tres ligandos (**1**, **2** y **5**) para caracterizar su mecanismo de acción. Es importante destacar que estos ligandos presentan la misma actividad citotóxica en células epiteliales mamarias inducidas a mesenquimales, modelos celulares de células madre cancerosas, las cuales suelen presentar resistencia a la mayoría de tratamientos antitumorales. Los resultados también indicaron que la actividad citotóxica de los ligandos es menor en células no tumorales. Se comprobó que los compuestos **1**, **2** y **5** inhiben la capacidad de las células tumorales de proliferar y generar colonias. En los estudios de muerte celular, se determinó que estos ligandos inducen la apoptosis de las células, la cual se asocia con la activación de la caspasa 3/7. Mediante análisis de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares por citometría de flujo se demostró que los ligandos son potentes inductores de estrés oxidativo, incrementando hasta 7 veces los niveles de ROS intracelulares. Adicionalmente, se



determinó que después de tratar las células con los ligandos, los niveles de hierro lábil intracelular disminuyen significativamente. Por tanto, la capacidad de los ligandos de generar ROS en el interior de la célula se asocia a su gran capacidad por unirse al hierro intracelular y generar los complejos de coordinación de hierro redox activos en el interior de las células. Por el contrario, la formación de complejos de hierro en el exterior de la célula inhibe la actividad de los ligandos.

Estos complejos presentan una elevada capacidad para inducir cortes en la doble cadena del DNA mediante mecanismos oxidativos, lo que indica que éste es una de sus principales dianas biológicas. Esta actividad se ha demostrado tanto directamente a nivel de DNA plasmídico como a nivel celular. En resumen, este estudio ha permitido caracterizar el mecanismo por el cual los ligandos **1**, **2** y **5** presentan una actividad antitumoral contra un elevado número de tipos celulares. Este mecanismo incluye la quelación del hierro intracelular y la posterior actividad pro-oxidante de los complejos de hierro generados intracelularmente, los cuales ejercen una potente actividad citotóxica tanto en células tumorales como en células madre tumorales. Por tanto, los resultados descritos en la presente tesis doctoral proporcionan evidencias funcionales de una nueva familia de metalodrogas con una eficiente actividad antitumoral dirigida a alterar el estado redox de las células tumorales y a generar su muerte celular por mecanismos oxidativos.

## Summary

Nowadays, cancer is one of the leading causes of death in developed countries. Therefore, there is great interest of developing new therapeutic strategies to improve the efficiency of current cancer treatments. The vulnerability of cancer cells to oxidative stress may be a therapeutic target for new anti-cancer agents design. Differential redox homeostasis in normal and malignant cells suggests that promoting upregulation of cellular reactive oxygen species (ROS) by pro-oxidant treatment could selectively target cancer cells without compromising the viability of healthy cells.

In this context, we decided to analyze the anti-tumor activity of different families of metal complexes based on aminopyridine ligands that act as efficient and robust oxidation catalysts of organic substrates as potential anti-cancer agents. Contrary to our hypothesis, the first results showed that only manganese complexes exhibited significant cytotoxic activity, similar to their corresponding free metal complexes. Based on their cytotoxicity against a broad panel of diverse human cancer cell lines, three ligands were selected (**1**, **2** and **5**) to be further characterized. Importantly, the cytotoxic activity profile of these ligands remained unaltered in induced mammary epithelial to mesenchymal transition cells, which are cancer stem cell models that have acquired resistance to most anti-cancer drugs.

The selected compounds (**1**, **2** and **5**) inhibited tumor cells proliferation and their ability to generate colonies. Cell death studies determined that these ligands induced cell apoptosis, which is associated with the activation of caspase 3/7. Flow cytometry analyses indicated that the ligands were strong inducers of oxidative stress, leading to a 7-fold increase in intracellular ROS levels. Additionally, cell labile iron levels were significantly decreased after the treatment with the ligands. Therefore, ROS induction was associated with the ligands ability to bind intracellular iron and generate active iron coordination complexes inside the cells. In contrast, iron extracellular complexation inhibited the activity of the ligands.

The complexes generated in the cells showed a high capacity to induce DNA double-strand breaks through oxidative mechanisms, suggesting oxidative-dependent mechanisms as its major biological targets. This activity has been demonstrated at both molecular (DNA plasmid) and cellular levels. In summary, the present work has characterized the mechanism by which the ligands **1**, **2** and **5** exhibit anti-tumor activity against a large number of cell lines. This mechanism includes intracellular iron chelation and subsequent pro-oxidant activity by intracellular generated iron complexes. These complexes display a potent cytotoxic activity both in tumor cells and tumor stem cell-like. Therefore, altogether the results shown throughout this PhD Thesis provide functional evidences of a new family of metallodrugs with efficient anti-tumor activity aimed to disrupt tumor cell redox balance triggering cell death by oxidative-dependent mechanisms.

---

**1**

**Introducció**

---



## **1.1 El càncer**

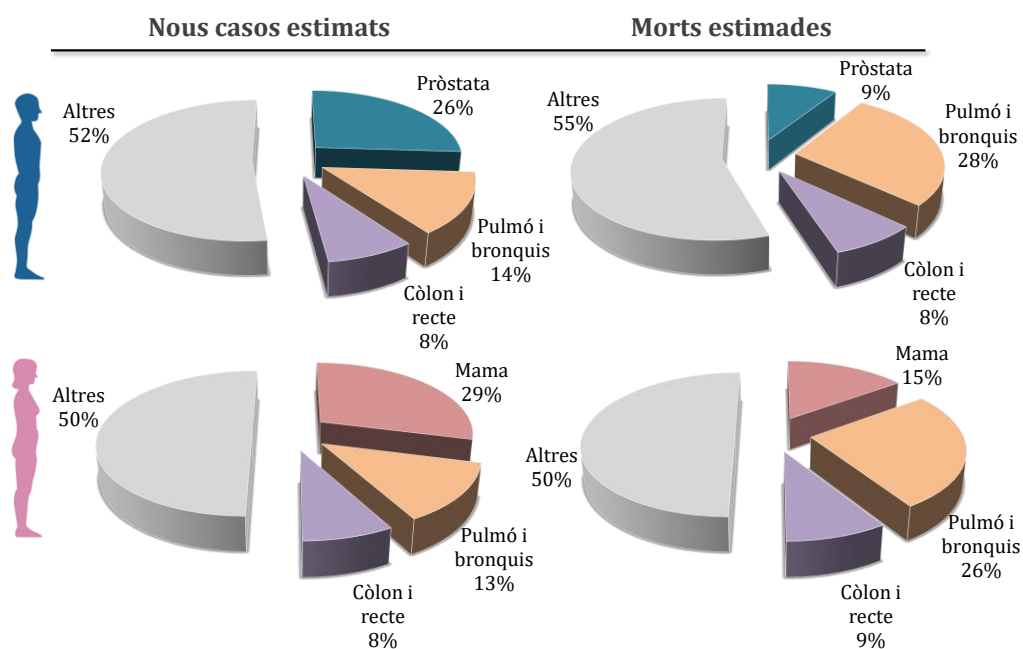
Actualment el càncer és una de les principals causes de mort dels països desenvolupats. Aquesta malaltia està principalment associada a l'envelliment de la població i a l'estil de vida. Al 2012 segons l'Organització Mundial de la Salut (WHO, World Health Organization), el càncer va ser la causa de la mort de 8.2 milions de persones a tot el món.

### **1.1.1. Epidemiologia del càncer**

Als Estats Units, una de cada quatre morts són causades pel càncer (R. Siegel et al. 2014). Això es deu a l'elevada taxa de mortalitat i a l'elevada incidència d'aquesta malaltia en la població. Estudis de la societat americana contra el càncer (American Cancer Society, ACS) estimen que, en homes, els càncers més prevalents són els de pròstata, de pulmó i bronquis, còlon i recte. En dones, en canvi, la incidència és més elevada en càncer de mama, pulmó i bronquis, còlon i recte. Comparant les morts estimades amb la incidència de la malaltia, en dones, tot i haver una gran incidència de càncer de mama, hi ha una baixa mortalitat. Això és degut al ràpid diagnòstic i al bon efecte dels tractaments en càncer de mama. Per contra, tot i que la incidència de càncer de pàncrees és baixa, és la quarta causa de mort dins dels càncers als Estats Units degut a l'agressivitat d'aquest i a que els símptomes d'aquesta malaltia no són específics, i freqüentment, es detecta a zones distants quan ja s'ha produït la metàstasi (figura 1.1) (R. L. Siegel, Miller, and Jemal 2015).

A Catalunya, la situació epidemiològica de les incidències és similar a la de països europeus i a les esmentades anteriorment. Les dades d'incidències registrades des de l'any 2003 fins l'any 2007 indiquen que, en homes, el càncer més freqüent és el de pròstata (21.5 %), seguit del càncer de pulmó (15.1 %) i el colorectal (15 %) amb una incidència similar. En dones, en canvi, el càncer més freqüent és el de mama (28.6 %), seguit del càncer de còlon i recte (15.3 %). Durant aquest període,

anualment s'ha produït una mitja de 20042 nous casos de càncer en homes, amb una mitja de 9842 defuncions anuals, i 13673 nous casos de càncer en dones, amb una mitja de 5882 defuncions per any. S'estima que a Catalunya, un de cada dos homes, i una de cada tres dones patiran càncer al llarg de la seva vida (Clèries et al. 2014). Per altra banda, segons un estudi de l'Institut d'Estadística de Catalunya, les dades registrades indiquen que la incidència de càncer el 2020, en comparació al 2010, es veurà incrementada un 22.5 % en homes i un 24.5 % en dones (Ribes et al. 2014).



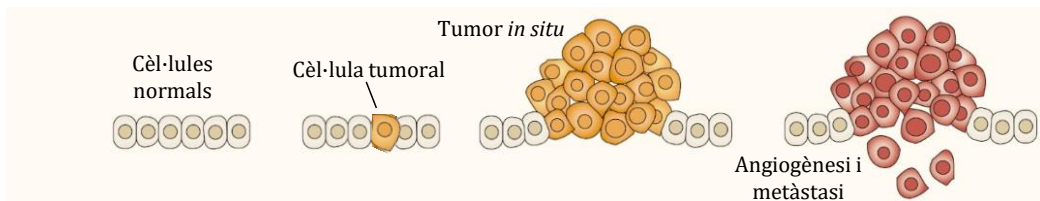
**Figura 1.1. Nous casos de càncer estimats i morts estimades per l'any 2015.**  
Informació extreta de R. L. Siegel, Miller, and Jemal 2015.

### 1.1.2. Què és el càncer?

El **càncer** és un terme que inclou un conjunt de més de 100 tipus de malalties, les quals són monoclonals, és a dir, s'originen a partir d'una única cèl·lula que ha patit mutacions, i que adquireix la capacitat de dividir-se descontroladament, generant

una massa de cèl·lules o **tumor**. Aquest tumor pot ser cancerígen o benigne. Un tumor cancerigen és el que pot créixer i, a partir dels vasos limfàtics o sanguinis, envair altres òrgans o teixits, donant lloc a la metàstasi i a l'aparició de tumors secundaris (figura 1.2). Un tumor benigne, en canvi, no genera metàstasi (American Cancer Society, 2014).

Els tumors es classifiquen en funció del seu origen en carcinomes, sarcomes, leucèmies, limfomes o mielomes. Els carcinomes s'originen en cèl·lules epitelials, les quals revesteixen la totalitat de la superfície del nostre organisme i que constitueixen el revestiment de les cavitats, la pell, les mucoses i els òrgans i les glàndules del nostre cos. Els sarcomes, en canvi, s'originen al teixit conjuntiu o connectiu, com músculs, cartílags, ossos o teixit adipós. Les leucèmies s'originen a la medul·la òssia, els limfomes al sistema limfàtic, i finalment, els mielomes s'originen en cèl·lules plasmàtiques.

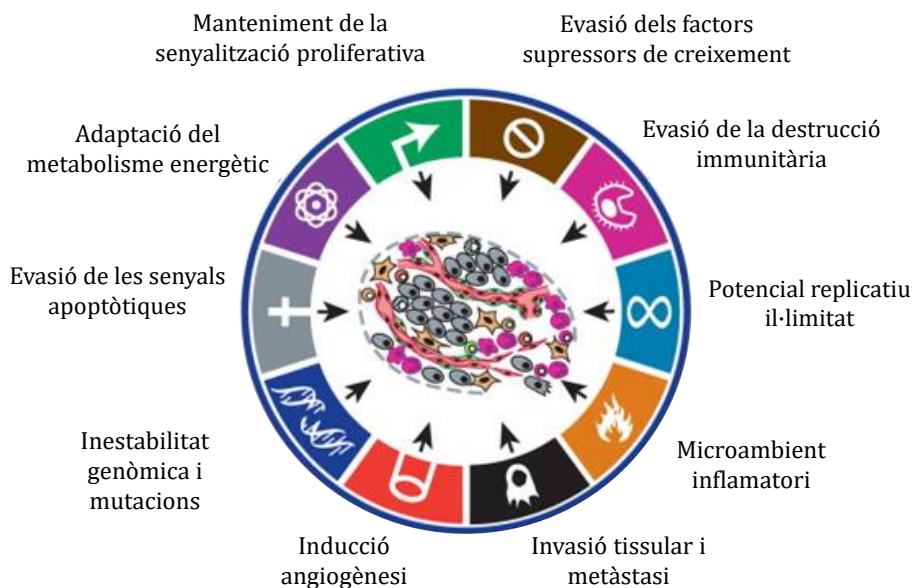


**Figura 1.2. Formació d'un tumor.** Una cèl·lula normal pateix canvi fenotip causat per una sèrie de mutacions esdevenint tumoral, la qual es divideix més ràpid que les cèl·lules sanes, formant un tumor *in situ*. Aquestes cèl·lules tenen la capacitat de formar nous vasos sanguinis i envair nous teixits, generant metàstasi. Adaptat de Fearon and Vogelstein 2016.

Per a que una cèl·lula esdevingui tumoral, cal que aquesta presenti unes mutacions que li confereixin unes característiques fonamentals o **hallmarks** (figura 1.3). Les cèl·lules tumorals han de ser capaces de produir els seus propis factors de creixement, o estimular la matriu extracel·lular o altres cèl·lules per a que els produeixi. A més, solen sobreexpressar receptors per a aquests factors de creixement, de manera que proliferen de forma continuada, essent insensibles als senyals supressors de la proliferació. També tenen la capacitat d'evadir l'apoptosi



(mort cel·lular programada), presenten un potencial replicatiu il·limitat, i són capaces de promoure l'angiogènesi, formant nous vasos sanguinis. Per a generar metàstasis, aquestes adquireixen l'habilitat de fer la transició de cèl·lula epitelial a cèl·lula mesenquimal (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT), el que facilita la seva extravasació i invasió de nous teixits. Finalment, les cèl·lules tumorals es caracteritzen per la seva inestabilitat genòmica i per la capacitat d'evadir la destrucció immunitària. S'ha vist també, que el microambient inflamatori generat pel tumor promou el creixement d'aquest. A més, és important que la cèl·lula tumoral adapti el seu metabolisme per poder disposar de l'energia i la capacitat biosintètica necessària per créixer de manera descontrolada i proliferar (Hanahan and Weinberg 2011).



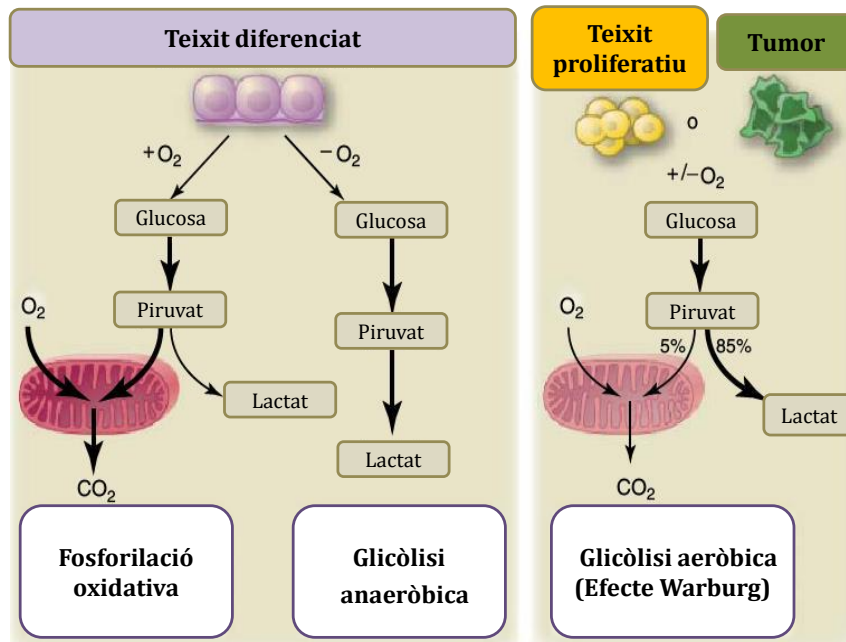
---

**Figura 1.3. Característiques necessàries per a que una cèl·lula esdevingui tumoral (Hanahan and Weinberg 2011).**

---

Així doncs, el metabolisme d'una cèl·lula tumoral difereix del d'una cèl·lula no tumoral.

Les **cèl·lules tumorals**, tal com va observar Otto Warburg, són capaces de reprogramar el seu metabolisme en presència d'oxigen, utilitzant en gran part la glicòlisi i la fermentació làctica (glicòlisi aeròbica o efecte Warburg), i incrementar la velocitat del transport de la glucosa, essent un mecanisme compensatori de generació d'energia a la ineficient fosforilació oxidativa que es dona en aquestes cèl·lules (figura 1.4). Així doncs, les cèl·lules tumorals tenen la capacitat de metabolitzar glucosa a grans velocitats (Koppenol, Bounds, and Dang 2011; Mathupala, Rempel, and Pedersen 2001; Rengifo, Castañeda, and Guerinoni 2007) (Figura 1.4).



**Figura 1.4. Fosforilació oxidativa, glicòlisi anaeròbica i glicòlisi aeròbica (Efecte Warburg)** (Vander Heiden, Cantley, and Thompson 2009).

Aquesta **reprogramació del metabolisme** en les cèl·lules tumorals està associada amb l'activació d'oncogens com RAS o MYC, i la mutació de gens supressors de tumors com p53 (tumor protein 53), modificacions que beneficien la proliferació cel·lular, l'evasió del control citostàtic i l'apoptosi (DeBerardinis et al. 2008; Jones and Thompson 2009). L'oncogen RAS, inicialment, estava relacionat amb un

increment del transport de la glucosa cel·lular. S'ha vist, que la mutació d'aquest facilita l'import de la glucosa a la cèl·lula mitjançant el transportador de la glucosa (GLUT1) (Yun et al. 2009). Per altra banda, l'oncogen MYC promou la glicòlisi mitjançant l'activació de gens implicats en aquesta i de transportadors de la glucosa (Osthus et al. 2000). Estudis *in vivo* han demostrat que quan aquest gen està sobreexpressat, s'estimula la glicòlisi aeròbica (Ahuia et al. 2009). Pel que fa al gen supressor de tumors p53, aquest estimula la respiració mitocondrial i suprimeix la glicòlisi. La mutació d'aquest gen, per tant, desencadena la inducció de la glicòlisi aeròbica (Vousden and Ryan 2009).

El metabolisme alterat resultant de les cèl·lules tumorals genera un increment de la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), comparat amb cèl·lules sanes, tal com s'explica més endavant.

## **1.2 Teràpies antineoplàsiques**

La principal finalitat de les teràpies antineoplàsiques és l'eliminació de les cèl·lules tumorals presents a l'organisme. Aquestes teràpies es divideixen en tres grups: la cirurgia oncològica, la radioteràpia oncològica i la quimioteràpia. La cirurgia i la radioteràpia oncològica són tractaments locals que no poden eradicar les metàstasis. La quimioteràpia, en canvi, és un tractament sistèmic. En funció del tipus i la localització del tumor, de l'estat de la malaltia i de la salut del pacient, s'empra un o altre tractament i s'aplica sol o amb combinació amb altres tractaments.

### **1.2.1 Cirurgia oncològica**

La cirurgia és l'extirpació del tumor i del teixit circumdant. És el tipus de teràpia contra el càncer més antiga i actualment, a més de ser la base del tractament antineoplàsic, s'utilitza per diagnosticar, obtenir informació sobre l'estadiatge del

tumor, mantenir la funció del teixit o de l'òrgan afectat o millorar la qualitat de vida dels pacients. Aquesta opció terapèutica és més efectiva en tumors primaris localitzats i ganglis limfàtics regionals (Urruticoechea et al. 2010).

### 1.2.2 Radioteràpia oncològica

La radioteràpia és el tractament que s'utilitza per eliminar les cèl·lules tumorals de l'organisme mitjançant l'aplicació de radiacions ionitzants sobre la zona afectada, el que malmet el material genètic de les cèl·lules i impedeix la seva proliferació, buscant el mínim efecte sobre el teixit sa circumdant, de manera que es conserva la fisiologia i funció de l'òrgan o teixit afectat. Aproximadament el 45 % de nous casos de càncer es tracten amb radioteràpia, bé com a teràpia única o bé com a coadjuvant a la quimioteràpia o la cirurgia. Quan s'utilitza com a **radioteràpia adjuvant**, aquest tractament s'administra després del tractament principal (cirurgia o quimioteràpia) per tal d'eliminar les cèl·lules tumorals restants i així evitar la recaiguda de la malaltia. Quan no és possible eliminar la malaltia, la radioteràpia també es pot utilitzar per reduir la massa tumoral, i en conseqüència, la pressió que aquesta exerceix, disminuint així el dolor i altres símptomes (**radioteràpia pal·liativa**) (Urruticoechea et al. 2010; Hoegler 1997).

### 1.2.3 Quimioteràpia

La quimioteràpia és el tractament sistèmic del càncer que, fins al moment, ha estat dominat per l'ús d'agents citotòxics. La majoria dels fàrmacs emprats són agents que malmeten el DNA amb la finalitat de provocar la mort cel·lular o inhibir la ràpida proliferació de les cèl·lules tumorals. L'administració d'aquests fàrmacs es dona en dosis màximes tolerades (MTD, Maximum Tolerated Dose) amb períodes de descans entre cicles de teràpia per permetre la recuperació de les cèl·lules normals de l'hoste. La inestabilitat genètica i l'elevada taxa de mutació de les cèl·lules tumorals, però, impliquen la selecció de clons resistents al tractament, el

que pot derivar en el creixement de tumors metastàsics que no responen al tractament, el que comporta un desavantatge per aquesta teràpia juntament amb els efectes secundaris en teixits sans. (Urruticoechea et al. 2010).

Aquesta teràpia s'administra en combinació amb la radioteràpia o la cirurgia, o sola. La combinació d'aquestes teràpies permet administrar concentracions de fàrmacs inferiors al pacient obtenint millors resultats, millorar el control local del tumor, eradicar la micrometàstasi i evitar o disminuir l'aparició de poblacions de cèl·lules resistents a la teràpia. Quan s'administra la quimioteràpia abans de la radioteràpia o la cirurgia s'anomena **quimioteràpia neoadjuvant**; quan s'administra la quimioteràpia després de la cirurgia s'anomena **quimioteràpia adjuvant**; per últim, quan la radioteràpia s'administra durant la quimioteràpia s'anomena **quimioteràpia concomitant**. Quan no és possible eliminar el tumor, s'administra la **quimioteràpia pal·liativa** per controlar i alleujar els símptomes (Urruticoechea et al. 2010).

### **1.2.3.1 Tipus de fàrmacs antineoplàsics**

Els fàrmacs que s'administren als pacients com a tractaments antineoplàsics es poden classificar dins de les següents teràpies: teràpia convencional (inclou antimetabòlits, agents alquilants, antibiòtics antitumorals, alcaloides i derivats de platí), teràpia hormonal, immunoteràpia i teràpia dirigida.

#### **1.2.3.1.1 Teràpia convencional**

La teràpia convencional s'utilitza des dels anys 40, en concret des de l'any 1942, quan es va descobrir en un pacient amb leucèmia no Hodgkin que les mostasses nitrogenades eren un efectiu tractament del càncer. Poc després, al 1948, es va descobrir en infants amb leucèmia limfocítica que el metotrexà presentava activitat antitumoral. Des d'aleshores, investigadors de múltiples disciplines

cerquen fàrmacs contra el càncer més efectius i amb menors efectes secundaris (Chabner and Roberts 2005; Siddik 2002).

Gran part dels fàrmacs actuals actuen interferint en el procés de divisió cel·lular, el funcionament normal de la cèl·lula, la síntesi del DNA, la migració dels cromosomes durant la mitosi, o bloquejant o modificant el metabolisme de les proteïnes. Es poden classificar en els següents grups:

- ✓ **Antimetabòlits:** Aquests fàrmacs són específics del cicle cel·lular, actuen durant la fase S (síntesi DNA). Són anàlegs de metabòlits cel·lulars necessaris per a la biosíntesi de les purines i les pirimidines, el que resulta en la inhibició de la síntesi del DNA i per tant la divisió cel·lular. Alguns exemples són la 6-mercaptopurina, anàleg de les purines guanina i adenina; el metotrexà, anàleg de l'àcid fòlic, el qual inhibeix l'enzim dihidrofolat reductasa, implicat en la síntesi de purines i pirimidines; i el 5-fluororacil, anàleg de l'uracil, el qual inhibeix la timidilat sintasa, implicat en la síntesi de la pirimidina timina (Chabner and Roberts 2005; Parker 2000; Tiwari 2012).
  
- ✓ **Agents alquilants:** Els agents alquilants actuen sobre tot el procés del cicle cel·lular, essent més efectius durant la fase G<sub>1</sub> i S. Aquests agents formen enllaços covalents entre els seus grups alquil i molècules nucleofliques de la cèl·lula, tals com el DNA, desencadenant la seva acció citotòxica a causa d'interferències en la transcripció i la replicació del DNA. En són un exemple el clorambucil i les ciclofosfamides, derivats de les mostasses nitrogenades; o la dacarbazina, derivat de trizines (Chabner and Roberts 2005; Kondo et al. 2010).
  
- ✓ **Antibiòtics antitumorals:** Els antibiòtics antitumorals són substàncies procedents de microorganismes, les quals tenen activitat antimicrobiana i citotòxica. Aquests produeixen lesions en la membrana cel·lular i s'intercalen amb el DNA formant complexos estables, el que inhibeix la síntesi del DNA i el

RNA. En són un exemple la doxorubina, la actinomicina-D o la bleomicina (da Rocha, Loper, and Schwatsmann 2001; Demain and Sanchez 2009).

- ✓ **Alcaloides:** Els alcaloides són substàncies vegetals provinents de diferents plantes que actuen impedit l'ensamblatge dels microtúbuls, bloquejant així la mitosi en la metafase (alcaloides de la vinca: vinblatina, vincristina); inhibint la despolarització dels microtúbuls (taxans com el paclitaxel o el docetaxel); o inhibint la unió al complex DNA topoisomerasa 1 (irinotecan, topotecan) (Chabner and Roberts 2005; Nirmala, Samundeeswari, and Sankar 2011).
- ✓ **Derivats del platí:** Els derivats del platí com el cisplatí, el carboplatí o l'oxaloplatí són àmpliament utilitzats actualment com agents antitumorals. Aquestes drogues a vegades s'agrupen com agents alquilants ja que el seu mecanisme d'acció és similar.

### **1.2.3.1.2 Teràpia hormonal**

Les hormones tenen un paper essencial en el creixement i desenvolupament de determinats òrgans i teixits del nostre cos, com són les mames, l'úter, els ovaris o la pròstata. El tractament hormonal s'utilitza en **tumors que són hormonodepenents**, és a dir, necessiten hormones per a créixer. Aquesta teràpia, en funció de la seva acció biològica, es classifica en teràpia additiva, competitiva o inhibidora. La teràpia additiva es basa en l'administració d'anàlegs d'estrògens, progesterona, corticoides o andrògens, inhibint o modificant l'activitat del receptor. La teràpia competitiva, en canvi, es basa en l'administració d'antiestrògens, antiandrògens o moduladors selectius de receptor d'estrògens (SERM, Selective estrogen receptor modulator). Aquests s'uneixen als receptors, interferint en la seva activitat. És un exemple de SERM el Tamoxifè. Per últim, la teràpia inhibidora es basa en l'administració d'anàlegs de la hormona alliberadora de la hormona luteïnitzant (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone, LH-RH) o

inhibidors de l'aromatasa, els quals bloquegen la producció d'estrògens. És un exemple el Dietilestilbestrol (Singer et al. 2008; Mcleod 2003).

### 1.2.3.1.3 Immunoteràpia

La immunoteràpia consisteix en l'**estimulació del sistema immunitari del pacient**, el qual reconeix una àmplia varietat de proteïnes que expressen els tumors, i en conseqüència, destrueix les cèl·lules tumorals. Els principals agents utilitzats en aquesta teràpia són substàncies presents a l'organisme, com anticossos monoclonals o citoquines (Raez, Fein, and Podack 2005; Mellman, Coukos, and Dranoff 2011). Són un exemple d'anticossos monoclonals el trastuzumab i el cetuximab. Aquests agents s'uneixen a proteïnes de la família de receptors del factor de creixement epidèrmic (epidermal growth factor, EGFR), les quals tenen un paper important en la transmissió de les senyals de creixement en una àmplia varietat de tumors epitelials (Ciardiello and Tortora 2008; Valabrega, Montemurro, and Aglietta 2007). Per altra banda, són exemple de citoquines la citoquina IL-2 i l'interferó alfa (IFN- $\alpha$ ). Aquests són proteïnes que estimulen la immunitat antitumoral de l'hoste, els quals s'empren en el tractament de melanoma avançat i el carcinoma de cèl·lules renals, tumors que resurdeixen després del tractament quimioterapèutic (Dutcher et al. 2014; Brassard, Grace, and Bordens 2002; Bachmann and Oxenius 2007).

### 1.2.3.1.4 Teràpia dirigida

La teràpia dirigida es basa en l'ús de fàrmacs que han estat dissenyats amb la finalitat d'**atacar de forma selectiva les cèl·lules tumorals**, i en conseqüència, generar menys efectes secundaris en l'organisme i incrementar l'acumulació del fàrmac a l'interior de les cèl·lules, millorant la seva activitat terapèutica.

L'efecte d'aquesta teràpia és possible gràcies l'evolució en el coneixement de la biologia tumoral. Aquests agents interfereixen en gens o proteïnes específiques



que es troben més expressades en les cèl·lules tumorals que en les cèl·lules normals o sobre les condicions del teixit que participen en el desenvolupament, creixement i disseminació del tumor, interrompent el procés. Les molècules afectades en aquests tractaments poden ser receptors de membrana, enzims tirosin quinasa, molècules involucrades en l'angiogènesi, moduladors de l'apoptosi, entre altres.

És un exemple l'Imatinib, inhibidor de la tirosin quinasa BCR-ABL (Breakpoint-clúster-region-Abelson-Leukemia), present en leucèmies mieloides cròniques amb cromosoma Philadelphia positiu; i del receptor tirosin quinasa del factor de creixement derivat de plaquetes PDGFR (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR) (Semenza 2003).

Un altre exemple de teràpia dirigida seria la conjugació dels agents antitumorals a pèptids de penetració cel·lular (Cell Penetrating Peptides, CPP). Els CPP són seqüències catióniques generalment curtes (menys de 20 aminoàcids) que deriven de pèptids llargs o proteïnes presents a la natura (pèptid Tat), o dissenyades, les quals són capaces de transportar a l'interior de la cèl·lula una gran varietat de molècules com fàrmacs, pèptids, proteïnes o àcids nucleics. Aquests pèptids s'uneixen a les càrregues negatives de la membrana plasmàtica i, seguidament, internalitzen per endocitosi o translocació directa (Snyder and Dowdy 2004). Degut a la seva capacitat per travessar biomembranes sense alterar-la, els CPP incrementen la biodisponibilitat dels fàrmacs, disminuït la dosi necessària i millorant la seva activitat (Fonseca, Pereira, and Kelley 2009; Soler et al. 2014). Degut a la inespecificitat d'aquests pèptids per a les cèl·lules tumorals, es generen els CPHP, CPP conjugats a pèptids localitzadors (homing peptides, HP) que s'uneixen selectivament a receptors sobreexpressats en cèl·lules tumorals o teixits d'interès (per exemple units a la seqüència CREKA) (Svensen, Walton, and Bradley 2012). Així doncs, els CPHP conjugats a fàrmacs, els dirigeixen específicament a la cèl·lula, teixit o òrgan d'interès, incrementant la seva biodisponibilitat i

disminuint, en conseqüència, la dosi necessària i els possibles efectes secundaris sobre l'organisme que pot tenir aquest.

### 1.3 Estrès oxidatiu

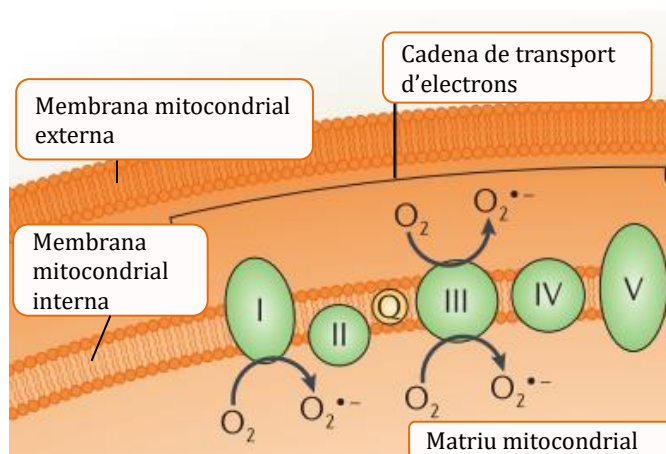
L'estrès oxidatiu és una condició cel·lular associada al desequilibri entre la producció d'espècies reactives d'oxigen (reactive oxygen species, ROS) i la seva eliminació a través de mecanismes de protecció cel·lulars com els antioxidants. L'increment dels nivells de ROS a l'interior de la cèl·lula provoca danys en àcids nucleics, proteïnes, carbohidrats o lípids, el que desencadena lesions en el DNA o el RNA, pèrdua de les funcions d'enzims, increment de la permeabilitat cel·lular, alteració de la senyalització cel·lular i mort cel·lular per necrosi o apoptosi (Valko et al. 2006; Waris and Ahsan 2006).

Se sap, però, que les ROS, a nivells baixos, estan involucrades en processos fisiològics (Trachootham, Alexandre, and Huang 2009). Aquestes espècies, a l'interior de la cèl·lula, poden reaccionar i modificar l'estructura de proteïnes, factors de transcripció o gens que regulen vies de transducció del senyal (creixement i diferenciació); i estan implicades en la regulació de l'activitat enzimàtica (per exemple, la ribonucleòtid reductasa), en la mediació de la inflamació a través de l'estimulació de la producció de citoquines i en l'eliminació de patògens. Aquestes espècies, en l'organisme, poden induir mecanismes de defensa. Les plaquetes, per exemple, alliberen ROS per reclutar més plaquetes a la zona lesionada i poder generar el trombe (Krötz, Sohn, and Pohl 2004). Per altra banda, les ROS estan involucrades en processos de desenvolupament, ja que s'ha vist que són necessaris certs nivells d'aquestes espècies per al correcte desenvolupament i la correcte funció dels gàmetes masculins (espermatozoides) (D'Autréaux and Toledano 2007).

### 1.3.1 Espècies reactives d'oxigen

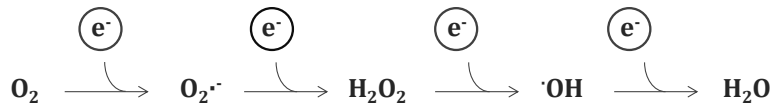
Les ROS es coneixen com a **espècies derivades de l'oxigen altament reactives**. Existeixen dos tipus de ROS: els radicals lliures i els no radicals. Els radicals lliures presenten, en la seva estructura atòmica, un o més electrons desaparellats o imparells a l'orbital extern, el que els aporta una configuració que genera elevada inestabilitat, i en conseqüència, elevada reactivitat. En formen part l'anió superòxid, el radical hidroxil i l'òxid nítric. Les espècies no radicals, en canvi, no presenten electrons desaparellats, però són químicament reactives i es poden convertir en espècies radicals. En són un exemple el peròxid d'hidrogen i el peroxinitrat (Trachootham, Alexandre, and Huang 2009).

Majoritàriament, les ROS es generen com a subproductes del metabolisme aeròbic de la cèl·lula, en concret, al complex I i III de la cadena de transport d'electrons a mitocondris (figura 1.5) (Holmström and Finkel 2014).



**Figura 1.5. Generació d'espècies reactives d'oxigen a la cadena de transport d'electrons del mitocondri.** El complex I i el complex III de la cadena de transport d'electrons és on hi ha la major part de la producció oxidant, amb la generació d'anió superòxid a la matriu mitocondrial i a l'espai de la membrana mitocondrial interna. Adaptat de Holmström and Finkel 2014.

Les ROS es generen degut a la reducció incompleta d'oxigen a aigua (figura 1.6). El principal ROS inicial és l'anió superòxid, el qual es pot convertir en altres espècies com el peròxid d'hidrogen i el radical hidroxil (Reuter et al. 2010; Waris and Ahsan 2006).




---

**Figura 1.6. Subproductes del metabolisme aeròbic de la cèl·lula.** Al llarg del procés de reducció d'O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O durant el transport d'electrons de la respiració aeròbica, als mitocondris, es generen subproductes com O<sub>2</sub><sup>·-</sup> (anió superòxid), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peròxid d'hidrogen) i ·OH (radical hidroxil) (Ames, Shigenaga, and Hagen 1993).

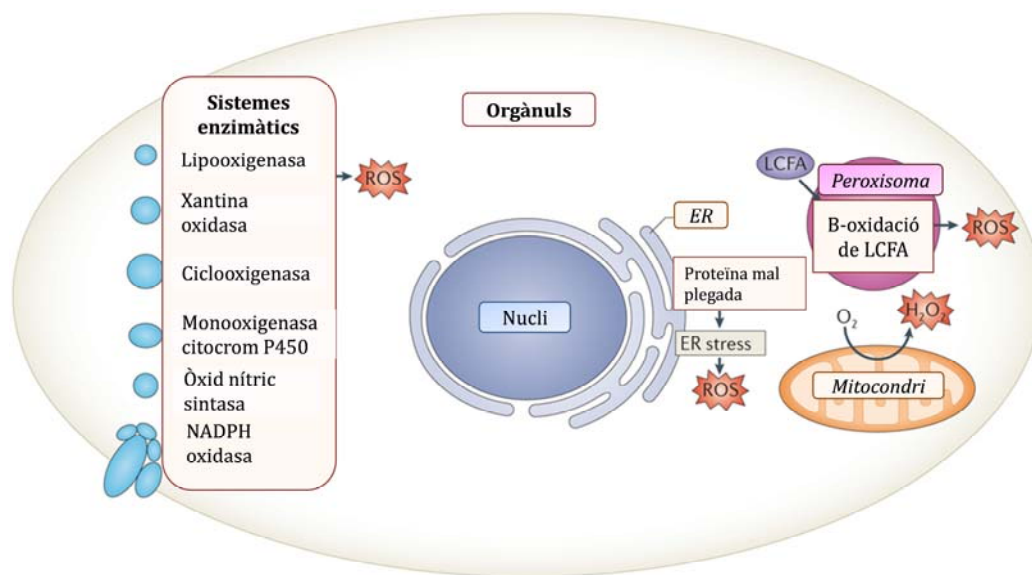
---

Una altra important font de ROS intracel·lular són els enzims NOX, una família d'enzims nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat oxidases (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidases, NADPH oxidases) que presenten la característica de generar ROS com a funció biològica, no com a subproducte. Els enzims NOX són proteïnes associades a la membrana plasmàtica de la cèl·lula que generen anions superòxid com a producte de la reacció de transferència d'electrons a l'oxigen molecular (Bedard and Krause 2007). Aquests enzims van ser identificats i caracteritzats inicialment en macròfags i neutròfils, els quals es va veure que generaven ROS com a mecanisme de defensa de l'hoste en resposta a mediadors de la inflamació. En cèl·lules no fagocítiques, en canvi, les ROS generades pels enzims NOX estan involucrades en les vies de transducció del senyal cel·lular i regulen papers fisiològics de la cèl·lula (creixement cel·lular, diferenciació cel·lular, apoptosi, remodelació del citoesquelet, etc) (Lassègue and Griendling 2010; Fomby and Cherlin 2011).

A més del mitocondri, també es generen ROS com a subproducte de processos metabòlics en altres orgànuls cel·lulars. Al reticle endoplasmàtic (endoplasmic reticulum, ER) es genera l'espècie anió superòxid quan hi ha un mal plegament de proteïnes, ja que aquestes s'acumulen al lumen, induint estrès oxidatiu (Haynes,

Titus, and Cooper 2004). Per altra banda, als peroxisomes es produeix peròxid d'hidrogen durant la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos (figura 1.7) (Holmström and Finkel 2014).

També hi ha altres enzims oxidoreductors que generen ROS com a subproductes de la seva activitat, com la lipooxigenasa, la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, la monooxigenasa del citocrom P450 o l'òxid nítric sintasa.



**Figura 1.7. Fonts de ROS intracel·lulars.** Els orgànuls generadors de ROS són el mitocondri, el reticle endoplasmàtic (ER), i els peroxisomes (durant el metabolisme dels àcids grassos de cadena llarga (long-chain fatty acids, LCFAs)). A més, un ventall d'enzims generen ROS: lipooxigenasa, xantina oxidasa, ciclooxigenasa, monooxigenasa del citocrom P450, òxid nítric sintasa i NADPH oxidasa. ROS, espècies reactives d'oxigen; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peròxid d'hidrogen (Holmström and Finkel 2014).

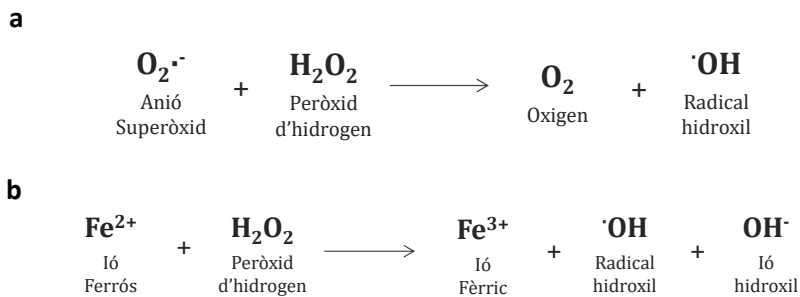
### 1.3.2 Sistema antioxidant

Els nivells de ROS intracel·lulars són equilibrats per la pròpia cèl·lula per prevenir l'estrès oxidatiu mitjançant sistemes antioxidants de defensa endògens enzimàtics i no enzimàtics. Per una banda, el **sistema de defensa antioxidant no enzimàtic**

està format per petites molècules que interaccionen directe o indirectament amb les ROS (Ghezzi 2005; D'Autréaux and Toledano 2007).

Una de les molècules que actua de forma directe sobre aquestes espècies és el **Glutatió (GSH)**. El glutatió és un tripèptid (Glutamil-Cisteinil-Glicina) amb un grup tiol lliure (-SH) a la cisteïna, responsable de les propietats antioxidants d'aquest. El glutatió reduït (GSH) actua com agent reductor, el qual pot ser oxidat (glutatió oxidat, GSSG) en presència de ROS.

El sistema de defensa antioxidant no enzimàtic que interacciona indirectament amb les ROS està format per proteïnes com l'albumina, la ceruloplasmina o la transferrina. El principal mecanisme d'acció d'aquest sistema és evitar les reaccions de Fenton o Haber-Weiss (figura 1.8) mitjançant la quelació de metalls de transició com el Coure o el Ferro (Vertuani, Angusti, and Manfredini 2004; Haber and Weiss 1934). D'aquesta manera s'impedeix la formació de radicals extremadament oxidants que es generen a partir de peròxids.

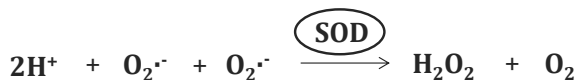


**Figura 1.8. Reacció de Haber-Weiss (a) i Reacció de Fenton (b).**

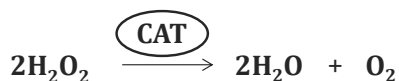
Per altra banda, el **sistema de defensa antioxidant enzimàtic** és un conjunt d'enzims que interaccionen directament amb les ROS, actuant com a catalitzadors (figura 1.9) (Kohen and Nyska 2002; Halliwell 2006; Matés 2001; D'Autréaux and Toledano 2007).

En formen part els següents enzims:

- ✓ **Enzim superòxid dismutasa (SOD):** Metal·loenzim que catalitza la conversió del radical superòxid a peròxid d' hidrogen i oxigen.



- ✓ **Enzim catalasa (CAT):** Enzim que catalitza la conversió de peròxid d' hidrogen a aigua i oxigen. Aquest completa la detoxificació de la cèl·lula iniciada per l'enzim SOD.



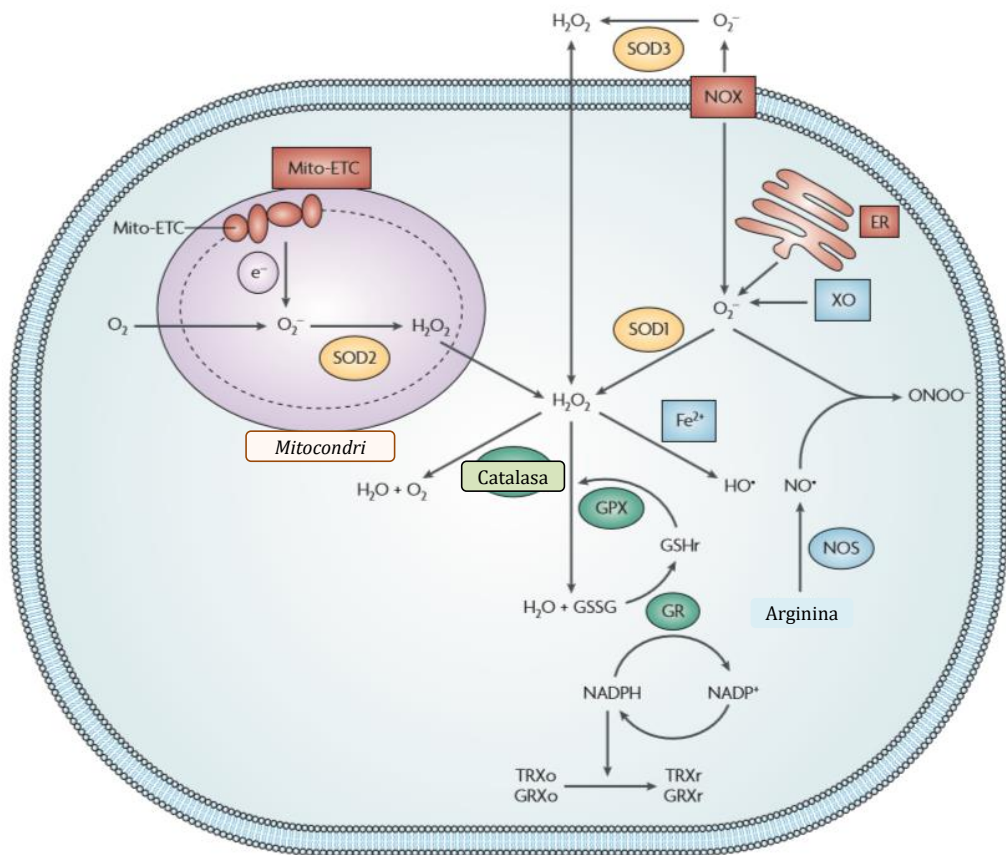
- ✓ **Enzim glutatió peroxidasa (GPx):** Enzim que, juntament amb el glutatió reduït (GSH), catalitza la reducció de peròxids, generant-se glutatió oxidat (GSSG) i aigua.



L'enzim **glutatió reductasa (GRed)** és un enzim dependent de NADPH que catalitza la reducció del glutatió oxidat (GSSG) a glutatió reduït (GSH), el que li permet un cop reduït, catalitzar reaccions de reducció de peròxids.



Dins del sistema antioxidant enzimàtic hi ha enzims addicionals com la tioredoxina reductasa (TrxR), la qual també contribueix en l'equilibri redox de la cèl·lula. La TrxR és una flavoproteïna que, de manera dependent de NADPH, redueix la tioredoxina, la qual participa en reaccions redox catalitzades a través de l' oxidació reversible del seu lloc actiu entre l' estat ditiòlic i disulfur (D'Autréaux and Toledano 2007).



**Figura 1.9. Regulació de l'estat redox cel·lular.** Extret de Trachootham, Alexandre, and Huang 2009.

### 1.3.3 Estrès oxidatiu i càncer

Les ROS existeixen en totes les cèl·lules aeròbiques, en equilibri amb el sistema antioxidant (Waris and Ahsan 2006).

Com s'ha comentat, en cèl·lules sanes, on els nivells de ROS són baixos, aquests promouen la proliferació cel·lular i la supervivència (Cairns, Harris, and Mak 2011; Bystrom, Guzman, and Rivella 2013).

En les cèl·lules tumorals es sospita que certs mecanismes exògens i endògens poden generar estrès oxidatiu durant el desenvolupament i la progressió del



càncer. Dins dels mecanismes endògens se sap que factors com l'activació d'oncogens, la pèrdua de la funció de la proteïna supressora de tumors p53, la disfunció mitocondrial o el metabolisme alterat, generen un augment de la producció de ROS en cèl·lules tumorals. Les ROS generades per fonts extracel·lulars o intracel·lulars poden causar dany en el DNA cel·lular. Aquest dany, en cèl·lules sanes, pot activar la proteïna p53, desencadenar una resposta a l'estrès oxidatiu i reparar el DNA. En cèl·lules tumorals amb p53 defectuosa, en canvi, el dany en el DNA provocat per ROS s'acumula, degut a la compromesa funció de reparació del DNA. En cèl·lules tumorals amb p53 sense mutar, per altra banda, les mutacions del DNA generades per ROS poden causar la pèrdua de la funció de p53, desencadenant defectes en la reparació del DNA, i en conseqüència, acumulant mutacions. La conseqüència d'aquestes mutacions és la inestabilitat genòmica, el que provoca l'activació d'oncogens, un estrès metabòlic aberrant, una disfunció mitocondrial i una davallada d'antioxidants. Tot això, a més, pot incrementar els nivells de ROS, els quals promouen més dany en el DNA i inestabilitat genòmica. Aquesta situació es pot descriure, doncs, com el **cercle viciós de ROS**, on s'incrementa l'estrès oxidatiu i es promou la inestabilitat genòmica i el desenvolupament del càncer (Trachootham, Alexandre, and Huang 2009).

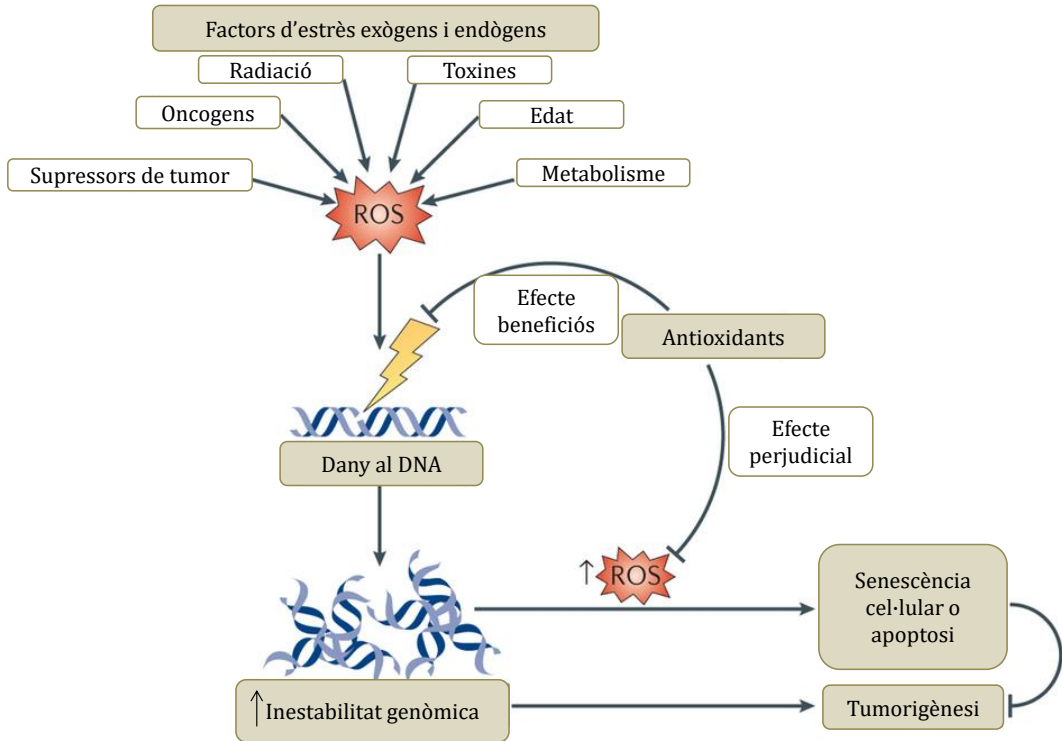
S'ha vist que les ROS tenen múltiples funcions sobre diferents Hallmarks de les cèl·lules tumorals ja que aquestes estan implicades en (Liou and Storz 2010; Fiaschi and Chiarugi 2012):

- La transactivació de Receptors Tyrosin Kinases (RTK) independents de lligand, disminuint el llindar d'activació d'aquests: **manteniment de la senyalització proliferativa.**
- L'activació del gen supressor de tumors p53, la pèrdua d'inhibició per contacte i la pèrdua de la dependència d'anclatge: **evasió dels factors supressors de creixement.**

- La sobreexpressió o activació del protooncogen c-Met, associat a la invasió cel·lular; la secreció i activació de metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular (MMP), capaces de degradar les unions cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu; la plasticitat en la motilitat cel·lular i la transició epiteli-mesenquimal: **invasió i metàstasi**.
- L'expressió de la telomerasa: **potencial replicatiu il·limitat**.
- L'activació de progenitors endotelials, l'alliberació i senyalització de VEGF i angiopoietina i la retenció de cèl·lules perivasculares: **inducció de l'angiogènesi**.
- La inactivació del gen supressor de tumors fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat 3-fosfatasa (PTEN), l'activació de l'oncogen Src, la resistència a Anoikis (apoptosi induïda per una defectuosa o la manca d'unió cèl·lula-matriu extracel·lular), l'activació del factor nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), el qual regula gens antiapoptòtics; i l'activació del factor de transcripció c-AMP Response Binding Protein (CREB), el que promou la supervivència cel·lular: **evasió de senyals apoptòtiques**.
- L'increment de la taxa de mutació i de la sensibilitat a agents mutagènics, i compromet els sistemes de vigilància: **inestabilitat genòmica i les mutacions**.
- L'adquisició de mutacions en les cèl·lules neoplàsiques a causa de la inflamació, accelerant l'evolució a la malignitat: **microambient inflamatori**.
- L'efecte Warburg, la regulació positiva de transportadors de glucosa, l'activació d'oncogens com Myc i Ras, la mutació de gens supressors de tumors

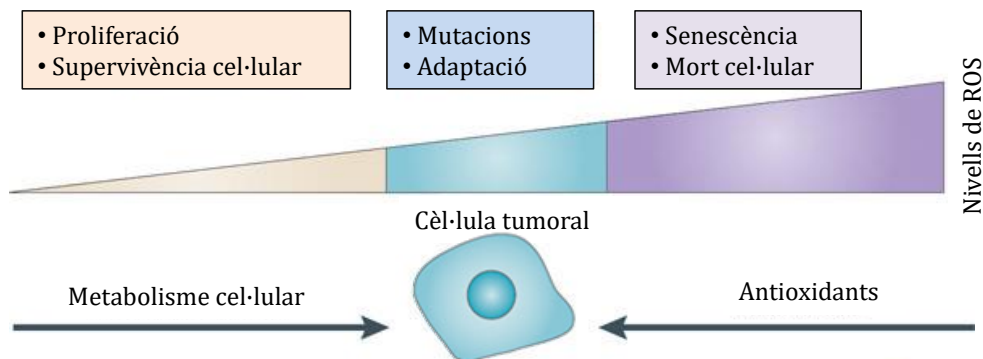
com p53, i l'augment del factor induïble per hipòxia-1 (HIF-1): **adaptació del metabolisme energètic.**

Pel que fa al metabolisme alterat de les cèl·lules tumorals resultant, se sap que aquest, a la vegada, genera elevats nivells de ROS, els quals indueixen mutacions addicionals (inestabilitat genòmica) i adaptació, provocant que la cèl·lula reguli estrictament els nivells d'aquestes espècies i dels antioxidants, el que genera un **nou balanç redox** capaç de mantenir aquests nivells i permetent que la cèl·lula sobrevisqui, afavorint el desenvolupament i la progressió del càncer. Es pot dir, doncs, que els antioxidants poden tenir un paper perjudicial o beneficiós sobre aquesta malaltia ja que aquests poden protegir les cèl·lules contra el dany oxidatiu del DNA, i per tant, reduir la inestabilitat genòmica i la incidència del càncer; però per altra banda, permeten a les cèl·lules resistir la inducció de la senescència o l'apoptosi induïdes per l'estrès oxidatiu, i d'aquesta manera accelerar la formació del tumor (figura 1.10) (Holmström and Finkel 2014).



**Figura 1.10. Efectes beneficiosos i perjudicials dels antioxidants en la formació d'un tumor** (Holmström and Finkel 2014).

Quan els nivells de ROS són elevats en les cèl·lules tumorals s'indueix **estrès oxidatiu persistent**, el qual promou la proliferació cel·lular, però és insuficient per provocar la mort cel·lular (Cairns, Harris, and Mak 2011; Klaunig, Kamendulis, and Hocevar 2010; Valko et al. 2006; Liou and Storz 2010). Per altra banda, quan els nivells de ROS són excessius, o quan l'eficiència dels antioxidants és baixa, l'estrès oxidatiu generat pot causar dany cel·lular irreversible mitjançant l'oxidació de biomolècules com lípids de membrana, enzims, nucleòtids del DNA, grups sulfidril de proteïnes i fragmentació/cross-linking de ribonucleoproteïnes. Aquest dany compromet la viabilitat i la funció cel·lular, desencadenant, la majoria de vegades, en senescència i mort cel·lular (figura 1.11) (Cooke et al. 2003).



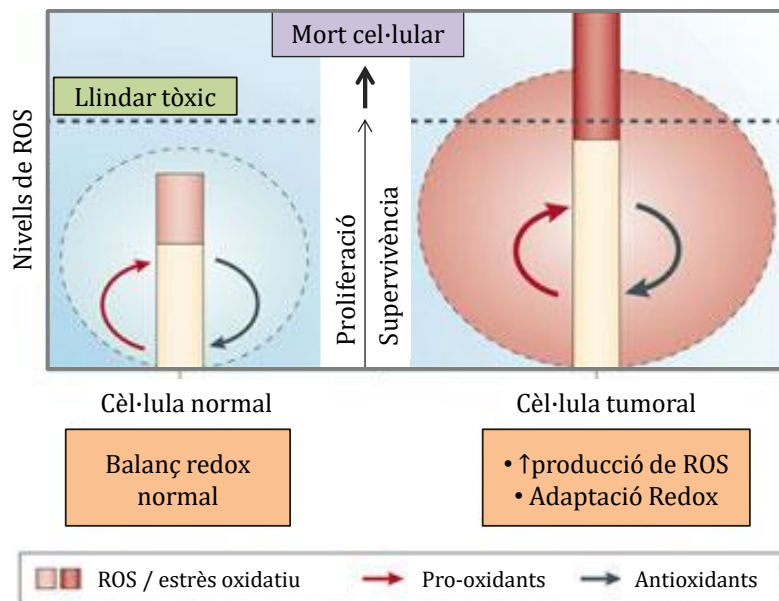
**Figura 1.11. Relació entre els nivells de ROS i el càncer.** Les ROS, a nivells baixos, promouen la proliferació i la supervivència cel·lular (groc). Quan els nivells de ROS són excessivament elevats, en canvi, es genera estrès oxidatiu, el qual pot desencadenar senescència o la mort cel·lular (lila). Per evitar aquesta situació, la cèl·lula utilitza antioxidants. En una cèl·lula tumoral, el seu metabolisme alterat genera uns nivells de ROS elevats. A través de mutacions i adaptació, aquesta cèl·lula aconsegueix equilibrar molt estrictament els nivells de ROS i d'antioxidants (nou balanç redox), reduint els nivells de ROS a moderats, nivells aptes per a que la cèl·lula tumoral sobrevisqui (Cairns, Harris, and Mak 2011).

### 1.3.4 Teràpia Redox com a possible teràpia antitumoral

Els elevats nivells de ROS intracel·lulars de les cèl·lules tumorals fan que aquestes cèl·lules siguin més vulnerables que les cèl·lules normals a agents oxidants externs.

L'**estat redox alterat** de les cèl·lules tumorals és, per tant, una prometedora diana de noves drogues antitumorals. El mecanisme d'acció d'aquests agents es basa, o bé en la inhibició del sistema antioxidant de les cèl·lules, o bé en la generació de ROS intracel·lular. Els agents que es basen en la **inhibició del sistema antioxidant** de les cèl·lules, són molècules que inhibeixen la síntesi d'agents antioxidants com el GSH, per exemple, i per tant desencadenen un increment dels nivells de ROS intracel·lulars al no poder ser modulats. Per altra banda, els agents que es basen en la generació de ROS intracel·lular (**agents prooxidants**), incrementen els nivells de ROS, que de forma basal en les cèl·lules tumorals ja

estan propers al llindar tolerable per la viabilitat cel·lular, i en conseqüència, indueixen la mort d'aquestes cèl·lules. Les cèl·lules sanes, per contra, toleren uns nivells més elevats de ROS exògens ja que els nivells basals intracel·lulars d'aquestes espècies són inferiors i, a més, presenten un efectiu sistema antioxidant (figura 1.12) (Trachootham, Alexandre, and Huang 2009).



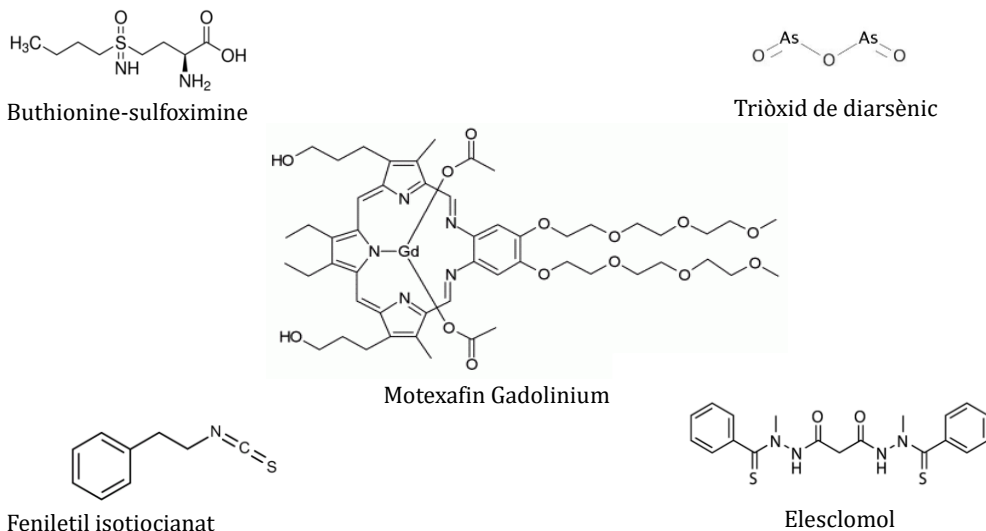
**Figura 1.12. L'estat redox en les cèl·lules tumorals, una diana per a la teràpia antitumoral mitjançant els agents pro-oxidants.** Les cèl·lules sanes mantenen l'equilibri entre la generació de ROS i la seva eliminació (antioxidants). Aquestes cèl·lules, degut a la seva capacitat antioxidant, toleren certs nivells de ROS exògens. Les cèl·lules tumorals, en canvi, al presentar uns nivells de ROS més elevats, reestableixen un nou balanç redox a partir d'un sistema antioxidant incrementat, mantenint uns nivells de ROS més elevats (per sota del llindar tòxic). Aquestes cèl·lules, doncs, són més sensibles a agents exògens pro-oxidants o agents que inhibeixen el sistema antioxidant ja que són més dependents del sistema antioxidant i més vulnerables als increments de ROS (Trachootham, Alexandre, and Huang 2009).

Està descrit que dins del mecanisme d'acció de molts dels agents quimioterapèutics actuals com el 5-fluororacil, la bleomicina, el cisplatí, el paclitaxel o la doxorubicina, a més dels efectes directes sobre el DNA i la divisió

cel·lular s'inclou la generació de ROS (Klaunig, Kamendulis, and Hocevar 2010; S. Zhou, Palmeira, and Wallace 2001; Manoury et al. 2005; Chirino and Pedraza-Chaverri 2009; Alexandre et al. 2006).

Actualment hi ha diversos agents antitumorals dissenyats per alterar l'equilibri redox de les cèl·lules canceroses, els quals es troben en diferents fases de l'estudi (preclíniques /clíniques). En són uns exemples (figura 1.13) (Trachootham, Alexandre, and Huang 2009):

- ✓ Motexafin Gadolinium. És un agent exogen generador de ROS. Actua com a catalitzador pro-oxidant. Indueix la formació de superòxid intracel·lular i inhibeix la TrxR. Aquest agent s'acumula preferentment en les cèl·lules tumorals.
- ✓ Buthionine-sulfoximine. És un inhibidor del sistema antioxidant, en concret, inhibeix la síntesi de GSH.
- ✓ Feniletil isotiocianat. És un inhibidor del sistema antioxidant. Aquest es conjuga i exporta el GSH a l'exterior de les cèl·lules tumorals. Inhibeix el GPx i el factor nuclear kappa B (NF-kB, nuclear factor kappa beta).
- ✓ Triòxid de diarsènic. Aquest agent té un múltiple mecanisme d'acció. Inhibeix el GPx i la cadena respiratòria mitocondrial.
- ✓ Elesclomol. Té un mecanisme d'acció encara desconegut. Se sap, però, que indueix una ràpida acumulació de ROS en cèl·lules tumorals, desencadenant l'apoptosi.



**Figura 1.13. Agents moduladors de ROS en estudi** (Trachootham, Alexandre, and Huang 2009).

## 1.4 Metalls i càncer

Se sap que els metalls són essencials per a la vida. Diverses funcions dels sistemes biològics, com el transport i emmagatzematge de molècules (ex hemoglobina), el transport d'electrons (ex citocroms) o l'activitat catalítica de metal·loenzims són dependents de ions metàl·lics, és a dir, necessiten metalls per dur a terme la corresponent acció (Kraemer, Merchant, and Angeles 2008; Osredkar and Sustar 2011). Per altra banda, hi ha metalls que es poden emprar com a prodrogues, en tractaments com el càncer, units a lligands, ja que alguns d'aquests metalls poden activar-se a l'ambient reductor de l'interior de les cèl·lules tumorals (Graf and Lippard 2012).

### 1.4.1 Compostos metàl·lics en el tractament del càncer

L'ús de complexos metàl·lics com agents terapèutics es remunta 3500 anys aC. Fa més de 5000 anys, els egipcis utilitzaven coure per esterilitzar l'aigua (Sadler



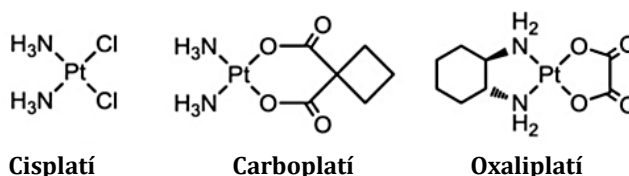
1991). Durant les últimes dècades, s'han utilitzat complexos d'antimoni per al tractament de la leishmaniosis. És després del descobriment fortuït de l'activitat antitumoral del cisplatí (Rosenberg et al. 1969), quan va sorgir la investigació de nous complexos metàl·lics com a fàrmacs en el tractament del càncer. A més, degut a l'aparició de resistències a agents com el cisplatí i als seus efectes secundaris (Reedijk 2003; Clarke and Sadler 1999), molts estudis s'han centrat en el **desenvolupament de noves drogues basades en metalls** com el platí, el ruteni, el coure, el cobalt o el ferro, per superar aquests problemes (Sun et al. 2007).

### 1.4.1.1 Compostos de Platí

La introducció del cisplatí en la clínica va ser als anys 70, el que va representar una fita històrica en l'èxit de fàrmacs contra el càncer, en especial en pacients amb càncer de testicles i ovaris. El **cisplatí** (cis-diaminodicloroplatí, *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) (figura 1.14) és un compost format per dos àtoms de platí unit a dos grups amino i dos àtoms de clor, el qual actua com una prodroga. Aquest, un cop dins la cèl·lula, experimenta hidròlisi, canviant una o dues molècules de clor de la seva estructura per molècules d'aigua, generant els complexos hidratats [PtCl(H<sub>2</sub>O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> i [Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, els quals interaccionen amb el DNA mitjançant enllaços covalents intra- i intracatenaris, formant adductes, modificant la seva estructura i, en conseqüència, alterant el cicle cel·lular i desencadenant l'apoptosi. Els adductes que predominen són crosslinkings intracatenaris 1,2-GC i 1,2-AG (Wong and Giandomenico 1999; Sun et al. 2007). S'ha vist, però, que el cisplatí presenta altres mecanismes d'acció. Per una banda, la detoxificació d'aquest complex per part de la cèl·lula és parcial, el que altera la homeòstasis redox, i en conseqüència, s'incrementen els nivells de ROS intracel·lulars. A més, s'ha vist que el tractament amb cisplatí disminueix els nivells de NADPH, el que desencadena un estat redox alterat a mitocondri, amb la conseqüent generació de radicals hidroxil (Jungwirth et al. 2011).

El **carboplatí** (cis-diamino[1',1'-ciclobutandicarboxilat] platí II) (figura 1.14) és un anàleg de segona generació amb una activitat similar a la del cisplatí, però el qual, un cop dins la cèl·lula, s'hidrolitza més lentament, el que el fa més estable i que presenti menys efectes secundaris, en concret menys nefrotoxicitat, el que permet administrar dosis més elevades als pacients. Presenta l'inconvenient, però, de generar mielosupressió.

L'**oxaliplatí** (1,2-diaminociclohexà-oxalat-platí II) (figura 1.14), per últim, és un compost de platí de tercera generació, efectiu sobre tumors insensibles al cisplatí o al carboplatí. Això és degut a que les proteïnes de reparació de dany al DNA (mismatch repair proteins, MMR) no reconeixen els adductes generats per l'oxaliplatí degut a que existeixen diferències entre l'estructura del DNA generada per l'oxaliplatí i el carboplatí/cisplatí. Aquest fàrmac, però, presenta el desavantatge que genera neurotoxicitat (Wong and Giandomenico 1999; Kelland 2007).



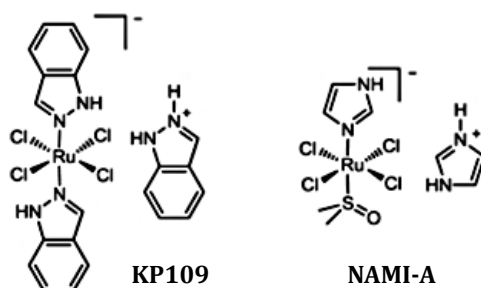
**Figura 1.14. Compostos de platí Cisplatí, Carboplatí i Oxaliplatí (Jungwirth et al. 2011).**

### 1.4.1.2 Compostos de Ruteni

L'activitat antitumoral dels **compostos de ruteni** (Ru) va ser descoberta als anys 60. Aquests compostos presenten una potent activitat antitumoral, toxicitat reduïda, diferent mecanisme d'acció al cisplatí, no provoca resistència creuada amb aquest, i té un espectre diferent. Els compostos de Ru es poden administrar en estat oxidatiu inactiu Ru(III) i, un cop dins les cèl·lules tumorals, on hi ha un ambient reductor degut a la baixa concentració d'oxigen i al pH àcid, es redueix a estat tòxic Ru(II), el que genera un dany mínim en cèl·lules sanes. Un cop dins la

cèl·lula, poden unir-se a diferents biomolècules, no únicament al DNA. Aquests, a l'estar dins del mateix grup químic que el ferro (grup 8), tenen la capacitat d'unir-se a proteïnes com la transferrina, receptor de la qual es troba en elevades quantitats en cèl·lules tumorals, i per tant, fa que els complexos transferrina-ruteni siguin transportats activament a teixits neoplàsics (Page 2012).

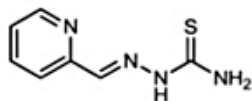
Durant els últims anys s'han dissenyat compostos de Ru amb diferents lligands. Els complexos interessants són els compostos que presenten Ru(III) unit a grups arena o a lligands N-heterocíclics. A dia d'avui hi ha dos agents de ruteni provats en assajos clínics, el [IMH] [*trans*-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)Im] (NAMI-A) i el [inh] [*trans*-RuCl<sub>4</sub>In<sub>2</sub>] (KP-1019) (figura 1.15). Tots dos fàrmacs han completat amb èxit la fase I. El NAMI-A és antiangiogènec, presenta una baixa activitat contra els tumors primaris. El KP1019, en canvi, és actiu en tumors primaris (Page 2012).



**Figura 1.15. Compostos de ruteni KP-1019 i NAMI-A (Jungwirth et al. 2011).**

### 1.4.1.3 Compostos Coure, Cobalt, Manganès i Ferro

Els **compostos de coure** (Cu) són coneguts per la seva activitat redox. El cicle redox d'aquests complexos es basa en la reducció de Cu(II) a Cu(I) a través de tiols intracel·lulars com ara el GSH en condicions aeròbiques. En presència d'oxigen, aquests complexos de Cu(I) són capaços de generar anió superòxid, el qual pot induir ROS mitjançant la reacció de Fenton. En són un exemple els compostos de Cu(II) amb tiosemicarbazona (figura 1.16), per exemple, que se sap que esgoten el GSH i indueixen ROS (Jungwirth et al. 2011).

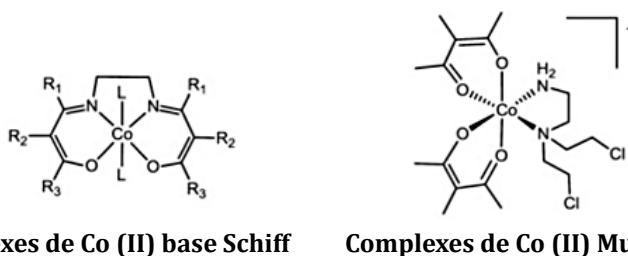



---

**Figura 1.16. Lligand thiosemicarbazona** (Jungwirth et al. 2011).

---

Els **compostos de cobalt** (III) presenten la característica de tenir potencial per a ser reduïts en condicions cel·lulars. En condicions aeròbiques, però aquesta propietat és inhibida per la presència d'oxigen. Per tant, en la situació d'hipòxia d'un teixit tumoral, es poden generar complexes de Co(II) reduït a partir de complexes de Co(III) oxidat, el quals s'ha vist que són menys citotòxics i es poden administrar com a profàrmacs (Graf and Lippard 2012). L'activitat antitumoral d'aquests compostos es deu a l'activació del complex Co(III) a Co(II) i l'alliberació del lligand; i a la generació de ROS per l'autooxidació catalítica del compost. En són un exemple els compostos de cobalt amb base Schiff o que contenen Mustamina (figura 1.17) (Jungwirth et al. 2011).



**Complexes de Co (II) base Schiff**

**Complexes de Co (II) Mustamina**

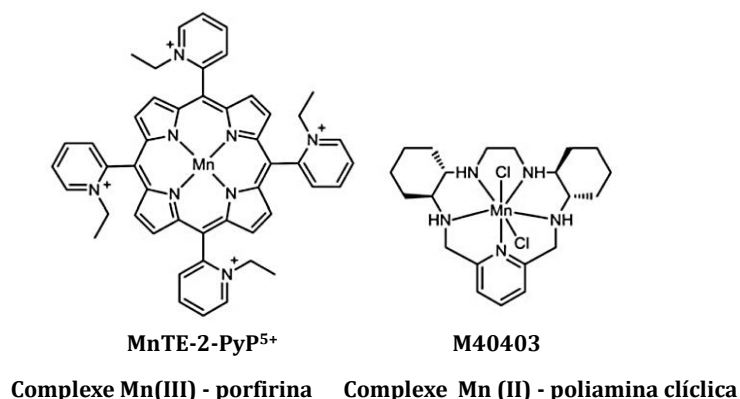
---

**Figura 1.17. Complexes cobalt amb base Schiff i amb Mustamina** (Jungwirth et al. 2011).

---

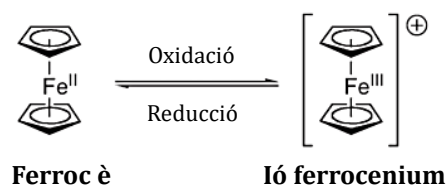
Els **compostos de manganès** (Mn) presenten un elevat potencial redox. Donat això i que l'estrès oxidatiu és una característica de les cèl·lules tumorals, s'investiguen possibles antioxidants sintètics, mimètics de l'enzim superòxid dismutasa (SOD), amb diferents lligands com porfirina (MnTE-2-PyP<sup>5+</sup>) o poliamina cíclica (M40403) (figura 1.18). Els compostos amb lligand porfirina, per

exemple, presenten estats d'oxidació de 2+ a 5+ sota condicions fisiològiques, una baixa toxicitat i una elevada habilitat per travessar membranes. Cap compost de Mn, però, es troba en assajos clínics encara (Jungwirth et al. 2011).



**Figura 1.18. Complexes de manganès amb lligand porfirina i poliamina cíclica**  
(Jungwirth et al. 2011).

Els **compostos de ferro** (Fe) són uns prometedors agents antitumorals ja que aquests compostos poden generar complexes de ferro actius generadors de ROS a l'interior de la cèl·lula (Kwong et al. 2015). El ferrocè, per exemple, presenta activitat antitumoral enfront càncers de mama hormono i no hormono dependent. Aquest complex presenta una gran afinitat per a receptors d'estrògens. El ferrocè, dins la cèl·lula, es converteix en els estats d'oxidació II i III (ferrocè i ió ferrocini) (figura 1.19) (Gasser, Ott, and Metzler-Nolte 2011).



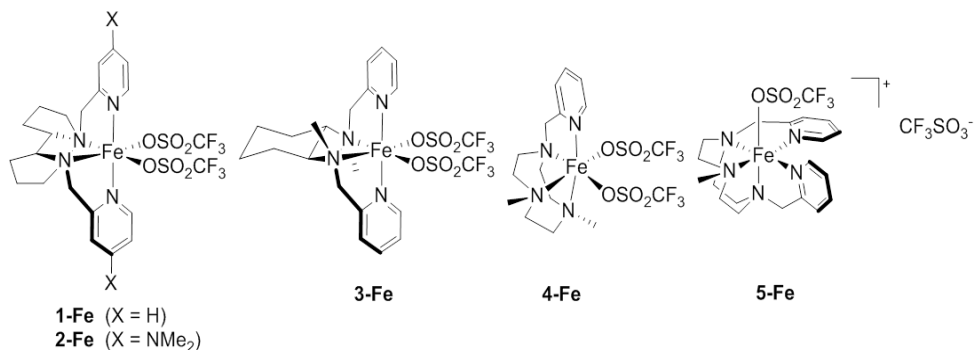
**Figura 1.19. Ferrocè i ió ferrocini** (Gasser, Ott, and Metzler-Nolte 2011).

L'activitat antitumoral d'aquest i d'un gran nombre de complexos de ferro naturals i sintètics no està causada per la unió d'aquests al DNA, sinó que està lligada a reaccions redox de Fe(III) i Fe(II) en condicions fisiològiques, el que pot desencadenar dany en el DNA (Kwong et al. 2015; Graf and Lippard 2012).

### 1.4.2 Compostos metàl·lics sintetitzats pel QBIS-CAT

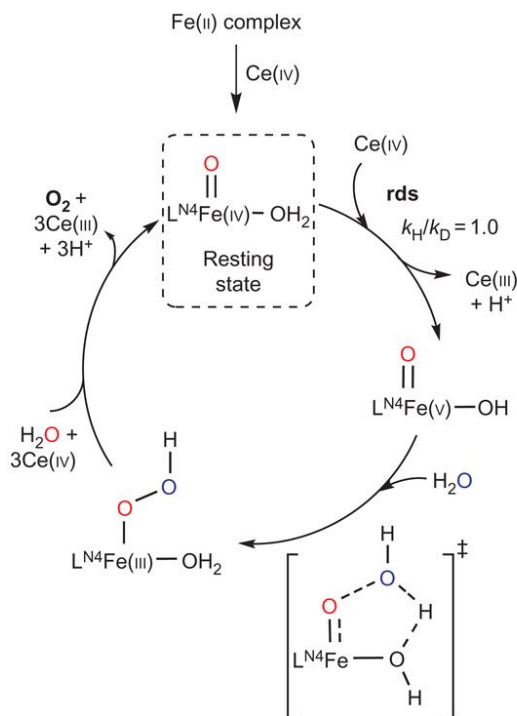
Al llarg dels últims anys han sorgit **complexos basats en metalls de transició** com a potents catalitzadors de l'oxidació de substrats orgànics. Els compostos en els quals es centra aquest estudi són un grup de complexos metàl·lics sintetitzats pel grup d'investigació de Química Bioinspirada, Supramolecular i Catàlisi (QBIS-CAT) de la Universitat de Girona, amb la finalitat de catalitzar reaccions d'oxidació de substrats orgànics com alcans o alquens. Aquests complexos s'han realitzat com a models funcionals d'enzims de la família de les Rieske dioxygenases, capaços de realitzar aquestes reaccions d'oxidació (Company et al. 2007; Cusso et al. 2013).

Aquests complexos (figura 1.20) formen part d'una gran família de sistemes catalítics, els quals contenen lligands senzills tetradentats (**1**, **2**, **3** i **4**), o pentadentats (**5**), basats en nitrogen. Aquests són altament solubles en aigua, accessibles i capaços de realitzar l'oxidació de l'aigua amb una elevada eficiència i resistència a l'autooxidació. Els compostos **1-Fe** ( $[\text{Fe}(\text{OTf})_2(\text{bpbp})]$ ), **2-Fe** ( $[\text{NMe}_2(\text{bpbp})\text{Fe}(\text{OTf})_2]$ ), **3-Fe** ( $[\text{Fe}(\text{OTf})_2(\text{mcp})]$ ) i **4-Fe** ( $[\text{Fe}(\text{OTf})_2(\text{Me}^2\text{Pytacn})]$ ) són coneguts per la seva potent activitat catalítica d'oxidacions. El compost **5-Fe** ( $[\text{Fe}(\text{OTf})_2(\text{MePy}_2\text{tacn})(\text{CH}_3\text{CN})]$ ), en canvi, se sap que estabilitza elevats estats d'oxidació del ferro (Costas and Que 2002; Cusso et al. 2013; Company et al. 2014; Chen MS 2007; Canta et al. 2014; Company et al. 2007).



**Figura 1.20. Complexes basats en el metall de transició Fe(II) utilitzats en aquest estudi.**

Estudis basats en l'anàlisi del catalitzador **4-Fe** com a prototip dels complexos  $[\text{Fe}(\text{X})_2(\text{L}^{\text{N}^4})]$ , han postulat que els complexos de ferro amb aquesta fórmula general, on  $\text{L}^{\text{N}^4}$  significa lligand tetradentat i X significa Cl o OTf en posició cis, comparteixen un cicle catalític en comú, en el qual a partir dels complexos de Fe(II) inicials  $[\text{Fe}(\text{X})_2(\text{L}^{\text{N}^4})]$  es generen espècies intermèdies altament oxidants (figura 1.21) (Fillol et al. 2011).



**Figura 1.21. Mecanisme postulat dels complexes de ferro basats en lligands de nitrogen tetradentats** (Fillol et al. 2011)

Intermedis de reacció altament oxidant com  $\text{LN}^4\text{Fe(v)=O}$  i  $\text{LN}^4\text{Fe(III)-OOH}$  ja s'han descrit en oxidacions catalítiques d'alcans i alquens per complexes  $[\text{Fe(X)}_2(\text{LN}^4)]$  (Company et al. 2009; Quiñonero et al. 2005; Bassan et al. 2002). Per altra banda, s'ha vist que espècies de Fe(III) hidroperoxo actuen com eficients oxidants i poden estar implicades en l'oxidació de biomolècules (Vardhaman et al. 2011).

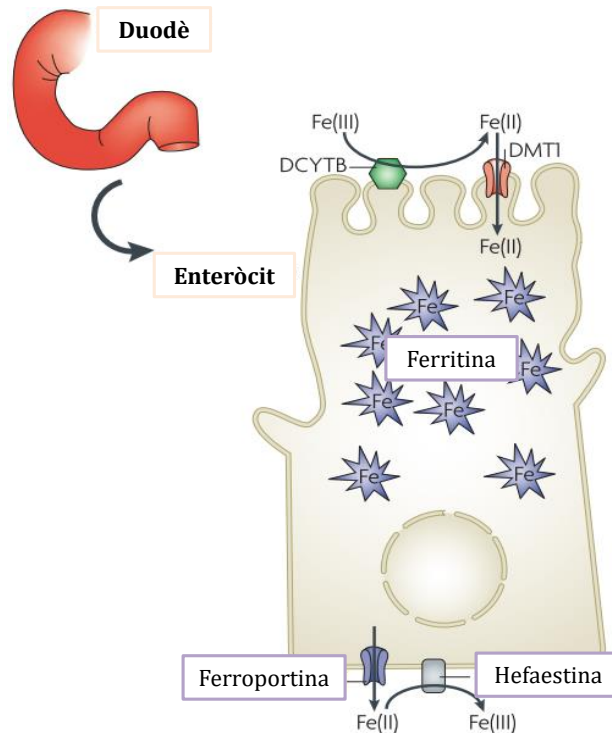
Les propietats d'aquets complexes metàl·lics ens van dur a analitzar-los com a possibles agents per a teràpies prooxidants antitumorals, el quals podrien desencadenar reaccions cíclics redox a l'interior de la cèl·lula, generant elevats nivells de ROS, desestabilitzant l'equilibri redox de les cèl·lules tumorals, desencadenant estrès oxidatiu, i finalment, la mort cel·lular.



### 1.4.3 El ferro

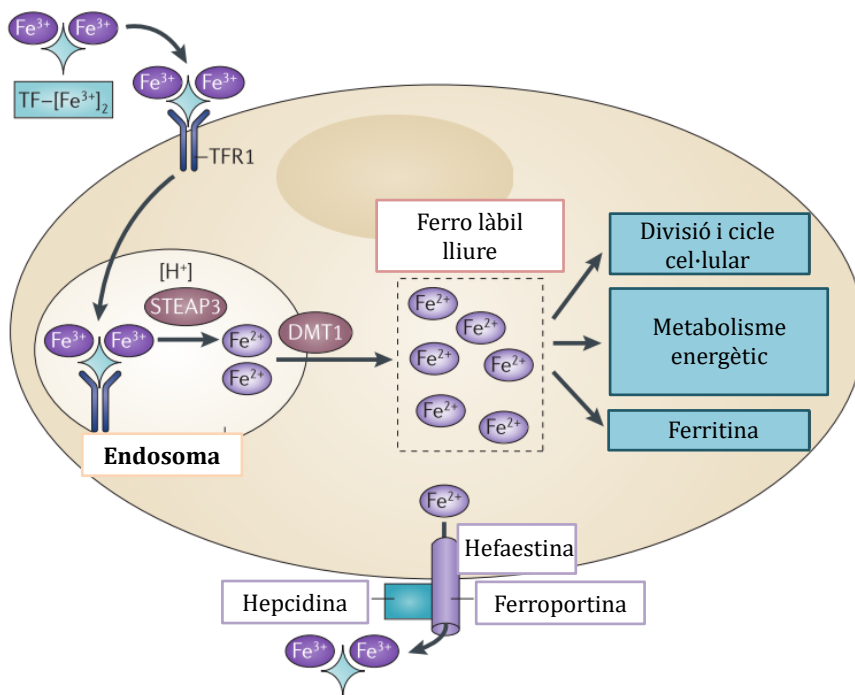
El **ferro** és el metall més abundant en el cos humà. Aquest és un metall de transició que habitualment es troba en 2 estats, en estat ferrós ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o en estat fèrric ( $\text{Fe}^{3+}$ ), i per tant, pot participar en reaccions redox, actuant com a donador i acceptador d'electrons, el que el fa **essencial per al metabolisme cel·lular**. Molts enzims cel·lulars depenen d'aquest metall, incloent enzims mitocondrials involucrats en la cadena respiratòria (citocroms) i enzims implicats en la síntesi del DNA i el cicle cel·lular (Ribonucleòtid reductasa, RR) (De Domenico, McVey Ward, and Kaplan 2008; Suzy V Torti and Torti 2013), per tant, es pot dir que el Fe té un paper important en processos implicats en la replicació, el metabolisme energètic i el creixement cel·lular. A més, el Fe exerceix una funció important en el transport d'oxigen ja que aquest metall és indispensable per a la formació de l'hemoproteïna hemoglobina i la mioglobina (D. Kalinowski and Richardson 2005; De Domenico, McVey Ward, and Kaplan 2008; Suzy V Torti and Torti 2013).

El ferro l'incorporem al nostre organisme a través de la dieta, en estat fèrric ( $\text{Fe(III)}$ ). Aquest, es converteix en ferro ferrós ( $\text{Fe(II)}$ ) al tracte intestinal, mitjançant l'enzim ferroreductasa citocrom-b duodenal (Duodenal Cytochrome B, DCYTB), el qual es troba a la superfície apical dels enteròcits de la mucosa del jejú i el duodè superior, i aleshores és internalitzat a l'interior de la cèl·lula mitjançant la proteïna transportadora de metalls divalents 1 (divalent metal transportar, DMT-1). El ferro en estat ferrós ( $\text{Fe(II)}$ ), pot emmagatzemar-se al citosol de la cèl·lula unint-se a l'apoferritina, generant ferritina com a reserva, o bé, pot ser transportat a través de la superfície basolateral de les cèl·lules al plasma mitjançant la ferroportina. El Fe (II) pot tornar a convertir-se en  $\text{Fe(III)}$  mitjançant l'oxidació provocada per l'enzim ferroxidasa associat a membrana, hefaestina (figura 1.22) (De Domenico, McVey Ward, and Kaplan 2008; Suzy V Torti and Torti 2013).



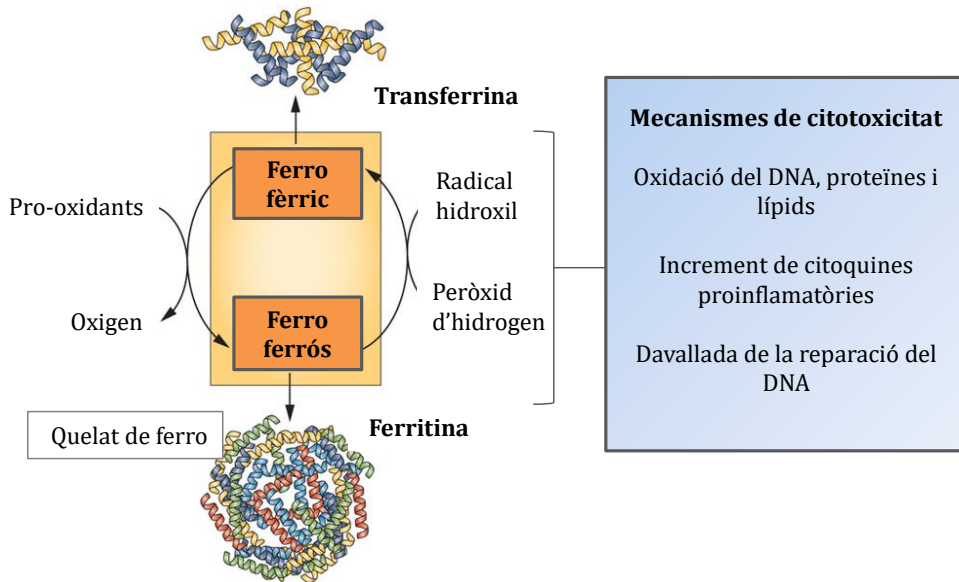
**Figura 1.22. Transport del ferro a través d'un enteròcit** (De Domenico, McVey Ward, and Kaplan 2008).

Ja al torrent sanguini, el  $\text{Fe(III)}$  és transportat per la proteïna transferrina, presentant nul·la toxicitat, la qual s'uneix al receptor de membrana TfR 1 (Transferrin Receptor 1) de les cèl·lules, generant l'endocitosi del complex. El pH àcid de l'interior de l'endosoma provoca la desunió del ferro i el TfR, restant el metall lliure i en estat ferrós degut a la reducció per part de la ferrireductasa STEAP3. Aleshores, el TfR lliure retorna a membrana i el  $\text{Fe(II)}$  és transportat de l'endosoma al citosol a través de la proteïna de membrana DMT-1, on pot tenir diferents destins: incorporar-se al lloc actiu de proteïnes involucrades en la divisió i el cicle cel·lular; incorporar-se a clústers ferro-sofre, implicats en el cicle de Krebs o la fosforilació oxidativa (metabolisme energètic); o bé, emmagatzemar-se unit a ferritina (figura 1.23) (De Domenico, McVey Ward, and Kaplan 2008; Bystrom, Guzman, and Rivella 2013; Suzy V Torti and Torti 2013).



**Figura 1.23. Metabolisme del ferro a nivell cel·lular** (Suzy V Torti and Torti 2013).

A l'interior de la cèl·lula, el ferro pot trobar-se unit a diferents enzims o proteïnes, o lliure, en petites concentracions (ferro lliure  $Fe^{2+}$ ,  $<20\mu M$ ) (Dixon and Stockwell 2014). Aquest metall, tot i ser essencial en el metabolisme cel·lular, també pot ser tòxic. En cèl·lules sanes, els nivells de ferro estan finament regulats amb la finalitat de promoure el funcionament cel·lular i evitar la toxicitat que generen les ROS causades per la presència d'elevats nivells de ferro lliure en medi aquós, el qual pot interaccionar amb l'oxigen i catalitzar reaccions com la de Fenton o Haber-Weiss (Jomova and Valko 2011). El mecanisme de la citotoxicitat generada pels elevats nivells d'aquest metall inclou l'oxidació de lípids, proteïnes i DNA (estrès oxidatiu), l'increment de citoquines proinflamatòries i la davallada de la reparació del DNA (figura 1.24) (Stephenson et al. 2014).



**Figura 1.24. Metabolisme i homeostàsia del ferro.** Mitjançant prooxidants, el ferro fèrric passa a ferro ferrós. La reacció de ferro ferrós amb peròxid d'hidrogen genera radicals hidroxil a través de la reacció de Fenton. L'acumulació de ferro promou citotoxicitat a través de diferents mecanismes com oxidació del DNA, proteïnes i lípids, increment de citoquines proinflamatòries i davallada de la reparació del DNA (Stephenson et al. 2014).

El transportador de metalls DMT1 i la ferroportina, a més d'estar involucrats en l'homeòstasi del ferro, estan implicats en la regulació del metabolisme d'aquest metall, els gens dels quals s'expressen en diferents teixits del cos i varien en funció de les necessitats d'aquest metall (Bystrom, Guzman, and Rivella 2013).

El que sembla ser, però, el regulador central del metabolisme del ferro és la hormona hepcidina, la qual augmenta en presència d'elevats nivells d'aquest metall. Aquesta hormona s'uneix a la ferroportina, provocant la seva internalització, i en conseqüència, la degradació intracel·lular del receptor, reduint-se la seva expressió en membrana i disminuint la capacitat de la cèl·lula d'exportar el ferro, desencadenant una davallada dels nivells de ferro sèrics. Per contra, quan els nivells de ferro són baixos, els nivells d'hepcidina romanen baixos, restant la ferroportina disponible per exportar el ferro intracel·lular al torrent

sanguini i es pugui produir l'absorció de ferro (Bystrom, Guzman, and Rivella 2013).

Diversos estudis relacionen l'**excés de ferro** en l'organisme amb un **increment del risc de patir malalties cardiovasculars, neurològiques o càncer** (Valko et al. 2006; Toyokuni 2014). S'ha vist que en les cèl·lules tumorals, els processos que regulen els nivells d'aquest metall estan alterats, el que afavoreix la proliferació cel·lular en excés i que avanci la malaltia (Suzy V Torti and Torti 2013; Bystrom, Guzman, and Rivella 2013).

En cèl·lules sanes, els nivells de TfR i hepcidina són baixos, a diferència dels nivells de ferroportina, que són elevats, el que genera uns baixos nivells de ferro làbil intracel·lular. En cèl·lules tumorals, en canvi, els nivells de TfR, hepcidina i de metal·loreductases STEAP són elevats, mentre que els nivells de ferroportina són més baixos, el que incrementa els nivells de ferro làbil intracel·lular, i en conseqüència, incrementa la biodisponibilitat d'aquest metall per a la cèl·lula i per a la generació de ROS (Suzy V Torti and Torti 2013).

### **1.4.3.1 Tractament de la siderèmia elevada amb agents quelants**

La **teràpia quelant de ferro** va ser dissenyada amb la finalitat d'alleujar els efectes tòxics de l'excés d'aquest metall a l'organisme, responsable de determinades malalties associades a la sobrecàrrega de ferro.

Els quelants de ferro són petites molècules naturals o sintètiques que s'uneixen al ferro intracel·lular amb gran facilitat, segrestant-lo. Són coneguts per la seva acció antioxidant degut a que al quelatar el ferro intracel·lular eviten que es doni lloc la reacció de Fenton, i per tant, s'inhibeix la generació de ROS i, en conseqüència, el dany oxidatiu (Guo et al. 2007; D. S. Kalinowski and Richardson 2007). Diversos quelants de ferro, com la deferiprona, el deferasirox o la deferoxamina (DFO)

s'utilitzen en la clínica en pacients amb trastorns amb sobrecàrrega de ferro com la talassèmia, la mielodisplàsia, o l'anèmia de cèl·lules falciformes (Kontoghiorghes et al. 2008).

Actualment, el disseny d'agents quelants d'ions metàl·lics intracel·lulars, com el ferro, és una estratègia per al desenvolupament de noves drogues antitumorals (taula 1.1) ja que aquest metall és essencial per a les cèl·lules tumorals degut a que aquestes necessiten més quantitat d'aquest per a la divisió i el cicle cel·lular i l'obtenció d'energia a conseqüència del seu metabolisme accelerat (taula 1.2) (S V Torti et al. 1998; Kontoghiorghes et al. 2008; Suzy V Torti and Torti 2013), el que es reflecteix en una elevada expressió de TfR1 i de l'enzim RR, crític per a la síntesi del DNA (Le and Richardson 2004).

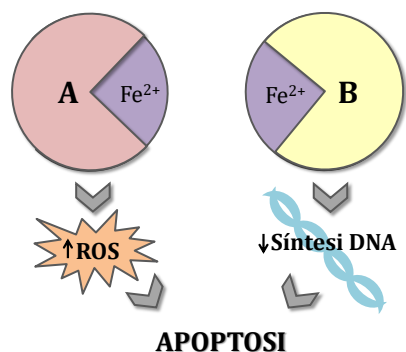
**Taula 1.1. Exemples d'agents quelants de ferro que s'estan avaluant com a agents antitumorals.** Dades obtingudes de Suzy V Torti and Torti 2013.

Agent quelant	Tipus d'estudi
Ciclopirox	Preclínic i clínic
Tachpiridina	Preclínic
Dp44mT	Preclínic
DpC	Preclínic
BpT	Preclínic
TSC24	Preclínic
Deferasirox	Preclínic i algun pacient
Triapina	Preclínic i clínic
Deferoxamina (DFO)	Preclínic i clínic

**Taula 1.2. Diferents tipus de càncers en els quals el metabolisme del ferro està alterat.** Dades obtingudes de Suzy V Torti and Torti 2013.

Tipus de càncer	Tipus d'evidència
Càncer de pulmó de cèl·lules no petites	Cultius cel·lulars, models animals i epidemiològica
Càncer de mama	Cultius cel·lulars, models animals, teixit humà i epidemiològica
Carcinoma de cèl·lules renals	Cultius cel·lulars i models animals
Càncer de fetge	Cultius cel·lulars, models animals i epidemiològica
Càncer gàstric, aerodigestiu, d'estómac i d'esòfag	Teixit humà, models animals i epidemiològica
Càncer colorectal	Cultius cel·lulars, teixit humà, models animals i epidemiològica
Càncer de pròstata	Cultius cel·lulars i epidemiològica
Càncers hematològics (leucèmies, limfomes i mielomes)	Cultius cel·lulars, models animals, epidemiològica i estudis clínics
Melanoma	Cultius cel·lulars i models animals
Càncer de pàncrees	Cultius cel·lulars, models animals i assajos clínics
Càncer de vesícula	Cultius cel·lulars

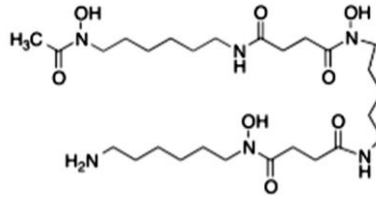
S'estan explorant **dues vies d'estratègia en la teràpia quelant** aprofitant aquestes característiques (figura 1.25).



**Figura 1.25. Estratègies de la teràpia quelant amb agents quelants de ferro.** Els agents quelants de ferro redox actius incrementen els nivells de ROS (A). Els agents quelants de ferro redox inactius, en canvi, disminueixen o eliminen el ferro, inhibint la síntesi del DNA (B). Els efectes dels dos tipus d'agents quelants desencadenen la mort cel·lular.

La primera estratègia es basa en la utilització d'**agents quelants redox inactius** per provocar la davallada dels nivells de ferro o l'esgotament d'aquest en les cèl·lules tumorals, provocant l'aturada de la proliferació cel·lular, a més d'inhibir la funció biològica d'enzims dependents de ferro implicats en la síntesi del DNA, com és el cas de la RR, desencadenant la mort cel·lular. Per altra banda, se sap que els baixos nivells de ferro afecten l'expressió de molècules involucrades en el creixement i la proliferació del cicle cel·lular, com la ciclina D1, inhibint la transició

G1/S (D. R. Richardson et al. 2009; Yuan, Lovejoy, and Richardson 2004; D. S. Kalinowski and Richardson 2007; Suzy V Torti and Torti 2013). Un exemple d'agent quelant de ferro redox inactiu és la DFO (figura 1.26).

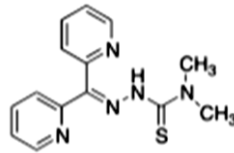



---

**Figura 1.26. Deferoxamina (DFO).** Agent quelant de ferro redox inactiu.

---

La segona estratègia, la més recent, consta de l'administració d'**agents quelants redox actius** que faciliten el cicle redox del ferro en les cèl·lules tumorals, ja que aquestes presenten uns nivells més elevats d'aquest metall, generant ROS, i finalment, desencadenant la mort cel·lular (Suzy V Torti and Torti 2013; Bystrom, Guzman, and Rivella 2013; Chaston et al. 2004). Un exemple d'agent quelant de ferro redox actiu és la Di-piridilcetona tiosemicarbazona (Dp44mT) (Figura 1.27).




---

**Figura 1.27. Di-piridilcetona tiosemicarbazona (Dp44mT).** Agent quelant de ferro redox actiu.

---

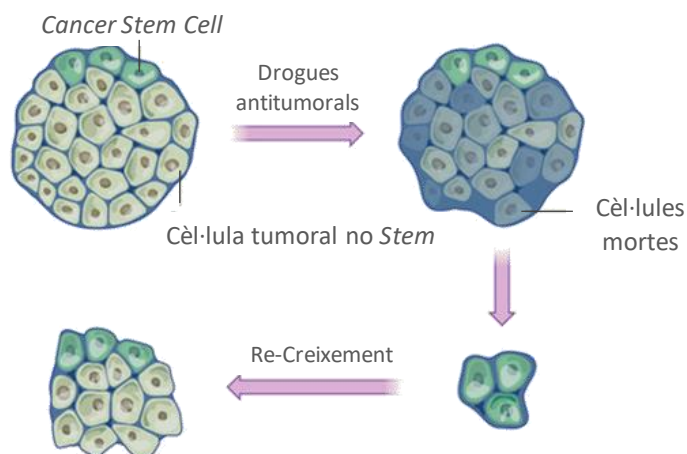
Diversos estudis han revelat que els agents quelants de ferro, a més d'induir l'apoptosi de cèl·lules tumorals "*in vitro*", redueixen la mida dels tumors "*in vivo*" (D. S. Kalinowski and Richardson 2007; D. R. Richardson et al. 2009). Per altra banda, s'ha descobert que els agents quelants de ferro indueixen l'expressió de gens regulats pel factor inductor d'hipòxia (HIF, Hypoxia-inducible factor 1), el qual està format per dues subunitats, una de les quals està regulada per hipòxia o ferro (Le and Richardson 2002). Els gens regulats per HIF són el TfR1; el VEGF1 (Vascular endothelial growth factor 1 gene), implicat en l'angiogènesi; i el NdrG1



(N-Myc downstream regulated gene 1), supressor del creixement cel·lular i de la metastasi (Le and Richardson 2004). La inducció d'aquest últim també s'ha associat amb la transició epiteli-mesènquima en càncer de còlon i pròstata (Chen et al. 2012), el que suggereix que els agents quelants de ferro no només són potents inhibidors del creixement de tumors primaris, sinó que també inhibeixen la disseminació metastàsica.

## 1.4 Cèl·lules mare tumorals

La majoria de les teràpies actuals, tot i que redueixen la mida dels tumors, no aconsegueixen eliminar la totalitat d'aquests. Això és degut a que la massa tumoral està formada per dues poblacions de cèl·lules, les cèl·lules tumorals, i les cèl·lules mare tumorals (**Cancer Stem cells, CSC**) o cèl·lules iniciadores de tumors, una petita població de cèl·lules resistentes a la quimioteràpia i a la radioteràpia, capaces proliferar i diferenciar-se, regenerant el tumor (figura 1.28) (Reya et al. 2001; Creighton et al. 2009; a Singh and Settleman 2010).



**Figura 1.28. Heterogeneïtat de poblacions en un tumor.** Una massa tumoral està formada per una població de cèl·lules tumorals i una població de CSC. Les cèl·lules tumorals enfront un tractament antitumoral moren. Les CSC, en canvi, són resistentes a aquests tractaments. Aquestes cèl·lules són, doncs, les que regeneren el tumor (Gilbertson and Graham 2012).

Les primeres CSC es van identificar a la dècada dels 90 en una leucèmia mieloide aguda humana (acute myeloid leukemia, AML). En aquests estudis es va veure que un grup de cèl·lules tumorals (CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>) procedents de AML presentaven elevat potencial de replicació i autorenovació i capacitat de diferenciar-se, essent capaces de regenerar tumors en ratolins immunosuprimits (Bhatia et al. 1997; Lapidot et al. 1994). No va ser fins l'any 2003 que es van identificar les primeres CSC en un tumor sòlid, en concret en un tumor de mama, del qual només una població de cèl·lules (CD44<sup>+</sup> CD24<sup>low/-</sup>) era capaç de formar tumors (Al-Hajj et al. 2003). Posteriorment es van identificar CSC en altres tumors com en càncer de cervell (CD133<sup>+</sup>) (Hemmati et al. 2003; S. K. Singh et al. 2003), de pròstata (CD44<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup>) (Collins et al. 2005), de pell (CD20<sup>+</sup>)(melanoma) (Fang et al. 2005), de còlon (CD133<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>) (C. Wang et al. 2012; O'Brien et al. 2007), de pàncrees (CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup>) (C. Li et al. 2007) o de pulmó (CD133<sup>+</sup>) (Eramo et al. 2008). L'heterogeneïtat en l'expressió de marcadors de CSC en línies cel·lulars de diferents tipus de tumors causa discrepàncies en l'ús d'uns o altres marcadors per a la identificació d'aquestes cèl·lules (Stuelten et al. 2010).

Estudis amb CSC de mama han demostrat que aquestes cèl·lules són resistents a agents quimioterapèutics, com el paclitaxel (J. Zhou et al. 2007), el que explica la baixa resposta al tractament amb aquest agent en pacients amb càncer de mama metastàtic (Gennari et al. 2006). Això és degut a que, a diferència de les cèl·lules normals, el cicle cel·lular d'aquestes és més lent (quiescència), presenten resistència a l'apoptosi (sobreexpressió de proteïnes antiapoptòtiques), tenen l'habilitat de bombejar les drogues cap a l'exterior de la cèl·lula (elevada expressió dels transportadors ABC (ATP-binding cassette), principalment ABCG2/BCRP i ABCB1/MDR1) i la capacitat de disminuir els efectes d'aquestes drogues mitjançant sistemes de reparació (elevada capacitat per a reparar el DNA) o mecanismes anti-immunitaris (baixa immunogeneïtat) (Ponti et al. 2005; Bao et al. 2006; Brenner 2004; Ho et al. 2007; Sainy et al. 2000; Haraguchi et al. 2006;

Raaijmakers et al. 2005; Szotek et al. 2006; J. Wang et al. 2007; J. Zhou et al. 2007). Sembla també, que la resistència de les CSC a les drogues antitumorals és degut a que aquestes cèl·lules utilitzen mecanismes de regulació redox (elevats nivells d'enzims antioxidants) que promouen la tolerància a aquests agents i la supervivència cel·lular (Acharya et al. 2010). Per altra banda, diferents estudis han demostrat que aquestes cèl·lules són les responsables de la progressió del tumor i de la metàstasi (Dalerba, Cho, and Clarke 2007; Wicha, Liu, and Dontu 2006).

### **1.4.1 Transició Epiteli-Mesènquima**

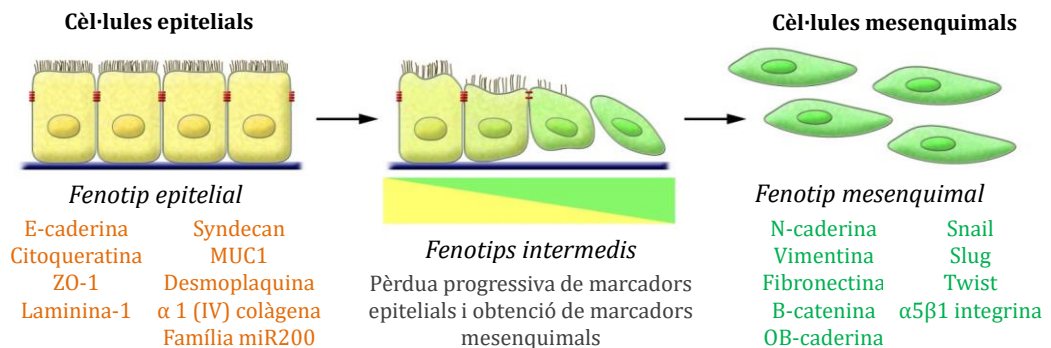
La **transició epiteli-mesènquima** (epithelial-mesenchymal transition ,EMT) és un procés biològic durant el qual les cèl·lules epitelials polaritzades, que interactuen amb la membrana basal a través de la seva superfície basal, adquireixen **propietats mesenquimals**: pèrdua de l'adhesió cel·lular, augment de la mobilitat i de la invasivitat, resistència a l'apoptòsi i canvis morfològics (Micalizzi, Farabaugh, and Ford 2010; Kalluri and Weinberg 2009). En cèl·lules tumorals, la EMT pot redefinir l'estat epitelial de la cèl·lula, assignant-li característiques de cèl·lula mesenquimal i expressió de marcadors de cèl·lules mare (CSC) (De Craene and Berx 2013; Mani et al. 2008).

La EMT es classifica en tres subtipus en funció del context biològic i de les conseqüències funcionals (Kalluri and Weinberg 2009; Micalizzi, Farabaugh, and Ford 2010).

- ✓ EMT Tipus I: La EMT té lloc durant la implantació, l'embriogènesi i el desenvolupament d'un òrgan.
- ✓ EMT Tipus II: La EMT té lloc en la regeneració de teixits i en la fibrosi.
- ✓ EMT Tipus III: La EMT té lloc en la progressió del càncer i en la metàstasi.

En un tumor epitelial es pot dur a terme la EMT tipus III sota un estat d'hipòxia i amb presència d'estímul generats per les pròpies cèl·lules tumorals, o bé per la

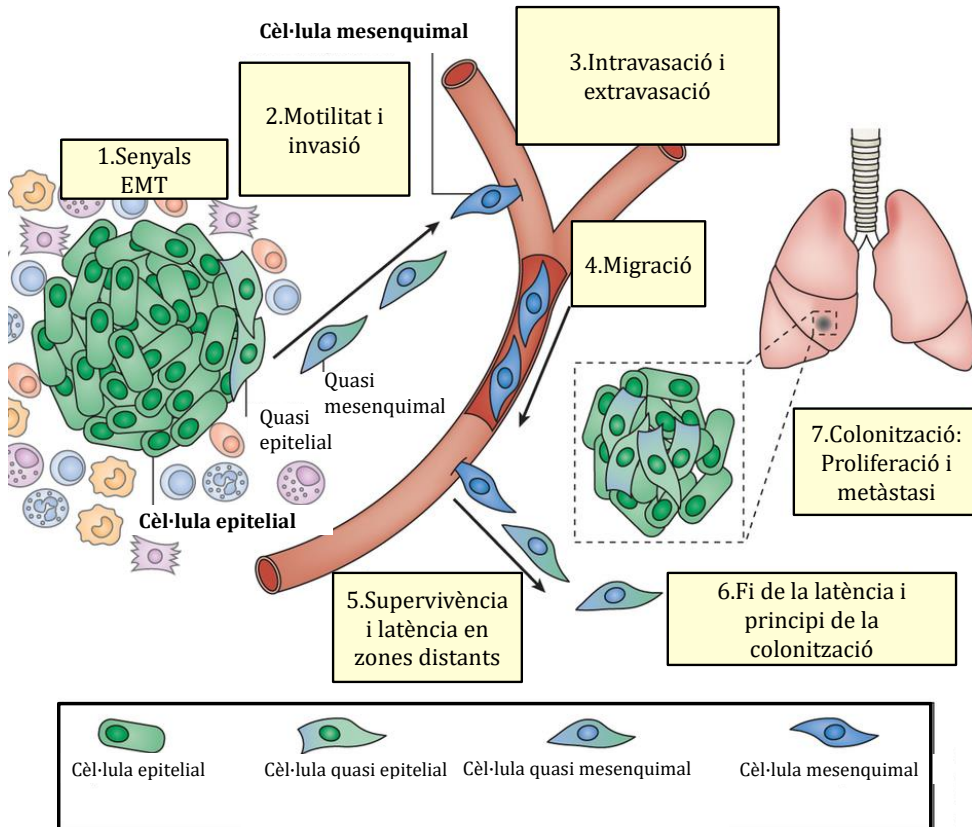
matriu extracel·lular (com el factor de creixement transformant beta 1 (TGF- $\beta$ )); i de lligands de receptors tirosin quinasa (RTKs), els quals activen les corresponents vies de senyalització i desencadenen la inducció de factors de transcripció com Twist, Slug o Snail, generant-ne cèl·lules mesenquimals amb propietats de CSC (Said and Williams 2010; Tam and Weinberg 2013). L'activació dels factors de transcripció Snail (Snail 1, Snail 2 i Snail 3), els quals són una família de proteïnes de dits de zinc, està àmpliament associat a fibrosis, càncer i EMT. Snail actua com a supressor de l'expressió de l'e-caderina, fet que facilita la disseminació de les cèl·lules tumorals i incrementa la capacitat de les cèl·lules per envair altres teixits. Snail, però, també regula altres aspectes del procés EMT, com l'increment de l'expressió de marcadors mesenquimals (fibronectina, vimentina o n-caderina), i la disminució de l'expressió de marcadors epitelials (e-caderina, claudina, ocludina, desmoplaquina) (figura 1.29) (Zeisberg and Neilson 2009; De Craene and Berx 2013).



**Figura 1.29. Transició epiteli-mesènquima.** La EMT és la transició de cèl·lula epitelial polaritzada a cèl·lula mesenquimal. Aquest procés inclou l'activació de factors de transcripció, l'expressió de proteïnes específiques de superfície, la reorganització i expressió de proteïnes del citoesquelet, la producció d'enzims que degraden la matriu extracel·lular, i canvis en l'expressió de microRNAs específics. ZO-1, zona ocludens, MUC1, mucina 1, associada a la superfície cel·lular; miRNA200, microRNA 200 (Kalluri and Weinberg 2009).

Les cèl·lules mesenquimals tenen la capacitat de crear vasos sanguinis dins del tumor, permetent l'angiogènesi. L'augment de la mobilitat permet que aquestes

cèl·lules migrin i viatgin pel torrent sanguini fins a un tou teixit, rediferenciant-se, degut a que són cèl·lules multipotents, i generant finalment un tumor secundari (figura 1.30) (Kalluri and Weinberg 2009; Tam and Weinberg 2013).



**Figura 1.30. Transició EMT de teixit epitelial a metàstasi.** En resposta a senyals promotores de EMT, una subpoblació de cèl·lules epitelials del tumor perden característiques epitelials (cèl·lules quasi epitelials). Aquestes cèl·lules s'alliberen de la massa tumoral, essent menys exposades a les senyals epitelials i adquirint més característiques mesenquimals, en presència de les cèl·lules de l'estroma (cèl·lules quasi mesenquimal). Aquestes cèl·lules són capaces d'envair teixits circumdants. Les cèl·lules mesenquimals tenen la capacitat per intravasarse als vasos sanguinis o ganglis limfàtics. A l'òrgan distant, el fenotip mesenquimal facilita la seva extravasació i invasió del nou teixit. El fenotip mesenquimal de les cèl·lules poden conferir a la cèl·lula avantatges de supervivència, o bé, latència. Quan les senyals siguin les òptimes per a les cèl·lules, aquestes duren a terme la transició mesènquima-epiteli (MET), adquirint gradualment propietats epitelials. Les noves senyals epitelials, diferents a les del tumor primari, provoquen que la cèl·lula esdevingui de nou epitelial, proliferi i generi metàstasi (Tam and Weinberg 2013).

### 1.4.2 CSC de mama induïdes per EMT

Robert A. Weinberg i col·laboradors van demostrar que cèl·lules mamàries epitelials sotmeses a EMT es comporten, en molts aspectes, de manera similar a cèl·lules mare normals (SC) o neoplàsiques (CSC) (Mani et al. 2008).

En els seus estudis van induir la EMT en cèl·lules epitelials de mama immortalitzades (HMLEs) mitjançant l'activació dels factors de transcripció Twist1 o Snail1. Com a resultat van obtenir cèl·lules d'aspecte mesenquimal, amb baixa expressió de mRNAs que codifiquen per marcadors epitelials, com la E-caderina; i sobreexpressió de mRNAs que codifiquen per marcadors mesenquimals, com la N-cadherina o la fibronectina. Les cèl·lules HMLE<sup>Shcad</sup> expressen marcadors propis de CSC de mama i de cèl·lules mare d'epiteli mamari (CD<sup>44high</sup> CD<sup>24low</sup>). Aquestes són capaces de formar mamosferes *in vitro* i presenten propietats tumorigèniques *in vivo* (Cuyàs, Corominas-Faja, and Menendez 2014; Gupta et al. 2009; Morel et al. 2008; Mani et al. 2008).

També van induir a EMT cèl·lules epitelials mamàries neoplàsiques immortalitzades (HMLER) mitjançant la inhibició del gen que codifica per la E-cadherina (CDH1) amb shRNA (short hairpin RNA) (Mani et al. 2008; Gupta et al. 2009), generant la línia cel·lular HMLER<sup>Shcad</sup>. Van observar una major proporció de cèl·lules que expressaven els marcadors (CD<sup>44high</sup> CD<sup>24low</sup>) i una major capacitat de formar mamosferes que en el cas de les cèl·lules de mama embrionàries no tumorals.

Per altra banda, estudis han demostrat que, en els dos casos, les cèl·lules induïdes a EMT, HMLE<sup>Shcad</sup> i HMLER<sup>Shcad</sup>, exhibeixen una major resistència al tractament de fàrmacs quimioterapèutics, com la doxorubicina o el paclitaxel (Gupta et al. 2009).









L'eficàcia terapèutica de la majoria dels tractaments actuals contra el càncer, principal causa de mort dels països desenvolupats, es veu limitada per la falta de selectivitat, la seva elevada toxicitat i l'aparició d'efectes secundaris i resistències. És per això que hi ha una intensa investigació per trobar fàrmacs contra les cèl·lules tumorals.

L'objectiu d'aquesta tesi és analitzar la potencial l'activitat antitumoral de diferents famílies de compostos que contenen metalls de transició a la seva estructura i els seus corresponents lligands. Aquests compostos han estat sintetitzats pel grup de Química Bioinspirada, Supramolecular i Catàlisi (QBIS-CAT) de la Universitat de Girona com a catalitzadors de reaccions d'oxidació de substrats orgànics, els quals desencadenen la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS). Ens plantejem, doncs, que aquests agents podrien presentar una activitat anticancerígena presumiblement diferent a la dels agents antitumorals emprats en l'actualitat i una activitat citotòxica més específica envers les cèl·lules tumorals, donat que aquestes presenten de manera característica uns nivells intracel·lulars de ROS més elevats que les cèl·lules normals. L'estrès oxidatiu generat per aquests compostos en les cèl·lules tumorals, provocarien dany irreversible en la cèl·lula, desencadenant com a conseqüència la mort cel·lular per apoptosi.

Per abordar aquest objectiu general, s'han dissenyat una sèrie d'objectius específics:

1) Analitzar l'activitat citotòxica de diferents famílies de complexos metàl·lics de Fe(II), Mn(II), Cu(II) o Co(II) i els seus corresponents lligands en diferents línies cel·lulars tumorals humanes per seleccionar els compostos amb activitat antitumoral.

2) Caracteritzar l'activitat biològica dels compostos seleccionats:

- Establir els seus efectes citotòxics en un panell ampli de línies cel·lulars tumorals i línies cel·lulars no tumorals humanes i determinar si són hemolítics enfront eritròcits humans.
  - Avaluar si els compostos indueixen un dany irreparable a les cèl·lules que comprometi la seva capacitat de dividir-se i generar clons.
  - Analitzar l'efecte dels compostos sobre el cicle cel·lular i el tipus de mort cel·lular que indueixen.
  - Caracteritzar el mecanisme d'acció dels lligands i determinar si aquest està relacionat amb la seva potent activitat oxidant.
  - Analitzar la capacitat dels compostos d'induir dany al DNA cel·lular.
- 3) Analitzar els efectes citotòxics dels compostos més interessants en models de cèl·lules mare tumorals, les quals característicament són resistents a la majoria d'agents antitumorals.
- 4) Avaluar la possible interacció entre un dels compostos actius seleccionats i la doxorubicina, un agent quimioterapèutic tradicional, per establir si aquest podria potenciar l'eficàcia terapèutica d'agents quimioterapèutics tradicionals.

---

## **3 Materials i mètodes**

---



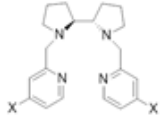
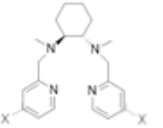
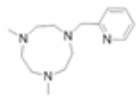
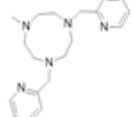
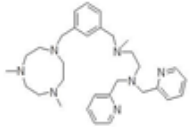
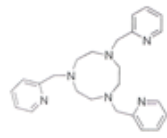
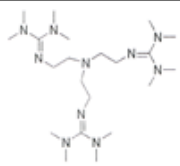
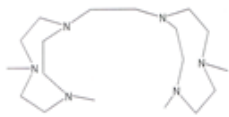
### 3.1 Compostos metàl·lics

Aquest estudi s'ha basat en l'estudi de 8 famílies de compostos sintetitzats pel grup de Química Bioinspirada, Supramolecular i Catàlisi (QBIS-CAT) de la Universitat de Girona (Taula 3.1).

La família **bpbp** ((2*S*,2*S'*)-1,1'-bis (pirid-2-metil)-2,2'-bipirrolidina), **bpmcn** (N,N'-bis(2-piridilmetil)-N,N'-dimetil-trans-1,2-diaminociclohexà), **Pytacn** (1,4-dimetil-7-(2-piridilmetil)-1,4,7-triazonà), **Py2tacn** (N-metil-N,N-bis(2-picolil)-1,4,7-triazonà), **tacn-xylyl-TPA** (N1-(3-((4,7-dimethyl-1,4,7-triazonan-1-yl)methyl)benzyl)-N1-methyl-N2,N2-bis(pyridin-2-ylmethyl)ethane-1,2-diamine), **Py3tacn** (1, 4, 7-tris (piridin-2-ilmetil)-1, 4, 7-triazonà), **TMG3tren** (1,1,1-tris {2-[N2-(1,1,3,3-tetrametilguanidin)] etil} amina) i **tacn-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-tacn** (1,2-bis(4,7-dimetil-1,4,7-triazonan-1-yl)età). Cada família de compostos comprèn el lligand sol, en absència de metall, lligands amb diferents substituents a la cadenes laterals, i lligands complexats a diferents metalls: Fe(II), Mn(II), Cu(II) o Co(II) (taula 3.1). Els lligands **1**, **2**, **6** i **7** comparteixen l'estructura **bpbp**, diferint en les cadenes laterals (H, NMe<sub>2</sub>, DMM, Py) i estan complexats a Fe(II) i Mn(II). Els lligands **3** i **8**, per altra banda, comparteixen l'estructura **bpmcn**, però difereixen en els substituents de la piridina (H i DMM). Els compostos metàl·lics amb el lligand **3** estan complexats a Fe(II), Mn(II) i Co(II), els compostos amb el lligand **8** i **12** a Fe(II) i Mn(II), els compostos que presenten els lligands **4** i **9**, a Fe(II), Mn(II) i Cu(II), i els compostos amb els lligands **5** i **11** únicament estan complexats a Fe(II). Per últim, la família **10**, només comprèn el lligand lliure de metall (**Py3tacn**). En total, l'estudi inclou un total de 35 compostos.

Aquests compostos es van sintetitzar seguint els corresponents protocols (Costas and Que 2002; Cusso et al. 2013; Company et al. 2007; Company et al. 2014; Chen MS 2007). Un cop sintetitzats, es van rehidratar amb aigua MilliQ a la concentració stock 1mM (solució mare) i es van conservar a una temperatura de -80 °C.

**Taula 3.1. Estructura dels diferents lligands. Metalls units als lligands (Fe(II), Mn(II), Cu(II), Co(II)).**

	<b>Lligand</b>	<b>Metall</b>	
	<b>1</b>	bpbp (X=H)	Fe (II), Mn (II)
	<b>2</b>	bpbp (X=NMe <sub>2</sub> )	Fe (II), Mn (II)
	<b>6</b>	bpbp (X=DMM)	Fe (II), Mn (II)
	<b>7</b>	bpbp (X=Py)	Fe (II), Mn (II)
	<b>3</b>	bpmcn	Fe (II), Mn (II), Co (II)
	<b>8</b>	bpmcn (X=DMM)	Fe (II), Mn (II)
	<b>4</b>	Pytacn	Fe (II), Mn (II), Cu (II)
	<b>5</b>	Py2tacn	Fe (II)
	<b>9</b>	tacn-xylyl-TPA	Fe (II), Mn (II), Cu (II)
	<b>10</b>	Py3tacn	
	<b>11</b>	TMG3tren	Fe (II)
	<b>12</b>	tacn-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -tacn	Fe (II), Mn (II)

## 3.2 Cultius cel·lulars

Les cèl·lules de càncer de mama humanes MCF-7, de càncer de pàncrees humanes CAPAN-1, de càncer de pròstata humanes PC-3, de limfoma no-Hodgkin's Z-138, Jeko-1, Granta, UPN-2 i SP53; les cèl·lules T de leucèmia limfoide JURKAT; i les cèl·lules de glioma LN229 i U87MG s'han obtingut de American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Els fibroblasts humans de còlon CCD-18Co s'han obtingut de EucellBank (Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya). Els fibroblasts humans de pell 1BR3G s'han obtingut de European Collection of Cell Cultures (ECACC, Porton, UK). Les línies cel·lulars MCF-7, CAPAN-1, PC-3, 1BR3G, CCD-18Co, LN229 i U87MG s'han mantingut en medi Eagle modificat per Dulbecco (DMEM, Gibco, Berlin, Germany). Les línies cel·lulars hematològiques s'han mantingut en medi Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Gibco, Berlin, Germany). Tots els medis s'han suplementat amb un 10 % de sèrum fetal boví (fetal bovine serum, FBS, Gibco, Berlin, Germany ) i 100  $\text{UmL}^{-1}$  penicil·lina-estreptomicina (Gibco, Berlin, Germany). El medi emprat per al manteniment de les cèl·lules Z-138, JURKAT i Jeko-1 també s'ha suplementat amb 25 mM Hepes (ICN). Les línies cel·lulars HMLER (cèl·lules epitelials mamàries humanes immortalitzades que sobreexpressen hTERT, SV40 T/t i H-RasV12) i HMLER<sup>ShEcad</sup> (cèl·lules HMLER transformades per inhibir l'expressió del gen CDH1, el qual codifica per l'e-caderina, via shRNA) s'han mantingut en una combinació de 50 % medi HMLE (Dulbecco modified Eagle medium/F-12 suplementat amb un 5 % de FBS, 1x penicil·lina-estreptomicina-glutamina (PSG), 10  $\mu\text{g/ml}$  d'insulina, 10 ng/ml de factor de creixement epidèrmic (epidermal growth factor, EGF), i 0.5 g/ml de hidrocortisona; i 50 % medi MEGM (mammary epithelial cell growth medium, Lonza) (Mani et al. 2008). Totes les línies cel·lulars han crescut a una temperatura de 37 °C sota una atmosfera humidificada amb un 5% de CO<sub>2</sub>.



### **3.3 Assaig de citotoxicitat**

L'activitat antiproliferativa dels compostos s'ha analitzat mitjançant l'assaig de viabilitat cel·lular 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue (MTT), Sigma, St. Louis, MO, USA. Aquest és un mètode colorimètric basat en la reducció metabòlica de l'MTT, mitjançant l'enzim mitocondrial succinat deshidrogenasa, a formazan, un precipitat de color blau que permet determinar la funcionabilitat mitocondrial de les cèl·lules tractades, i per tant, la seva viabilitat.

Per fer els diferents assaigs, es van preparar plaques de 96 pous amb 5000 cèl·lules 1BR3G, 6000 cèl·lules MCF-7, 6000 cèl·lules PC3, 10000 cèl·lules CAPAN-1 o 4000 cèl·lules CCD-18Co per pou, 24 hores prèvies al tractament amb els compostos. En el cas de les línies hematològiques, es va utilitzar una concentració de 400000 cèl·lules per ml. Posteriorment, es van preparar diferents dilucions de les solucions mare dels compostos en medi, dins d'un rang de 0 a 100  $\mu$ M, amb les que es van tractar les cèl·lules. Es van utilitzar com a control les cèl·lules sense tractar. Al cap de 48 hores, es van retirar els tractaments i es van fer dos rentats amb tampó fosfat salí (PBS). Seguidament, es va afegir medi fresc amb un 10% de MTT a cada pou i es van incubar les plaques a 37 °C durant 2 hores protegides de la llum. Posteriorment es va retirar el medi dels pous i es va afegir DMSO, el qual dissol els cristalls de formazan que s'han format. Es van llegir les absorbàncies amb el lector de plaques (Elx800, BioTek, Winooski, USA) a una longitud d'ona de 570nm. La IC<sub>50</sub> de cada compost (concentració de droga necessària per reduir la viabilitat cel·lular en un 50%) es va establir mitjançant l'anàlisi de regressió no lineal amb ajust de corba amb el programa GraphPad Prism (Graph Padsoftware Inc., La Jolla, CA, USA). Es van fer tres rèpliques per a cada tractament, i cada compost es va testar en un mínim de tres assajos independents.

### 3.4 Activitat hemolítica

S'ha testat l'activitat hemolítica dels compostos per determinar la presència o absència d'efectes citotòxics enfront eritròcits humans.

Per això, es va preparar una suspensió d'eritròcits provinent de sang fresca humana al 5% vol/vol en PBS. Seguidament es va centrifugar la suspensió d'eritròcits a 6000 rcf durant 5 minuts, es va descartar el sobrenedant i es van fer tres rentats amb PBS. Es van barrejar 150 µL de la solució d'eritròcits amb 150 µL del compost (a una concentració final 100 µM) i es van incubar durant una hora a 37 °C amb agitació constant. En el control positiu es va emprar 0.2% Tritó X-100 en PBS, el qual provoca una hemòlisi completa dels eritròcits. En el control negatiu únicament es va afegir PBS. Posteriorment, les mostres es van centrifugar a 3500 rcf durant 10 minuts. Es va transferir 80 µL del sobrenedant a una placa de 96 pous i es van diluir amb 80 µL d'aigua milliQ estèril. Es va avaluar la presència d'hemoglobina en els sobrenadants, indicatiu de que s'ha produït hemòlisi, mesurant l'absorbància de les mostres en un lector de plaques (x800, BioTek, Winooski, USA) a una longitud d'ona de 540 nm. Es van fer tres rèpliques per cada compost testat.

El percentatge d'hemòlisi (H) respecte els eritròcits sense tractar (control negatiu), es va calcular de la següent manera:

$$H(\%) = 100 \cdot \frac{(O_c - O_b)}{(O_t - O_b)}$$

O<sub>c</sub>: Absorbància de cada tractament

O<sub>b</sub>: Absorbància del control negatiu

O<sub>t</sub>: Absorbància del control positiu

### **3.5 Assaig clonogènic**

L'eficàcia antitumoral dels compostos s'ha determinat mitjançant assaigs de clonogènia, els quals permeten establir si l'exposició als compostos afecta de forma irreversible la capacitat de les cèl·lules tumorals per dividir-se, és a dir, si inhibeixen la seva capacitat de formar clons.

Es van sembrar 200000 cèl·lules MCF-7/pou en plaques de 12 pous. 24 hores més tard, les cèl·lules es van tractar amb els lligands **1**, **2** i **5** a una concentració 10  $\mu$ M. En paral·lel, les cèl·lules es van tractar amb 10  $\mu$ M de Cisplatí com a control positiu. Es van exposar les cèl·lules als diferents tractaments durant 3 i 24 hores a 37 °C. A més, es van incubar les cèl·lules amb el compost **1** durant 3, 6, 12 i 24 hores a 37 °C per a determinar la cinètica d'activitat del compost. Com a control negatiu es van utilitzar cèl·lules sense tractar. Un cop finalitzat el corresponent tractament, es van fer rentats amb PBS, es van tripsinitzar les cèl·lules, i es van sembrar en plaques de 360-mm (3000 cèl·lules/placa). Es van incubar les plaques a 37 °C durant 7-10 dies, per permetre que les cèl·lules es dividissin i formessin colònies. Es van fixar i tenyir les colònies amb blau de metilè al 2 % en etanol al 50 %. Finalment, es va calcular el número de colònies de cada placa utilitzant el programa Alpha Innotech Imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA) i es va determinar el percentatge de colònies generades després dels tractaments respecte les cèl·lules no tractades. Es va definir una colònia com una agrupació mínima de 50 cèl·lules.

### **3.6 Anàlisi de l'activitat caspasa**

S'ha estudiat el tipus de mort cel·lular que indueixen els compostos més actius a través de l'anàlisi de l'activitat de les caspases 3 i 7 mitjançant el kit luminomètric Caspasa-Glo® 3/7 (Promega, Madison, WI, EEUU). Aquest estudi s'ha fet en

col·laboració amb el Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la salut (Dr. Priam Francesc de Vilallonga Smith) de la Universitat de les Illes Balears.

Per fer aquest estudi es va utilitzar un ampli panell de línies cel·lulars tumorals: Z-138, JURKAT, Jeko-1, Granta-519, SP-53, UPN-2, PC-3, LN-229, U87MG, CAPAN-1, 1BR3G i MCF-7. Les cèl·lules es van incubar amb els lligands **1**, **2** i **5** (10  $\mu$ M), o medi sol com a control, durant 48 hores, i posteriorment es va mesurar l'activitat caspasa 3 i 7 segons el protocol del kit, utilitzant el lector de plaques Synergy HT (Biotek).

### **3.7 Anàlisi del cicle cel·lular**

L'efecte dels compostos sobre la progressió del cicle cel·lular s'ha estudiat per citometria de flux utilitzant iodur de propidi com a marcador fluorescent del DNA. Aquest estudi s'ha fet en col·laboració amb el Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la salut (Dr. Priam Francesc de Vilallonga Smith) de la Universitat de les Illes Balears.

Per aquest experiment es van seleccionar les cèl·lules MCF-7 i LN229, les quals es van incubar amb els lligands **1**, **2** i **5** (10  $\mu$ M) durant 24 i 48 hores. Posteriorment, un cop rentades amb PBS i tripsinitzades, es van centrifugar les cèl·lules i es van fer rentats amb PBS fred. Seguidament es van fixar amb etanol al 70 % durant 30 minuts a 4 °C i es van fer 2 rentats amb PBS. Posteriorment es va tenyir el DNA amb Iodur de Propidi (50  $\mu$ g/ml) en presència de Ribunucleasa A (RNasa A) (50  $\mu$ g/ml). Finalment es van analitzar les cèl·lules tenyides mitjançant el citòmetre de flux FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU) amb el software WinMDI. Es van analitzar un mínim de 10000 cèl·lules per mostra.

### **3.8 Detecció d'Espècies Reactives d'Oxigen per citometria**

La capacitat dels compostos per induir la producció de ROS en cèl·lules canceroses humanes s'ha determinat per citometria de flux, mitjançant la sonda fluorescent diacetat 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceïna (H<sub>2</sub>DCF-DA, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA). Aquesta molècula travessa la membrana cel·lular gràcies al seu grup ester. Un cop dins la cèl·lula, aquesta és hidrolitzada per esterases, generant un compost que queda atrapat dins la cèl·lula (H<sub>2</sub>DCF). Aquest compost pot ser oxidat per ROS intracel·lulars, el que dona lloc a un compost fluorescent (DCF).

Es van sembrar cèl·lules MCF-7 i CAPAN-1 (50000 cèl·lules/pou) en plaques de 24 pous, en medi DMEM complet sense roig fenol 24 hores prèvies als tractaments. Posteriorment, es van incubar les cèl·lules amb 2.5, 5 o 10 µM dels compostos **1**, **2** i **5** en medi DMEM complet sense roig fenol durant 5 i 24 hores a 37 °C. En paral·lel, es van deixar dos pous sense tractar, els quals es van utilitzar com a controls (control sense sonda i control amb sonda). Un cop finalitzat el corresponent temps d'incubació, les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van incubar amb la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA a una concentració 1 µM en PBS durant 30 minuts a 37 °C protegides de la llum. Es van fer rentats amb PBS per eliminar la sonda del cultiu, es van tripsinitzar les cèl·lules i es van resuspendre amb medi DMEM complet sense roig fenol. Posteriorment, es van passar les cèl·lules a eppendorffs i es van fer dos rentats amb PBS mitjançant centrifugacions de 5 minuts a 2600 rpm a una temperatura de 4 °C. Finalment, es van resuspendre les cèl·lules en PBS i es van analitzar al citòmetre de flux FACS-CALIBUR (Becton-Dickinson®, Immunofluorometry Systems, Mountain View, CA). Es va determinar la mitjana geomètrica de la intensitat de fluorescència de 10000 cèl·lules amb el software CellQuest™ (Becton Dickinson). Es va establir l'increment de la fluorescència en les cèl·lules tractades respecte les no tractades (control amb sonda, fluorescència

basal), el que és proporcional a les ROS generades per cada compost. S'han fet un mínim de tres rèpliques per cada tractament.

### **3.9 Detecció d'Espècies Reactives d'Oxigen per microscòpia confocal**

Per confirmar l'activitat pro-oxidant dels compostos, la inducció de ROS s'ha determinat també a través de microscòpia confocal en cèl·lules MCF-7, mitjançant la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA.

Es van sembrar les cèl·lules (50000 cel/pou) amb medi DMEM complet sense roig fenol en plaques de 24 pous, on prèviament es van dipositar cobreobjectes estèrils. 24 més tard, es van incubar les cèl·lules amb els compostos **1**, **2** i **5** a una concentració 10 µM durant 24 hores a 37 °C. Es van deixar pous amb cèl·lules sense tractar com a controls (control sense sonda i control amb sonda). Un cop finalitzat el temps de tractament, es van fer rentats amb PBS fred i es van incubar les cèl·lules amb la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA a una concentració 1 µM en PBS durant 30 minuts a 37 °C protegides de la llum. Es van fer rentats amb PBS i es van incubar les cèl·lules amb paraformaldehid al 4% en PBS fred durant 15 minuts a 4 °C. A continuació es van fer rentats amb PBS fred i es van tenyir els nuclis cel·lulars amb Hoechst 33258 1:4000 en PBS durant 15 minuts a temperatura ambient. Finalment es van fer dos rentats amb PBS fred, es va fer el muntatge dels cobreobjectes en els portaobjectes amb el medi de muntatge fluorescent DAKO (Carpinteria, California, USA), i es van observar les cèl·lules al microscopi confocal (Nikon Eclipse Ti, Serveis Tècnics d'investigació de la Universitat de Girona) mitjançant el software NIS-Elements Advanced Research (Nikon, Japó).

### **3.10 Efecte de l'agent antioxidant N-Acetil-L-cisteïna en la producció d'Espècies Reactives d'Oxigen**

S'ha estudiat a través de citometria de flux l'efecte de l'agent antioxidant N-Acetyl-L-cisteïna (NAC, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en la producció de ROS induïda pels compostos en cèl·lules CAPAN-1 mitjançant la sonda fluorescent H<sub>2</sub>DCF-DA, sensible a l'oxidació.

Es van sembrar 50000 cèl·lules/pou en plaques de 24 pous, en medi DMEM complet sense roig fenol 24 hores prèvies als tractaments. Posteriorment, es van incubar les cèl·lules amb 10 µM dels compostos **1**, **2** i **5** en medi DMEM complet sense roig fenol durant 24 hores a 37 °C en presència / absència de NAC 5 mM. Es van rentar les cèl·lules amb PBS i es van incubar amb la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA a una concentració 1 µM en PBS durant 30 minuts a 37 °C protegides de la llum. Es van fer rentats amb PBS per eliminar la sonda del cultiu. Posteriorment, es van tripsinitzar les cèl·lules i es van resuspendre amb medi DMEM complet sense roig fenol. Es van passar a eppendorffs i es van fer dos rentats amb PBS mitjançant centrifugacions de 5 minuts a 2600 rpm a una temperatura de 4 °C. Finalment, es van resuspendre les cèl·lules en PBS i es van analitzar al citòmetre de flux FACS-CALIBUR (Becton-Dickinson®, Immunofluorometry Systems, Mountain View, CA) a través del canal FL1. Es va analitzar la mitjana geomètrica de la intensitat de fluorescència de 10000 cèl·lules amb el software CellQuest™ (Becton Dickinson). Es va establir l' increment de la fluorescència en les cèl·lules tractades respecte les no tractades (control amb sonda, fluorescència basal), el que és proporcional a les ROS generades per cada compost. S'han fet un mínim de tres rèpliques per cada tractament.

### **3.11 Efecte de l'agent antioxidant NAC en la viabilitat cel·lular**

S'ha analitzat l'efecte de l'agent antioxidant NAC sobre l'activitat citotòxica dels compostos **1**, **2** i **5**, per determinar si la reducció dels nivells de ROS generats pels compostos es relaciona amb una menor activitat citotòxica. Aquest estudi s'ha realitzat amb cèl·lules CAPAN-1, mitjançant l'assaig de citotoxicitat.

Es van sembrar 10000 cèl·lules/pou en medi DMEM complet en plaques de 96 pous i es van incubar durant 24 hores a 37 °C. Es van incubar les cèl·lules amb 5 µM del compost **2** o 10 µM del compost **1** o **5** en medi DMEM complet durant 24 hores a 37 °C en presència / absència de NAC a una concentració 5 mM. Es van utilitzar com a control cèl·lules sense tractar. Al cap de 48 hores, es van retirar els tractaments i es van fer dos rentats amb PBS. Seguidament, es va afegir medi fresc amb MTT a cada pou, seguint el protocol del punt 3.2. Es van fer tres rèpliques per a cada tractament, i cada compost es va testar en un mínim de tres assajos independents.

### **3.12 Capacitat dels lligands per unir-se al ferro**

S'ha estudiat si la generació de ROS induïda pels lligands **1**, **2** i **5** està associada a la gran capacitat d'aquests per coordinar-se al ferro, generant els corresponents complexos de ferro altament oxidants a l'interior de la cèl·lula.

Amb aquesta finalitat, es van determinar els nivells de ferro làbil dins les cèl·lules CAPAN-1 control i tractades amb els lligands, mitjançant la sonda Calceïna acetoximetil ester (Calcein-AM, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). La Calceïna-AM és una molècula permeable a la membrana cel·lular, la qual és ràpidament hidrolitzada al citosol per les esterases, generant-ne la molècula fluorescent Calceïna. La unió de la Calceïna a metalls, com el ferro, atenua aquesta fluorescència. Així doncs, l'increment de la fluorescència intracel·lular indica la



disminució dels nivells de ferro làbil intracel·lulars. Per altre banda, la disminució de la fluorescència intracel·lular indica un increment en els nivells de ferro làbil intracel·lulars.

Es van sembrar 50000 cèl·lules CAPAN-1/pou en medi DMEM complet en plaques de 24 pous i es van incubar durant 24 hores a 37 °C. Les cèl·lules es van tractar amb els lligands **1**, **2** o **5** a una concentració 10 µM en medi DMEM complet durant 24 hores a 37 °C. En paral·lel, un pou es va incubar amb 100 µM del clàssic agent quelant de ferro Deferoxamina (DFO) (en el que ha de disminuir el ferro làbil intracel·lular) i un altre pou es va incubar amb 100 µM de FeCl<sub>2</sub> (en el que ha d'augmentar el ferro làbil intracel·lular). Es va deixar un pou de cèl·lules sense tractar com a control (nivells basals de ferro intracel·lular). A continuació, es van fer rentats amb PBS i les cèl·lules es van incubar amb Calceïna-AM 0.25 µM durant 30 minuts a 37 °C protegides de la llum. Seguidament es van rentar les cèl·lules amb PBS, es van tripsinitzar, i es van resuspendre amb medi DMEM complet. Es van passar a eppendorfs i es van fer dos rentats amb PBS mitjançant centrifugacions de 5 minuts a 2600 rpm a una temperatura de 4 °C. Finalment, es van resuspendre les cèl·lules en PBS i es van analitzar al citòmetre de flux FACS-CALIBUR (Becton-Dickinson®, Immunofluorometry Systems, Mountain View, CA) a través del canal FL1. Es va analitzar la mitjana geomètrica de la intensitat de fluorescència de 10 000 cèl·lules amb el software CellQuest™ (Becton Dickinson). Es va establir l'increment de la fluorescència en les cèl·lules tractades respecte les no tractades, el que és proporcional a la davallada dels nivells de ferro làbil intracel·lular induïda per cada compost. S'han fet un mínim de tres rèpliques per cada tractament.

### 3.13 Efecte del ferro en la citotoxicitat dels lligands

S'ha determinat, mitjançant l'assaig MTT, si la disminució dels nivells de ferro làbil intracel·lular generada per l'activitat quelant dels lligands està lligada a l'activitat citotòxica d'aquests.

Es van sembrar 10000 cèl·lules CAPAN-1/pou o 6000 cèl·lules MCF-7/pou en medi DMEM complet en plaques de 96 pous i es van incubar durant 24 hores a 37 °C. Es van preincubar les cèl·lules amb les corresponents concentracions de FeCl<sub>2</sub> (0, 1, 10 o 100 μM) durant 2 hores. Posteriorment, es van fer rentats amb PBS, i es van incubar les cèl·lules amb 5 μM del compost **2** o 10 μM del compost **1** i **5** durant 48 hores a 37 °C. Paral·lelament, les cèl·lules es van coincubar amb les mateixes concentracions de FeCl<sub>2</sub> i els compostos **2** (5 μM), **1** o **5** (10 μM) durant 48 hores a 37 °C. Per altra banda, com a control, es van tractar les cèl·lules únicament amb FeCl<sub>2</sub> a les mateixes concentracions durant 48 hores a 37 °C. Posteriorment, es van retirar els diferents tractaments i es van fer dos rentats amb PBS. Seguidament, es va afegir medi fresc amb MTT a cada pou, seguint el protocol del punt 3.3 Es van fer tres rèpliques per a cada tractament, i cada compost es va testar en un mínim de tres assajos independents.

### 3.14 Efecte del ferro en l'activitat oxidativa dels lligands

Per estudiar l'efecte del ferro sobre l'activitat pro-oxidant del compost **2** en cèl·lules de càncer de pàncrees CAPAN-1, s'ha comparat l'activitat d'aquest compost en cèl·lules prèviament tractades amb FeCl<sub>2</sub> (per incrementar la siderèmia intracel·lular), en cèl·lules co-tractades amb el compost **2** i FeCl<sub>2</sub> al mateix temps, i en cèl·lules sense suplement de ferro; mitjançant la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA.

Es van sembrar les cèl·lules en plaques de 24 pous (50000 cèl·lules/pou), en medi DMEM complet sense roig fenol 24 hores prèvies als tractaments. Posteriorment, les cèl·lules es van incubar amb 10  $\mu\text{M}$  del compost **2** durant 24 hores, amb 10  $\mu\text{M}$  del compost **2** juntament amb 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_2$  durant 24 hores, o amb 10  $\mu\text{M}$  del compost **2** durant 24 hores després de pre-incubar les cèl·lules amb 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_2$  durant 2 hores. Tots els tractaments es van preparar en DMEM complet sense roig fenol. Un cop finalitzats els tractaments, es van rentar les cèl·lules amb PBS i es van incubar amb la sonda  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  1 $\mu\text{M}$  en PBS durant 30 minuts a la foscor. Es van rentar les cèl·lules amb PBS per eliminar la sonda, es van tripsinitzar i es van resuspendre amb medi DMEM complet sense roig fenol. Es van passar les cèl·lules a eppendorffs i es van fer dos rentats amb PBS centrifugant durant 5 minuts a 2600 rpm a 4 °C. Posteriorment, es van resuspendre les cèl·lules amb PBS i es van analitzar al citòmetre de flux FACS-CALIBUR (Becton-Dickinson®, Immunofluorometry Systems, Mountain View, CA) a través del canal FL1. Es va analitzar la mitjana geomètrica de la intensitat de fluorescència de 10000 cèl·lules amb el software CellQuest™ (Becton Dickinson). Es va establir l'increment de la fluorescència en les cèl·lules tractades respecte les no tractades, el que és proporcional a les ROS generades per cada compost. S'han fet un mínim de tres rèpliques per cada tractament.

### **3.15 Interacció amb el DNA plasmídic**

La capacitat d'interacció dels complexos de ferro **1-Fe**, **2-Fe** i **5-Fe** i els corresponents lligands (**1**, **2** i **5**) amb molècules de DNA s'ha determinat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa utilitzant DNA plasmídic.

Es va analitzar la capacitat dels compostos per induir canvis en la conformació del DNA i la seva activitat nucleasa, és a dir la seva capacitat produir talls en les cadenes de DNA. El plasmidi utilitzat en aquesta tècnica és el plasmidi pUC18, un plasmidi de doble cadena petit, de 2686 parells de bases. Aquest plasmidi presenta

la característica que el 90% d'aquest es troba en forma superenrotllada i el 10% restant en forma relaxada. Quan el compost talla el plasmidi per un sol punt, aquest passa de forma superenrotllada a forma relaxada. Per altra banda, si el compost talla les dues cadenes del plasmidi (dos punts molt propers), el plasmidi passa de forma superenrotllada a forma lineal. La forma que té major mobilitat és la forma superenrotllada, seguida de la forma lineal, i finalment, la circular (Hunniford et al. 2009).

El DNA plasmidi pUC18 es va utilitzar a una concentració 0.5 µg/µl . Es van preparar les diferents mostres (20 µl finals) afegint les corresponents solucions de compostos o lligands (25 µM) al plasmidi (concentració final 18.9 µM pb) en tampó Cacodilat (0.1 M, pH=6.0), en presència/absència de l'agent activador (1 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% p/v en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Per altra banda, per analitzar si l'activitat nucleasa dels complexos de ferro és específica per un determinat solc del DNA, el plasmidi es va incubar en presència dels lligands (15 µM), de l'agent activador (1 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% p/v en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i de Hoechst 33258 (40 µM) o verd metil (20 µM), els quals són bloquejadors del solc menor i solc major del DNA, respectivament. Finalment, per determinar si hi ha involucrats mecanismes oxidatius en l'activitat nucleasa dels lligands, el plasmidi es va incubar en presència dels lligands (15 µM), de l'agent activador (1 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% p/v en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i de diferents agents segrestadors de ROS (ROS scavengers): tiron (10 mM), el qual neutralitza el radical superòxid, el DMSO (3 µL), que neutralitza el radical hidroxil, i l'àcid sòdica (0.4 M), que neutralitza l'oxigen singlet.

Les mostres es van incubar durant 1 hora a 37 °C. Es van afegir 6 µl de tampó de càrrega (blau de bromofenol 0.25 %, xilè cianol 0.25 %, glicerol 30%) a cada mostra i es van fer córrer en un gel d'electroforesi 0,8 % agarosa en tampó TBE 0.5x (Tris 0.045 M, àcid bòric 0.045 M, EDTA 1 mM) durant 1h i 40 minuts a 100 V. Posteriorment es van tenyir les bandes de DNA amb bromur d'etidi (10 mg/ml en tampó TBE) durant 15 minuts i van observar al transiluminador. Les bandes es

van capturar amb el software ProgRes CapturePro versió 2.7. La intensitat de les bandes es va quantificar amb el software GelQuant versió 2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) utilitzant un factor de correcció de 1.31 per compensar la reduïda capacitat de la forma superenrotllada del plasmidi de DNA pUC18 per captar el bromur d'etidi (Q. Li, Browne, and Roelfes 2011).

### **3.16 Anàlisi del dany al DNA cel·lular**

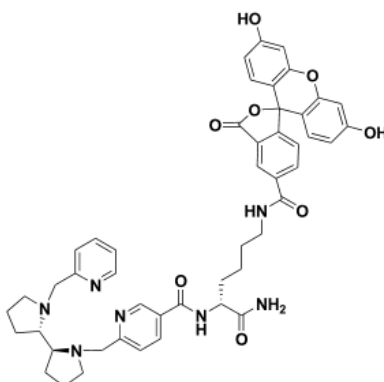
Per a determinar si l'activitat del compostos indueix dany al DNA cel·lular s'han quantificat els nivells d'histona H2AX fosforilada (pH2AX) mitjançant immunomarcatge amb l' anti-fosfo-histona p-H2AX (Ser139) per citometria de flux. La fosforilació de la serina 139 (ser139) de la histona H2AX és una de les respostes a les lesions de les cadenes de DNA (aparició de dobles talls) i es considera un biomarcador de dany en el DNA cel·lular ja que aquesta està involucrada en la detecció, el control del cicle cel·lular i la reparació del dany en el DNA cel·lular. La càrrega negativa aportada pel grup fosfat a la ser139 provoca la descondensació localitzada de la cromatina, essent més accessible pels factors i complexes enzimàtics involucrats en la reparació de les lesions al DNA (Rogakou et al. 1998; Ayoub et al. 2009; Burma et al. 2001). Aquest estudi s'ha fet en col·laboració amb el Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la salut (Dr. Priam Francesc de Vilallonga Smith) de la Universitat de les Illes Balears.

Es van tractar les cèl·lules de càncer de mama MCF-7 amb els lligands **1**, **2** i **5** (10 µM) durant 3, 5, 8 i 16 hores. Posteriorment es van tripsinitzar les cèl·lules, es van centrifugar i es van rentar amb PBS. Seguidament es van fixar les cèl·lules amb formaldehid al 3.7 % en PBS durant 15 minuts a 4 °C i es van permeabilitzar amb Tritó-X100 al 0.2 % v/v en PBS durant 10 minuts. Seguidament, les cèl·lules es van incubar amb l'anticòs de conill anti-p-H2AX(S139) (1:400) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) durant 30 minuts a 4 °C, es van rentar amb Tritó-X100 al 0.1 % v/v en PBS i es van incubar amb l'anticòs anti-conill conjugat al fluoròfor

Alexa Fluor 555 (1:400) (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK ) durant 30 minuts a 4 °C. Finalment es van rentar les cèl·lules i es van analitzar al citòmetre de flux FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

### 3.17 Internalització del lligand 1-CF per microscòpia confocal

S'ha avaluat la capacitat d' internalització i la localització del lligand **1** dins les cèl·lules per microscòpia confocal. Per això es va preparar un derivat del lligand **1** marcat amb fluoresceïna, **1-CF** (figura 2.2) (sintetitzat per la Dra. Marta Soler, del grup QBIS-CAT i LIPPSO de la Universitat de Girona).




---

**Figura 3.1. Estructura química del lligand 1 fluoresceïnat 1-CF.**

---

Prèviament, en plaques de 24 pous, es van sembrar 50000 cèl·lules MCF-7/ml sobre cobreobjectes tractats amb fibronectina (5 µg/ml) i es van deixar adherir durant 24 hores. Aquestes cèl·lules es van tractar amb el lligand **1-CF** (50 µM) durant 0, 1, 3 i 6 hores a una temperatura de 37 °C. Posteriorment, es van fer rentats amb PBS i es van fixar les cèl·lules amb paraformaldehid al 4% en PBS fred durant 15 minuts a 4 °C. A continuació es van fer rentats amb PBS fred i es van teñir els nuclis cel·lulars amb Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1:4000 (excitació/emissió: 352 nm/461 nm) en PBS durant 15 minuts a

temperatura ambient. Finalment es van fer dos rentats amb PBS fred, es va fer el muntatge dels cobreobjectes en els portaobjectes amb el medi de muntatge fluorescent DAKO (Carpinteria, California, USA), i es van observar les cèl·lules al microscopi confocal (Nikon Eclipse Ti, Serveis Tècnics d'investigació de la Universitat de Girona) mitjançant el software NIS-Elements Advanced Research (Nikon, Japó).

### **3.18 Quantificació de la internalització del lligand 1-CF per citometria de flux**

La internalització del lligand **1** marcat amb fluoresceïna **1-CF** en cèl·lules tumorals s'ha quantificat per citometria de flux.

En plaques de 24 pous, es van sembrar 50000 cèl·lules MCF-7 o CAPAN-1/ml i es van incubar durant 24 hores. Les cèl·lules es van tractar amb el lligand **1-CF** (50  $\mu$ M) durant 0, 1, 3 i 6 hores a una temperatura de 37 °C. Posteriorment, es van rentar les cèl·lules amb PBS fred i es van tripsinitzar. Finalment les cèl·lules es van rentar, es van resuspendre en PBS fred i es va analitzar la fluorescència de les cèl·lules de les diferents mostres al citòmetre de flux FACS-Calibur (Becton-Dickinson®, Immunofluorometry Systems, Mountain View, CA). Es va analitzar la mitjana geomètrica de la intensitat de fluorescència de 10 000 cèl·lules amb el software CellQuest™ (Becton-Dickinson®). Es van fer un mínim de tres rèpliques per cada tractament.

### **3.19 Anàlisi isobologràfic de la combinació de drogues**

S'ha estudiat la interacció entre el lligand **1** i la doxorubicina mitjançant el mètode isobologràfic descrit per Berenbaum (Berenbaum 1989).

En aquest mètode es representa a l'eix horitzontal la concentració d'un agent (da) que produeix l'efecte desitjat, i a l'eix vertical, la concentració de l'altre agent (db) que produeix el mateix efecte. Es traça una línia que uneix aquests 2 punts, la qual representa zero interacció (línia d'additivitat). A continuació es representen els valors de les concentracions dels agents combinats (DA, DB) que són isoeffectives amb les dosis individuals. Quan els punts que representen les dosis isoeffectives de la combinació es situen per sobre de la línia d'additivitat, hi ha efecte antagonístic. Per contra, quan els punts es situen per sota, hi ha efecte supra-additiu o sinergisme. Per altra banda, quan hi ha additivisme, els punts es situen a la línia d'additivitat.

L'índex d'interacció es calcula amb la següent equació:

$$I = (DA/da) + (DB/db)$$

On da i db representen les concentracions del lligand **1** i doxorubicina necessàries per produir l'efecte desitjat, i DA i DB representen les concentracions del lligand **1** i doxorubicina que administrades en combinació produeixen el mateix efecte. Quan l'índex d'interacció és inferior a 1 indica que hi ha un efecte sinèrgic, quan l'índex d'interacció és igual a 1 indica que hi ha un efecte additiu, i finalment, quan l'índex d'interacció és superior a 1 indica que hi ha un efecte antagonístic. Es van fer tres rèpliques per a cada tractament, i es van fer un mínim de tres assajos independents.

### 3.20 Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic s'ha dut a terme amb el programa estadístic SPSS (versió 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les variables quantitatives s'han representat com a mitjana i desviació estàndard (SD). La normalitat de les dades s'ha analitzat mitjançant el test Shapiro-Wilk. Les diferències entre dades que presenten una distribució normal i homogeneïtat de variàncies s'han analitzat mitjançant el test paramètric t-Student. S'han considerat significatius p-valors < 0.05.









## 4.1. Anàlisi de la citotoxicitat dels compostos en cèl·lules tumorals

Es va avaluar l'activitat biològica de diferents compostos metàl·lics i els corresponents lligands (sintetitzats pel grup de Química Bioinspirada, Supramolecular i Catàlisi (QBIS-CAT) de la Universitat de Girona com a possibles agents antitumorals. Aquests compostos presenten la característica d'estabilitzar intermedis altament oxidants i catalitzar l'oxidació de substrats orgànics. Els elevats nivells de ROS que presenten gran part de les cèl·lules tumorals, en comparació amb les cèl·lules sanes, serien una possible diana, doncs, per aquests agents ja que serien permetrien la formació d'espècies altament oxidants *in situ*, dins les cèl·lules tumorals.

### 4.1.1 Anàlisi de la citotoxicitat dels complexos de Fe(II), Mn(II), Cu(II) i Co(II) i els respectius lligands enfront cèl·lules tumorals humanes

La primera fase de l'estudi es va centrar en l'anàlisi de l'activitat citotòxica de diferents famílies de lligands (**1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **9**, **10**, **11** i **12**) i els corresponents complexos de **Fe(II)**, **Mn(II)**, **Cu(II)** i **Co(II)**. L'estudi es va realitzar en dues línies cel·lulars tumorals humanes, MCF-7 i CAPAN-1, amb la finalitat de fer un cribratge i seleccionar només els més interessants per a, posteriorment, caracteritzar la seva activitat biològica.

En el cas dels complexos de **Fe(II)**, la majoria dels compostos assajats presentaven una baixa activitat citotòxica o fins i tot, no eren actius ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) (Taula 4.1). Només quatre complexos de ferro presentaven una activitat citotòxica mesurable en cèl·lules MCF-7 ( $IC_{50}$  **1-Fe**:  $17.5 \pm 0.9 \mu M$ ,  $IC_{50}$  **3-Fe**:  $63.5 \pm 2.1 \mu M$ ,  $IC_{50}$  **4-Fe**:  $73.5 \pm 0.7 \mu M$  i  $IC_{50}$  **7-Fe**:  $23 \pm 2.6 \mu M$ ), mentre que únicament el complex **7-Fe** era actiu en cèl·lules CAPAN-1 ( $IC_{50}$  **7-Fe**:  $23.1 \pm 1.5 \mu M$ ). El complex **7-Fe**, doncs,

era l'únic compost de ferro que presentava activitat antitumoral en ambdues línies cel·lulars. Tot i això, aquest compost es va desestimar per a posteriors anàlisis degut a la insolubilitat del corresponent lligand (**7**), fet que impossibilitava la caracterització de la seva activitat biològica. Igualment, els lligands **6** i **8** i els compostos metàl·lics **11-Fe** i **11-Mn** van presentar problemes de solubilitat que van impedir la seva caracterització. Així doncs, la família dels lligands **6**, **7**, **8** i **11** i els corresponents compostos metàl·lics quedaven exclosos de l'estudi.

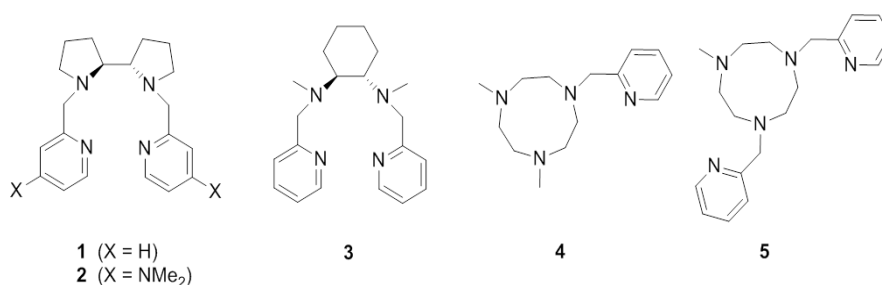
Respecte els complexos de **Mn(II)**, la majoria d'ells presentava activitat citotòxica. Les  $IC_{50}$  dels complexos de manganès **1-Mn**, **2-Mn**, **3-Mn**, **4-Mn**, **6-Mn**, **7-Mn** i **8-Mn** en cèl·lules MCF-7 eren de  $12.2 \pm 1 \mu\text{M}$ ,  $3.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ,  $23.3 \pm 3.8 \mu\text{M}$ ,  $25 \pm 7.1 \mu\text{M}$ ,  $6.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ,  $3.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$  i  $25 \pm 1.2 \mu\text{M}$ , respectivament; i en cèl·lules CAPAN-1 de  $18.1 \pm 1.3 \mu\text{M}$ ,  $5.4 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ,  $26.3 \pm 2.7 \mu\text{M}$ ,  $>100 \mu\text{M}$ ,  $14 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ,  $20.8 \pm 1.9 \mu\text{M}$  i  $21.5 \pm 2.3 \mu\text{M}$ , respectivament. Tots ells eren actius, a excepció del compost **4-Mn** en cèl·lules CAPAN-1 (Taula 4.1).

Per contra, cap dels compostos de **Cu(II)** i **Co(II)** testats presentaven activitat citotòxica, ja que els valors de  $IC_{50}$  eren superiors a  $100 \mu\text{M}$  en tots els casos.

Finalment, es va estudiar els lligands sense complexar amb el metalls. De forma sorprenent, 6 dels 9 lligands estudiats van demostrar tenir activitat citotòxica, en especial els lligands **1** ( $IC_{50}$  en MCF-7:  $7.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$  i  $IC_{50}$  en CAPAN-1:  $9.9 \pm 1.01 \mu\text{M}$ ), **2** ( $IC_{50}$  en MCF-7:  $3.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$  i  $IC_{50}$  en CAPAN-1:  $6 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ) i **5** ( $IC_{50}$  en MCF-7:  $7.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$  i  $IC_{50}$  en CAPAN-1:  $7.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ), amb valors de  $IC_{50}$  molt baixos en ambdues línies cel·lulars, que van resultar similars als del cisplatí ( $2.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$  en MCF-7 i  $2.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$  en CAPAN-1). Per altra banda, els lligands **3**, **4** i **10** presentaven uns valors de  $IC_{50}$  més elevats, essent en la línia cel·lular MCF-7 de  $40.6 \pm 2.5 \mu\text{M}$ ,  $88.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$  i  $17.5 \pm 1.2 \mu\text{M}$ , respectivament, i en la línia cel·lular CAPAN-1 de  $27.7 \pm 2.9 \mu\text{M}$ ,  $32 \pm 10.4 \mu\text{M}$  i  $14.8 \pm 1.3 \mu\text{M}$ , respectivament. Per contra, els lligands **9**, **11** i **12** no presentaven activitat citotòxica, amb uns valors de  $IC_{50} < 100 \mu\text{M}$  en ambdues línies cel·lulars (taula 4.1).

Així doncs, després de l'*screening* general d'un total de 35 compostos agrupats en 12 famílies, de les quals 4 famílies es van descartar per problemes de solubilitat d'algun dels seus membres, es va determinar que principalment 6 lligands i alguns dels seus complexos de manganès tenien una activitat citotòxica rellevant. En el cas dels complexos de Mn, els valors de IC<sub>50</sub> obtinguts són similars a la dels corresponents lligands. En el cas dels complexos de Ferro, només **1-Fe** va demostrat tenir una activitat citotòxica interessant.

En base a aquests resultats, ens va semblar interessant centrar els propers estudis en els lligands **1**, **2**, **3**, **4** i **5** (figura 4.1) per a caracteritzar la seva activitat biològica. Els seus corresponents complexos de Fe (II), **1-Fe** ([Fe(OTf)<sub>2</sub>(bpbp)]), **2-Fe** ([Fe(OTf)<sub>2</sub>-(NMe<sub>2</sub>-bpbp)]), **3-Fe** ([Fe(OTf)<sub>2</sub>(mcp)] i **4-Fe** ([Fe(OTf)<sub>2</sub>(Me<sub>2</sub>Pytacn)]), se sap que presenten una potent activitat en catàlisi d'oxidacions. Per altra banda, el compost **5-Fe** ([Fe(OTf)<sub>2</sub>(MePytacn)(CH<sub>3</sub>CN)]), se sap que estableix elevats estats d'oxidació del ferro (Costas and Que 2002; Cusso et al. 2013; Company et al. 2014; Chen MS 2007; Canta et al. 2014; Company et al. 2007).



**Figura 4.1. Estructures dels lligands 1, 2, 3, 4 i 5.**

**Taula 4.1. Citotoxicitat dels compostos de Fe (II), Mn (II), Cu (II) i Co (II), els seus corresponents lligands i el cisplatí enfront les cèl·lules tumorals MCF-7 i CAPAN-1.**

IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µM)	MCF-7						CAPAN-1					
	Metall						Metall					
	Ø	Fe (II)	Mn (II)	Cu (II)	Co (II)	Ø	Fe (II)	Mn (II)	Cu (II)	Co (II)		
<b>1</b>	7.4 ± 0.2	17.5 ± 0.9	12.2 ± 1	nd	nd	9.9 ± 1.01	>100	18.1 ± 1.3	nd	nd		
<b>2</b>	3.7 ± 0.4	>100	3.9 ± 0.2	nd	nd	6.0 ± 0.7	>100	5.4 ± 0.8	nd	nd		
<b>3</b>	40.6 ± 2.5	63.5 ± 2.1	23.3 ± 3.8	nd	>100	27.7 ± 2.9	>100	26.3 ± 2.7	nd	>100		
<b>4</b>	88.5 ± 0.7	73.5 ± 0.7	25 ± 7.1	>100	nd	32.0 ± 10.4	>100	>100	>100	nd		
<b>5</b>	7.7 ± 0.3	>100	nd	nd	nd	7.9 ± 0.5	>100	nd	nd	nd		
<b>6</b>	*	>100	6.8 ± 0.7	nd	nd	*	>100	14 ± 0.7	nd	nd		
<b>7</b>	*	23 ± 2.6	3.8 ± 0.4	nd	nd	*	23.1 ± 1.5	20.8 ± 1.9	nd	nd		
<b>8</b>	*	>100	25 ± 1.2	nd	nd	*	>100	21.5 ± 2.3	nd	nd		
<b>9</b>	>100	>100	>100	>100	nd	>100	>100	>100	>100	nd		
<b>10</b>	17.5 ± 1.2	nd	nd	nd	nd	14.8 ± 1.3	nd	nd	nd	nd		
<b>11</b>	>100	*	*	nd	nd	>100	*	*	nd	nd		
<b>12</b>	>100	>100	nd	nd	nd	>100	>100	nd	nd	nd		
<b>Cisplatí</b>	2.4 ± 0.4						2.2 ± 0.3					

<sup>a</sup>Els valors de IC<sub>50</sub> s'han determinat mitjançant l'assaig colorimètric MTT 48 hores després de l'exposició al tractament. Les dades representen la mitjana ± SD de, almenys, tres experiments independents amb les seves corresponents rèpliques. \* No dissolts (aigua 10% DMSO). Compostos no disponibles: nd.

### 4.1.2 Anàlisi de l'activitat citotòxica dels lligands 1, 2, 3, 4 i 5 enfront un panell de cèl·lules tumorals i cèl·lules sanes

Per a caracteritzar millor la capacitat citotòxica dels lligands **1, 2, 3, 4 i 5**, es va determinar la seva  $IC_{50}$  en una selecció més àmplia de línies cel·lulars tumorals (cèl·lules PC-3, Z-138 i JURKAT) i no tumorals (cèl·lules 1BR3G i CCD-18Co).

Els resultats van mostrar que el lligand **2** era el més actiu enfront cèl·lules tumorals assajades, amb valors de  $IC_{50}$  de  $3.7 \pm 0.4$  a  $7.2 \pm 1.9 \mu\text{M}$ . També presentaven uns valors de  $IC_{50}$  baixos el lligand **1** (de  $4.8 \pm 1.2$  a  $15.1 \pm 3.1 \mu\text{M}$ ) i el lligand **5** (de  $2.9 \pm 0.4$  a  $7.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ). Els lligands **3** i **4**, en canvi, tenien una activitat citotòxica moderada (valors de  $IC_{50}$  de  $16.5 \pm 1.4 \mu\text{M}$  a  $>100 \mu\text{M}$  i de  $23.1 \pm 1.8 \mu\text{M}$  a  $>100 \mu\text{M}$ , respectivament) (taula 4.2). No es va observar una activitat selectiva dels lligands enfront una línia tumoral concreta.

**Taula 4.2. Citotoxicitat dels lligands 1, 2, 3, 4 i 5 en les cèl·lules tumorals humanes MCF-7, CAPAN-1, PC-3, Z-138 i JURKAT, i en cèl·lules no tumorals 1BR3G i CCD-18Co. Activitat hemolítica a 100  $\mu\text{M}$ .**

Línia cel·lular	1	2	3	4	5
MCF-7	$7.4 \pm 2$	$3.7 \pm 0.4$	$40.6 \pm 2.5$	$88.5 \pm 0.7$	$7.7 \pm 0.3$
CAPAN-1	$9.9 \pm 1.0$	$6 \pm 0.7$	$27.7 \pm 2.9$	$32 \pm 10.4$	$7.9 \pm 0.5$
PC-3	$8.5 \pm 1.4$	$3.8 \pm 0.2$	$35.0 \pm 4.2$	$>100$	$7.7 \pm 0.3$
Z-138	$4.8 \pm 1.2$	$4.4 \pm 0.3$	$16.5 \pm 1.4$	$23.1 \pm 1.8$	$2.9 \pm 0.4$
JURKAT	$15.1 \pm 3.1$	$7.2 \pm 1.9$	$>100$	$>100$	$5.4 \pm 1.3$
1BR3G	$12.7 \pm 1.6$	$7.5 \pm 0.5$	$45.0 \pm 1.0$	$78.0 \pm 8.5$	$18.0 \pm 4.2$
CCD-18Co	$27.0 \pm 4.4$	$20.7 \pm 0.3$	$>100$	$>100$	$53.5 \pm 3.5$
Hemòlisi <sup>b</sup> (%)	0	0	0	0	0

<sup>a</sup>Els valors de  $IC_{50}$  s'han determinat mitjançant l'assaig colorimètric MTT 48 hores després de l'exposició al tractament. Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD de, almenys, tres experiments independents amb les seves corresponents rèpliques. <sup>b</sup>Percentatge d'hemòlisi a 100  $\mu\text{M}$ .

Són interessants els valors de citotoxicitat dels lligands obtinguts en cèl·lules no tumorals, especialment en la línia de fibroblastes humans CCD-18Co, ja que tots els lligands presentaven valors de  $IC_{50}$  superiors als obtinguts en cèl·lules tumorals, indicant una menor citotoxicitat dels lligands en aquesta línia no



tumoral. Per contra, en el cas de les cèl·lules 1BR3G només el lligand **5** va presentar menor citotoxicitat. Com s'explica a la discussió, aquestes diferències podrien estar relacionades amb les característiques de les dues línies cel·lulars no canceroses utilitzades en l'estudi.

També es va determinar si els compostos presentaven activitat hemolítica, és a dir, si presentaven activitat lítica sobre els glòbuls vermells, com a marcador de possible toxicitat *in vivo*. De forma interessant, els resultats van demostrar que cap dels lligands assajats són hemolítics (taula 4.2).

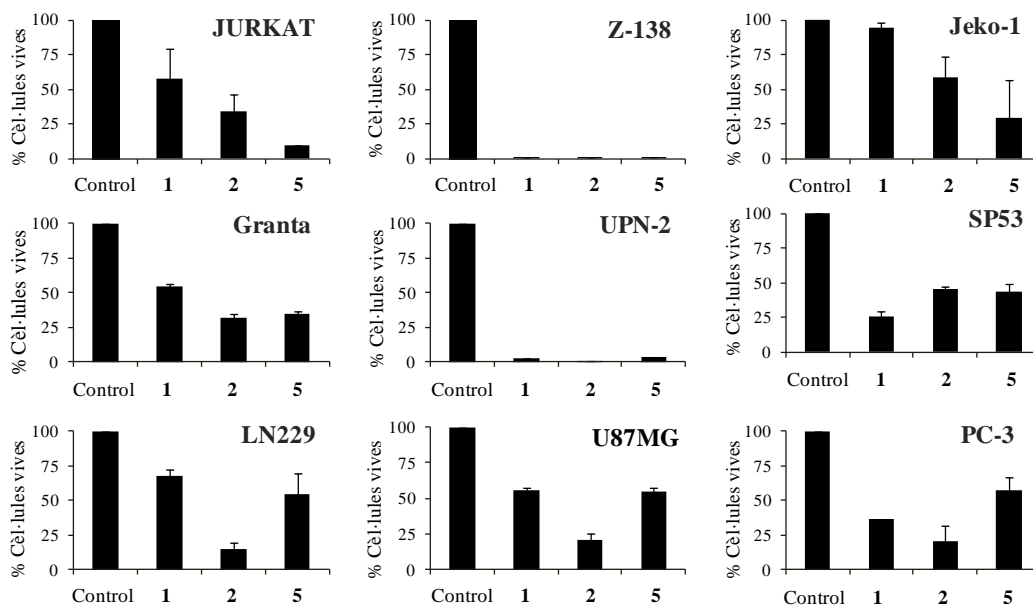
En base a aquests resultats, es van seleccionar els lligands **1**, **2** i **5**, amb una potent activitat citotòxica, pels posteriors estudis.

### **4.1.3 Anàlisi de la citotoxicitat dels lligands enfront cèl·lules de leucèmia, limfoma i glioma**

Es va ampliar l'anàlisi de l'activitat citotòxica dels lligands **1**, **2** i **5**, enfront cèl·lules tumorals de leucèmia, limfoma i glioma. En concret, es van analitzar els efectes citotòxics dels compostos a una concentració 10  $\mu$ M durant 48 hores mitjançant el mètode colorimètric MTT.

Es va veure que aquests lligands presentaven una elevada activitat antiproliferativa enfront la majoria de les línies cel·lulars assajades, demostrant que són agents antitumorals àmpliament actius. En concret, a una concentració 10  $\mu$ M durant 48 hores, el lligand **1** promovia la mort de més del 50 % de les cèl·lules Z-138, UPN-2, SP53 i PC-3; el lligand **2** promovia la mort de més del 50 % de les cèl·lules JURKAT, Z-138, Granta, UPN-2, SP53, LN229, U87MG i PC-3; i el lligand **5** promovia la mort de més del 50 % de les cèl·lules JURKAT, Z-138, Jeko-1, Granta, UPN-2 i SP53. Així doncs, els lligand **2** presentava una activitat citotòxica interessant a la concentració assajada en totes les línies cel·lulars testades, essent més baixa aquesta activitat en les cèl·lules de limfoma no-Hodgkin's Jeko-1. El lligand **5**, es va veure que era més actiu en les cèl·lules T de leucèmia limfoide

JURKAT i en totes les línies cel·lulars de limfoma no-Hodkin assajades. Per contra, el lligand **1** no presentava especificitat per a cap línia cel·lular en concret. Curiosament, les línies cel·lulars de limfoma no-Hodgkin Z-138 i UPN-2 són molt sensibles enfront els tres lligands (figura 4.2).



**Figura 4.2.** Activitat citotòxica dels lligands **1**, **2** i **5** enfront un panell de línies cel·lulars tumorals humanes (JURKAT, Z-138, Jeko-1, Granta, UPN-2, SP53, LN229, U87MG i PC3). Les cèl·lules es van incubar durant 48 hores amb els lligands **1**, **2** i **5** (10  $\mu$ M) i posteriorment es va mesurar la viabilitat cel·lular amb el mètode colorimètric MTT. Les dades mostren el percentatge de cèl·lules vives en relació a les cèl·lules sense tractar (control). Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD de tres experiments independents amb les seves corresponents rèpliques.

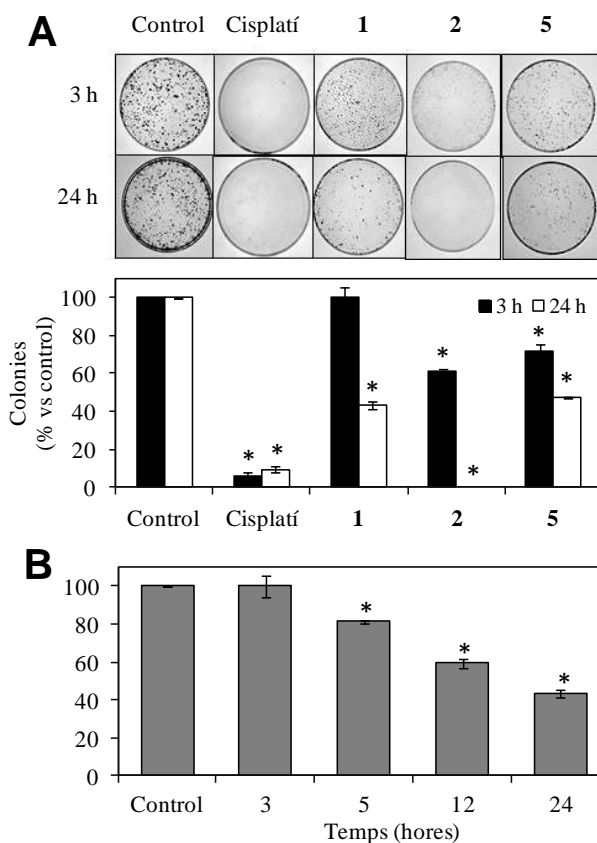
#### 4.1.4 Anàlisi de la capacitat dels lligands per inhibir la clonogeneïtat de les cèl·lules tumorals

Els assaigs de clonogènia permeten avaluar si les cèl·lules són capaces de formar colònies després d'estar exposades a un tractament, és a dir, avaluar si un compost genera un dany irreparable a la cèl·lula, el qual inhibeix la seva capacitat de dividir-se. Així doncs, es va analitzar la capacitat dels compostos **1**, **2** i **5** (10  $\mu$ M)

per inhibir la capacitat de formar colònies de les cèl·lules MCF-7 després d'una exposició de 3 o 24 hores. En paral·lel, les cèl·lules es van tractar amb cisplatí, com a control positiu.

L'anàlisi de les colònies va revelar un marcat efecte inhibidor del compost **2** ja que només amb 3 hores de tractament, el número de colònies generades es va reduir significativament un 39% comparat amb el control, a diferència del tractament amb el compost **5**, on el nombre de colònies només disminuïa un 28%; i amb el compost **1**, on el nombre de colònies no es veia alterat (figura 4.3 A). Quan les cèl·lules es van incubar amb el compost **2** durant 24 hores, la capacitat d'aquestes per formar colònies es va veure pràcticament anul·lada (0% de cèl·lules viables), indicant una elevada activitat inhibidòria, inclòs superior a la obtinguda pel cisplatí (aproximadament el 9,1 % de cèl·lules viables) (figura 4.3 A). Per altra banda, es va veure que exposant les cèl·lules MCF-7 als compostos **1** i **5** durant 24 hores, es reduïa el nombre de colònies significativament un 57% i un 53% respectivament, comparat amb el control (figura 4.3 A). L'elevada activitat inhibidòria del compost **2** en comparació amb els compostos **1** i **5**, concorda amb l'elevada activitat antiproliferativa dels compostos observada en els experiments de citotoxicitat en aquesta línia cel·lular.

Els resultats també van mostrar que el nombre de colònies es redueix de manera "temps-depenent" durant les 24 hores de tractament amb el compost **1**. En concret, a les 3, 5, 12 i 24 hores de tractament, el nombre de colònies es veia reduït un 0%, 18.7%, 40.5% i 56.6% respectivament, comparat amb el control, el que indica que aquest lligand desencadena un mecanisme de mort cel·lular que requereix hores per arribar al màxim efecte (figura 4.3 B).



**Figura 4.3. Assaig clonogènic.** Capacitat de les cèl·lules MCF-7 per formar colònies després de l'exposició als lligands **1**, **2** i **5**. **(A)** Colònies formades després d'exposar les cèl·lules als lligands **1**, **2** i **5** (10  $\mu$ M) durant 3 i 24 hores. S'ha inclòs el cisplatí com a control positiu. **(B)** Colònies formades després d'exposar les cèl·lules al lligand **1** (10  $\mu$ M) durant diferents temps (3, 5, 12 i 24 hores). Els gràfics de barres representen el percentatge de colònies respecte les cèl·lules control. Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD de, almenys, tres experiments independents. \* $p < 0.05$  versus cèl·lules control.

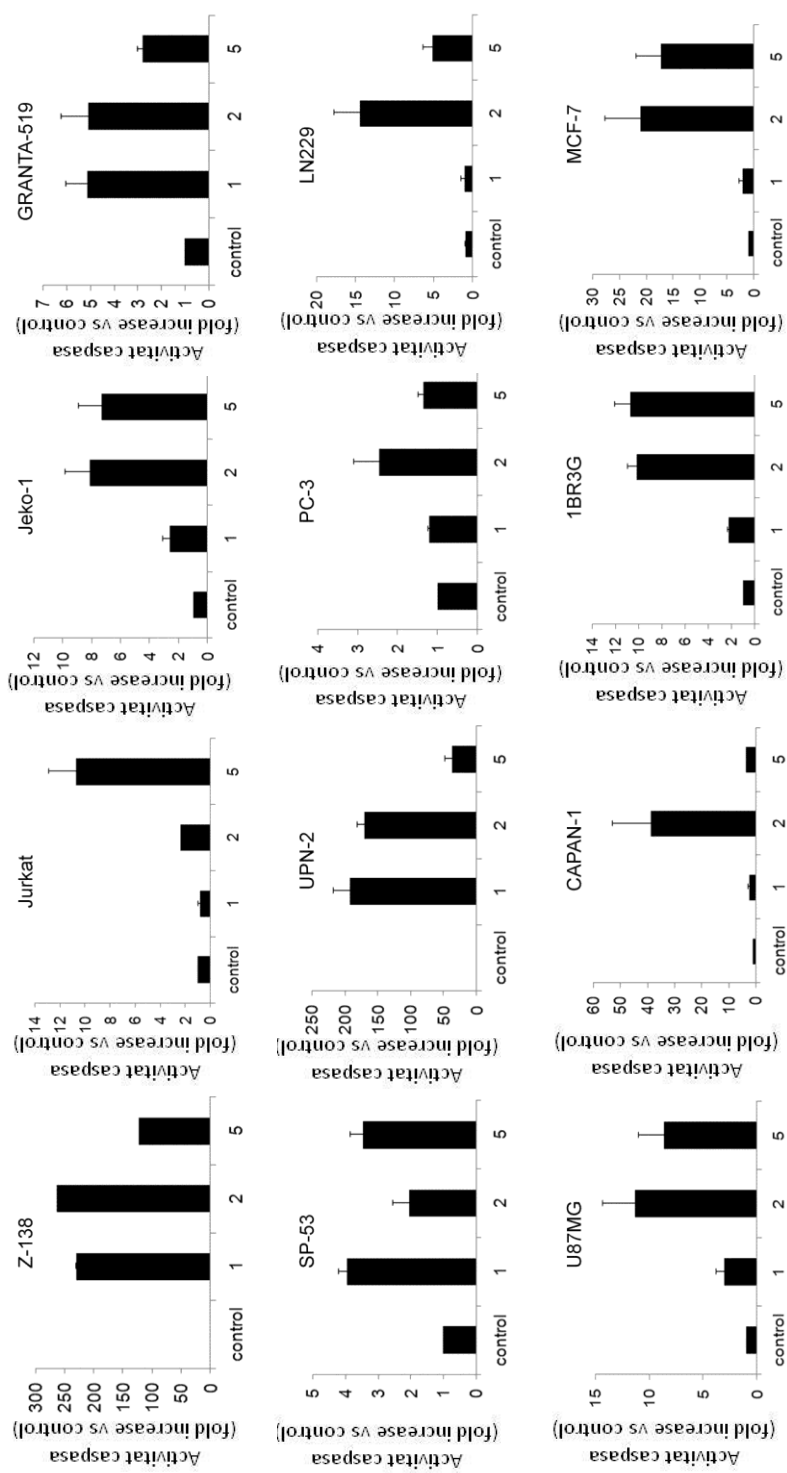
#### 4.1.5 Estudi del mecanisme de mort cel·lular induïda pels compostos **1**, **2** i **5**

Les caspases són proteïnes proapoptòtiques que intervenen en l'apoptosi (mort cel·lular programada). Aquestes es poden dividir en dos grups, les caspases iniciadores (caspasa-8 i caspasa-9), les quals tenen com a funció activar les

caspases efectores, i les caspases efectores (caspasa-3, caspasa-6 i caspasa-7), responsables de degradar diversos substrats intracel·lulars i desencadenar la mort cel·lular (Hanahan and Weinberg 2011).

Es va determinar si el tractament amb els lligands **1**, **2** i **5** a una concentració 10  $\mu$ M durant 48 hores induïen la mort cel·lular a través de l'apoptosi mesurant l'activitat de les caspases efectores caspasa-3 i caspasa-7 mitjançant l'assaig luminescent Caspasa-Glo<sup>®</sup>3/7 en un panell de línies cel·lulars canceroses humanes.

Es va veure que el lligand **2** augmentava l'activitat de les caspases 3 i 7 (més del doble respecte el control) en totes les línies cel·lulars. Per altra banda, el lligand **5** també incrementava l'activitat caspasa en la majoria de les línies cel·lulars analitzades (més de tres vegades respecte el control). El lligand **1**, en canvi, incrementava aquesta activitat (més del doble respecte el control) en totes les cèl·lules de limfoma no-Hodgkin's assajades, les cèl·lules de glioma U87MG i les cèl·lules CAPAN-1, MCF-7 i 1BR3G (figura 4.4). L'activitat caspasa es veia intensament incrementada (fins a 200 cops respecte el control) en cèl·lules de limfoma no-Hodgkin's Z-138 i UPN-2. Aquests resultats indiquen que l'activitat citotòxica del lligand **2** va lligada a la inducció de l'apoptosi, i que aquest mecanisme de mort cel·lular també és majoritari pels lligands **1** i **5** en les línies cel·lulars assajades.

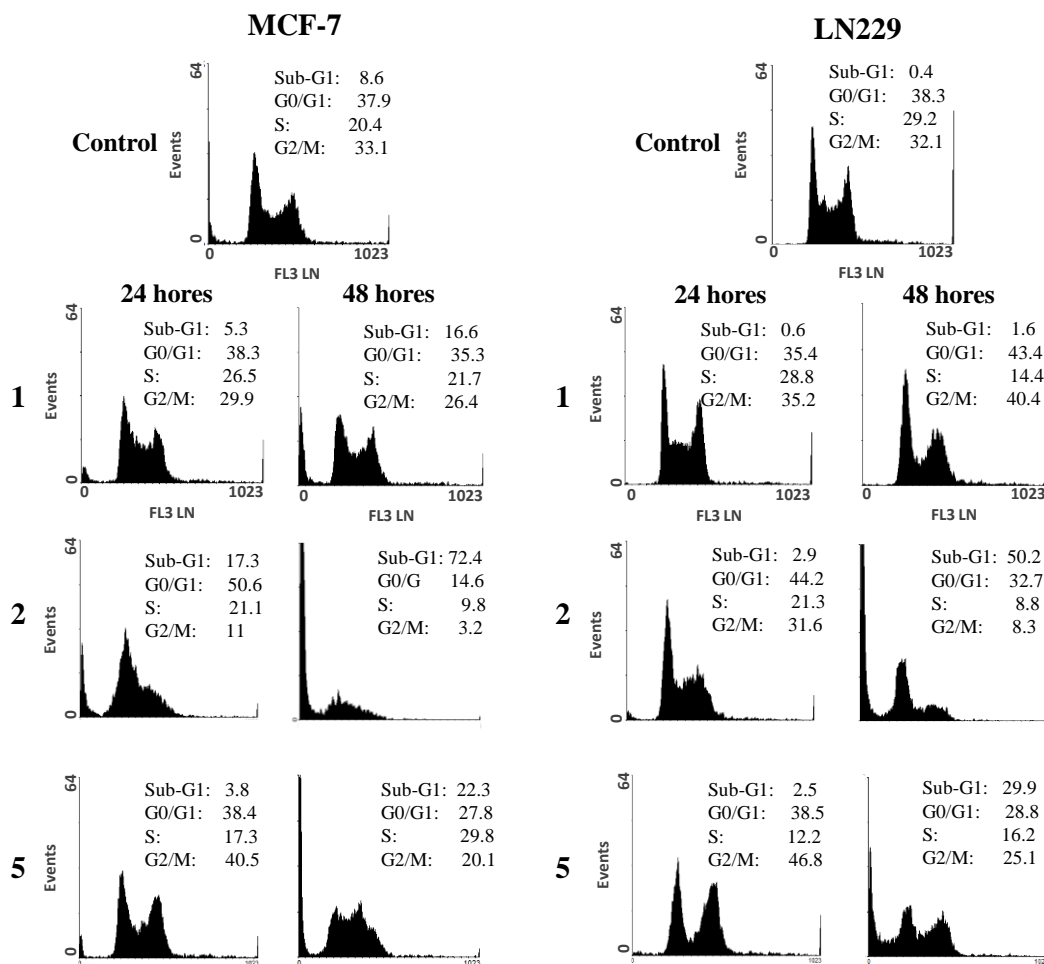


**Figura 4.4. Inducció de l'activitat caspasa.** Les cèl·lules es van incubar amb 10  $\mu$ M dels compostos 1, 2 i 5 durant 48 hores i, posteriorment, es va mesurar l'activitat caspasa 3/7. Als gràfics es mostra l'increment de l'activitat caspasa induït pels compostos en relació a les cèl·lules sense tractar (control). Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD de, almenys, tres experiments independents.

#### **4.1.6 Efecte dels lligands 1, 2 i 5 sobre el cycle cel·lular**

Es va analitzar l'efecte dels lligands **1**, **2** i **5** sobre la progressió del cycle cel·lular mitjançant iodur de propidi per citometria de flux. Es van incubar les cèl·lules MCF-7 i LN229 amb els lligands (10  $\mu\text{M}$ ) durant 24 i 48 hores i seguidament es va examinar la distribució del cycle cel·lular.

En ambdues línies cel·lulars es va veure que el lligand **2** incrementava la proporció de cèl·lules en fase G0/G1 a les 24 hores, seguit d'un augment de la població sub-G1 (cèl·lules apoptòtiques) a les 48 hores. El lligand **1**, en canvi, només provocava efectes evidents a les 48 hores, incrementant lleugerament la població de cèl·lules apoptòtiques en la línia cel·lular MCF-7 i reduint la població de cèl·lules en fase S en la línia cel·lular LN229. Per altra banda, el lligand **5** induïa una parada del cycle cel·lular a la fase G2/M a les 24 hores en ambdues línies cel·lulars, i un augment de la població de cèl·lules apoptòtiques a les 48 hores (figura 4.5). Aquests resultats concorden amb els resultats de l'activitat caspasa obtinguts en aquestes línies cel·lulars en els assajos anteriors, on l'activitat caspasa es veia incrementada quan ambdues línies cel·lulars s'incubaven a una concentració 10  $\mu\text{M}$  durant 48 hores amb els lligands **2** i **5**, i lleugerament incrementada quan s'incubaven amb el lligand **1** (figura 4.4).



**Figura 4.5. Efecte dels lligands 1, 2 i 5 sobre el cicle cel·lular.** Cèl·lules MCF-7 (esquerre) i LN229 (dreta) sense tractar (a dalt) o tractades amb els lligands 1, 2 i 5 (10  $\mu$ M) durant 24 i 48 hores. El cicle cel·lular es va analitzar per citometria de flux mitjançant el marcatge amb iodur de propidi. S'indica el percentatge de cèl·lules que es troba a cada fase del cicle cel·lular (Sub-G1, G1, S, G2/M).

#### 4.1.7 Estudi de l'activitat oxidativa dels lligands 1, 2 i 5

Per determinar si els lligands sols poden ser inductors d'estrès oxidatiu, es van mesurar els nivells de ROS en cèl·lules tumorals sense tractar i tractades els compostos 1, 2 i 5, mitjançant la sonda  $H_2DCF$ -DA, que emet fluorescència al ser oxidada pels ROS intracel·lulars.



Inicialment, l'activitat oxidativa dels lligands **1**, **2** i **5** es va analitzar incubant les cèl·lules CAPAN-1 amb concentracions creixents (0, 2.5, 5 i 10  $\mu\text{M}$ ) dels lligands durant 5 i 24 hores, per establir una relació entre el temps d'incubació i la concentració dels compostos amb la seva capacitat de generar ROS a les cèl·lules.

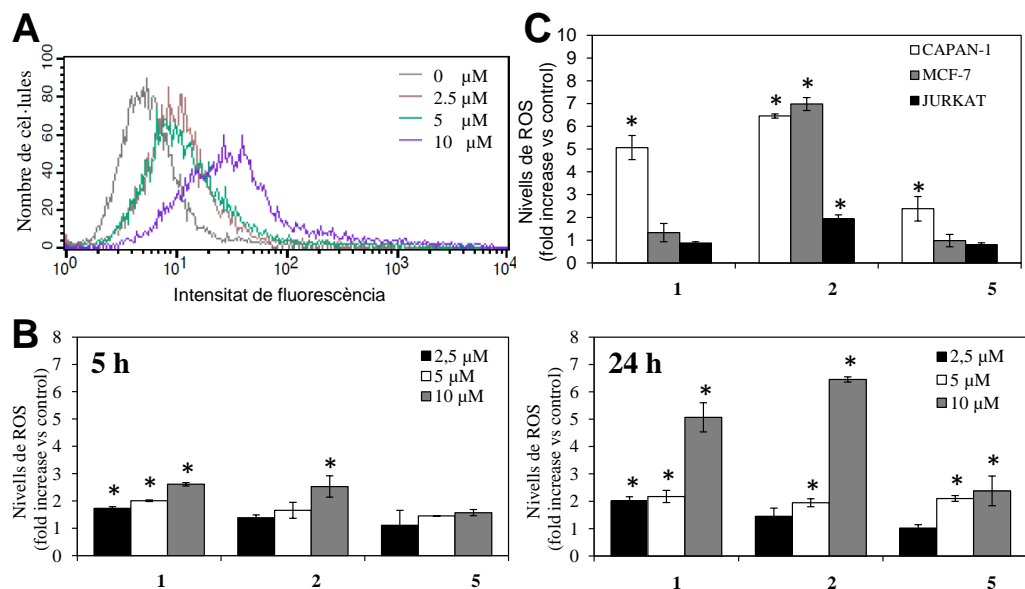
A la figura 4.6 A es mostra l'histograma obtingut per citometria de flux després d'incubar les cèl·lules CAPAN-1 amb diferents concentracions de lligand **1** durant 24 hores. Es pot observar com la intensitat de fluorescència de les cèl·lules CAPAN-1 va incrementar de 5,8 en cèl·lules sense tractar, a 10.9, 11,79 i 32,6 al ser tractades amb 2.5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  de lligand **1**, respectivament, indicant un potent efecte pro-oxidant d'aquest lligand

Els experiments es van repetir amb els tres lligands incubant les cèl·lules durant 5 i 24 hores. Després de 5 hores d'incubació a les concentracions de 2,5, 5 i 10  $\mu\text{M}$ , el compost **1** va induir un increment moderat dels nivells de ROS intracel·lular: de 1.73, 2.01 i 2.61 vegades, respectivament, respecte els nivells basals de ROS de les cèl·lules sense tractar (figura 4.6 B). Les mateixes concentracions del compost **2** van generar uns increments similars dels nivells de ROS: 1.39, 1.66 i 2.53 vegades, respectivament, respecte les cèl·lules control. Per contra, el compost **5** no va induir un increment significatiu de ROS a cap de les concentracions assajades, el que indica que aquest compost presenta una menor activitat oxidativa que els compostos **1** i **2**.

Per altra banda, quan les cèl·lules es van tractar amb els compostos **1**, **2** i **5** durant 24 hores, la seva activitat pro-oxidant va incrementar, especialment a la concentració 10  $\mu\text{M}$ , a la qual es va determinar un increment significatiu dels nivells de ROS de 5.1, 6.4 i 2.4 vegades, respectivament, respecte les cèl·lules control (figura 4.6 B). Aquest resultats demostren, doncs, que els lligands sols presenten una potent activitat oxidativa, induint la formació de ROS intracel·lulars de manera dosi-dependent i temps-dependent. Val a dir que el tractament 10  $\mu\text{M}$  durant 24h indueix la major activitat pro-oxidant. Aquest resultats també indiquen

que el compost **5** té menor capacitat oxidativa, el que confirmaria resultats anteriors que senyalen que el mecanisme d'acció d'aquest lligant és diferent.

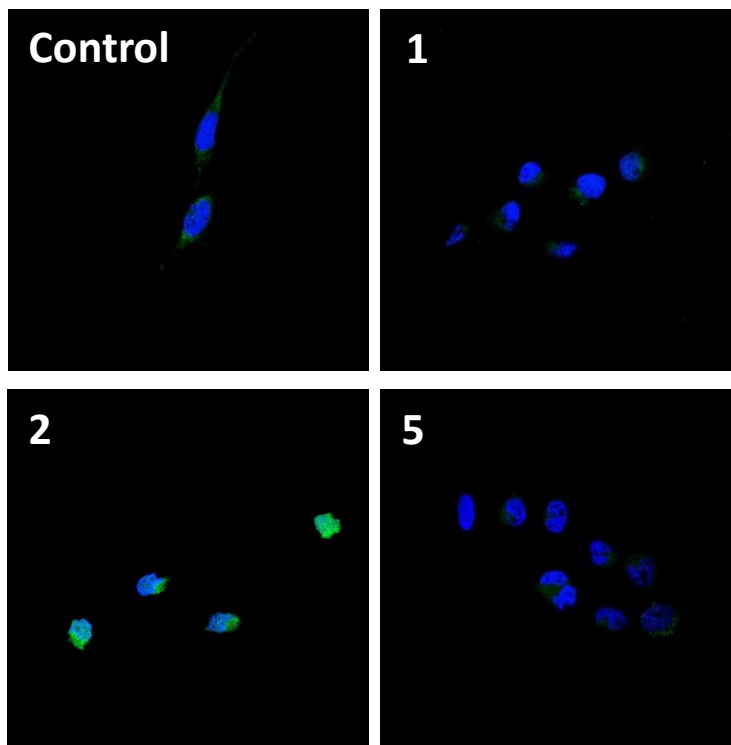
Posteriorment, per determinar si la inducció de ROS intracel·lular era un mecanisme general dels lligands en diferents tipus tumorals, es van tractar cèl·lules MCF-7 i cèl·lules JURKAT amb els lligands **1**, **2** i **5** (10  $\mu$ M) durant 24 hores. Els resultats van mostrar que en cèl·lules MCF-7, el tractament amb el lligand **2** incrementava fins a 7 vegades els nivells de ROS intracel·lular respecte les cèl·lules control. El lligand **1**, en canvi, només incrementava 1.3 vegades els nivells de ROS intracel·lulars respecte les cèl·lules MCF-7 sense tractar, mentre que el lligand **5** no presentava activitat oxidativa en aquestes cèl·lules. Per altra banda, en cèl·lules JURKAT, només el compost **2** incrementava significativament els nivells de ROS intracel·lular, fins a 1.94 vegades respecte les cèl·lules control (figura 4.6 C). Aquests resultats revelen que, tot i que els lligands presenten activitat oxidativa dins les cèl·lules, aquesta varia en funció de la línia cel·lular. Donat que els lligands **1**, **2** i **5** han mostrat ser citotòxics en les tres línies cel·lulars, en base a aquests resultats no podem excloure que hi hagi altres mecanismes implicats en la seva activitat antitumoral.



**Figura 4.6. Anàlisi de l'activitat oxidativa dels lligands 1, 2 i 5. (A)** Nivells de ROS intracel·lulars després d'incubar les cèl·lules CAPAN-1 amb 0, 2,5, 5 i 10  $\mu\text{M}$  del compost **1** durant 24 hores. A l'histograma es mostra l'intensitat de la fluorescència obtinguda per a cada tractament. **(B)** Canvis en els nivells de ROS (vegades que incrementa respecte les cèl·lules sense tractar) després d'exposar les cèl·lules CAPAN-1 a les corresponents concentracions de lligand **1**, **2** o **5** durant 5 i 24 hores. **(C)** Inducció de ROS després d'exposar cèl·lules CAPAN-1, MCF-7 i JURKAT durant 24 hores als lligands **1**, **2** o **5** (10  $\mu\text{M}$ ). Els nivells de ROS es mesuren mitjançant la sonda  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  per citometria de flux. Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD de, almenys, tres experiments independents. \* $p < 0.05$  versus cèl·lules control.

Per altra banda, també mitjançant la sonda  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ , es va avaluar visualment la generació de ROS induïda pels lligands **1**, **2** i **5** (10  $\mu\text{M}$  durant 24 hores) en cèl·lules MCF-7 per microscòpia confocal. En les imatges s'observa que únicament les cèl·lules tractades amb el lligand **2** presentaven increment de fluorescència verda corresponent a la sonda oxidada per ROS, en comparació al control, mentre que no s'aprecia aquest canvi en la fluorescència verda en les cèl·lules tractades amb els altres lligands (figura 4.7), resultats que concorden amb els nivells de ROS obtinguts per citometria de flux en aquesta línia cel·lular (figura 4.6 C), on els lligands **1** i **5**, a les 24 hores, pràcticament no indueixen ROS. Les imatges

obtingudes senyalen que les ROS es troben localitzats majoritàriament en el nucli i espai perinuclear.



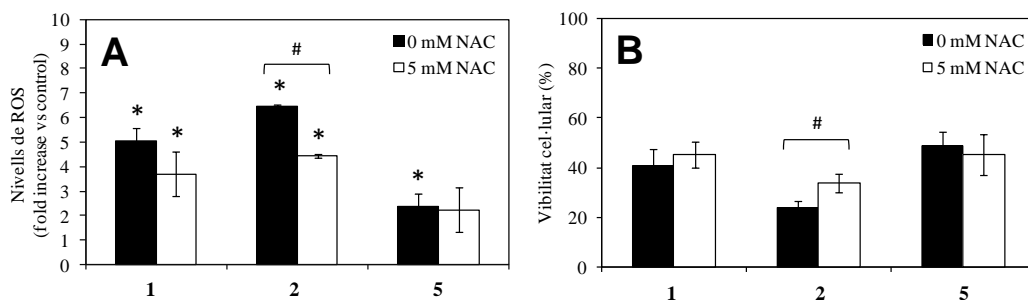
**Figura 4.7.** Imatges obtingudes per microscòpia confocal de la generació de ROS en cèl·lules MCF-7 després del tractament amb els lligands **1**, **2** o **5**. Les cèl·lules es van incubar amb 10  $\mu\text{M}$  dels lligands **1**, **2** o **5** durant 24 hores o amb el medi sol (Control). Es va marcar el nucli amb Hoechst 33258 (blau). La fluorescència emesa per la sonda oxidada per ROS (DCF) s'observa de color verd.

#### **4.1.8 Estudi de l'efecte de l'agent antioxidant NAC en l'activitat oxidativa i citotòxica dels lligands en cèl·lules tumorals**

Per determinar la relació entre les propietats pro-oxidants i l'acció citotòxica dels compostos, es va analitzar si en presència de NAC, agent antioxidant que bloqueja

l'increment de ROS, es disminuïa l'activitat oxidativa d'aquests, i en conseqüència, s'inhibia la citotoxicitat en cèl·lules d CAPAN-1.

Les cèl·lules es van incubar amb 10  $\mu\text{M}$  dels compostos **1**, **2** i **5** durant 24 hores en presència i absència de NAC 5 mM i es van mesurar els nivells de ROS intracel·lulars al citòmetre de flux mitjançant la sonda  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ . Es va veure que en presència de NAC disminuïen els nivells de ROS generats pel compost **1** un 26.8% i un 31.1% pel compost **2**, en canvi, els nivells de ROS induïts pel compost **5** gairebé no es van veure modificats per NAC (figura 4.8 A). Aquesta reducció dels nivells de ROS es va associar amb una menor citotoxicitat dels lligands **1** i **2** en presència de NAC. En concret, la viabilitat cel·lular es va veure incrementada de  $40.7 \pm 6.9 \%$  quan les cèl·lules s'incubaven amb 10  $\mu\text{M}$  del compost **1** sense NAC a  $45.2 \pm 5.4 \%$  en presència de NAC, el que representava un 11% d'increment. En el cas del lligand **2**, la viabilitat cel·lular va augmentar significativament de  $23.9 \pm 2.9 \%$  quan les cèl·lules s'incubaven amb 5  $\mu\text{M}$  del compost **2** sense NAC a  $33.6 \pm 3.8 \%$  en presència de NAC 5 mM, el que representava un increment del 40,6 % de la viabilitat cel·lular. L'activitat citotòxica del compost **5**, en canvi, no es va veure modificada per NAC (figura 4.8 B). Aquests resultats indiquen que l'estrès oxidatiu està implicat en el mecanisme de mort cel·lular induïda pels compostos **1** i **2** ja que quan les cèl·lules es tracten amb l'antioxidant NAC, els nivells de ROS disminueixen i, en conseqüència, la viabilitat cel·lular s'incrementa. No es pot descartar que hi hagi altres mecanismes implicats en la citotoxicitat dels compostos, especialment pel compost **5**, el qual promou un efecte citotòxic que no es veu revertit amb l'antioxidant NAC.



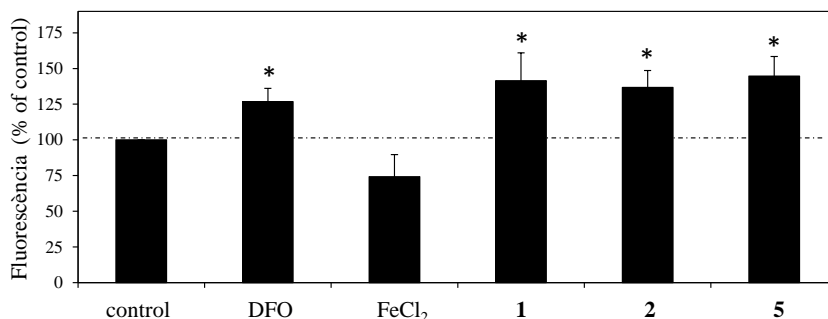
**Figura 4.8. Efecte de NAC en l'activitat dels lligands 1, 2 i 5.** (A) Es van incubar les cèl·lules CAPAN-1 amb 10  $\mu$ M dels lligands 1, 2 o 5 durant 24 hores en presència o absència de NAC 5 mM. Es van determinar els nivells de ROS amb la sonda  $H_2DCF$ -DA. Els resultats representen l'increment dels nivells de ROS en cada tractament respecte el control. (B) Es van incubar les cèl·lules CAPAN-1 amb els lligands 2 (5  $\mu$ M), 1 o 5 (10  $\mu$ M) durant 48 hores en presència o absència de NAC 5 mM. Es va determinar la viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig colorimètric MTT. Els resultats representen el percentatge de viabilitat cel·lular per a cada tractament respecte el control. Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD de, almenys, tres experiments independents. \* $p < 0.05$  versus control. # $p < 0.05$  versus cèl·lules en absència de NAC.

#### 4.1.9 Estudi de la capacitat dels lligands per unir-se al ferro làbil intracel·lular

Es va analitzar si la generació de ROS pels lligands està relacionada amb la seva elevada capacitat per unir-se al ferro, formant els complexos de coordinació altament oxidants dins les cèl·lules per quelació del ferro làbil intracel·lular. Per això, en cèl·lules CAPAN-1 es va estudiar l'efecte dels compostos 1, 2 i 5 en els nivells de ferro làbil mitjançant citometria de flux, utilitzant la sonda fluorescent Calceïna-AM, la fluorescència de la qual s'atenua en presència d'àtoms de Ferro.

Les cèl·lules es van tractar durant 24 hores amb 10  $\mu$ M dels compostos 1, 2 i 5 i seguidament es van incubar amb la sonda Calceïna-AM. Es va observar un increment significatiu de la fluorescència de les cèl·lules ( $141.4 \pm 19.5$  %,  $136.8 \pm 11.7$  i  $144.6 \pm 13.8$  %, respectivament) respecte les cèl·lules control (100%), el que indica menor concentració de Ferro intracel·lular en les cèl·lules exposades als lligands. En cèl·lules incubades durant 24 hores amb 100  $\mu$ M de DFO, un clàssic

agent quelant de ferro, la fluorescència va augmentar de manera similar indicant que la major part del ferro intracel·lular quelatable és complexat pels compostos **1**, **2** i **5**, de manera similar a la DFO. Al contrari, quan es van incubar les cèl·lules, durant 24 hores amb 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_2$ , la fluorescència va disminuir a un  $74.2 \pm 15.5$  % respecte les cèl·lules control (100%) (figura 4.9).



**Figura 4.9. Activitat quelant dels lligands 1, 2 i 5 en cèl·lules CAPAN-1.** Les cèl·lules CAPAN-1 es van tractar amb 10  $\mu\text{M}$  dels lligands **1**, **2** o **5**, amb 100  $\mu\text{M}$  del quelant de ferro DFO o amb 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_2$  durant 24 hores i, mitjançant la sonda Calceïna-AM, es van mesurar els nivells de ferro làbil intracel·lular per citometria de flux. Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD de, almenys, tres experiments independents. \* $p < 0.05$  versus control.

Aquests resultats suggereixen doncs, que els lligands, un cop dins la cèl·lules, quelen el ferro làbil intracel·lular, generant complexos de ferro (**1-Fe**, **2-Fe** i **5-Fe**).

#### 4.1.10 Anàlisi de l'efecte del ferro en l'activitat citotòxica dels lligands

El ferro és un element essencial pel metabolisme cel·lular, per tant, es va voler determinar si la davallada del ferro intracel·lular causada per l'activitat quelant dels lligands podia estar implicada en la seva activitat citotòxica. Aquest estudi es va fer mitjançant la tècnica de viabilitat cel·lular MTT.

Es va determinar l'activitat citotòxica del compost **2** (5  $\mu\text{M}$ ) en cèl·lules MCF-7 i CAPAN-1 després del pre-tractament amb concentracions creixents (0, 1, 10 i 100

$\mu\text{M}$ ) de sals de ferro ( $\text{FeCl}_2$ ) durant 2 hores amb la finalitat d'incrementar el contingut de ferro intracel·lular i equilibrar la possible davallada induïda pel lligand. En paral·lel, per excloure que la citotoxicitat fos induïda per excés de ferro, les cèl·lules es van incubar amb les mateixes concentracions de  $\text{FeCl}_2$  en absència de lligand, però no es va observar toxicitat a cap de les concentracions assajades (Figura 4.10.A). Al contrari del que s'esperava, la citotoxicitat del lligand **2** va augmentar després de pretractar les cèl·lules amb  $\text{FeCl}_2$ , de manera dependent de la concentració de  $\text{FeCl}_2$ . A la concentració de  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_2$ , la viabilitat cel·lular va disminuir significativament un 51.8% en les cèl·lules MCF-7 i un 37.7% en les cèl·lules CAPAN-1 (Figura 4.10.a). Aquests resultats indiquen que un excés de ferro intracel·lular, enlloc de protegir les cèl·lules de l'activitat quelant dels lligands, potenciarà la seva activitat citotòxica, segurament perquè nivells més elevats de ferro intracel·lular afavoreixen la formació de complexos de Fe amb activitat prooxidant dins d'aquestes.

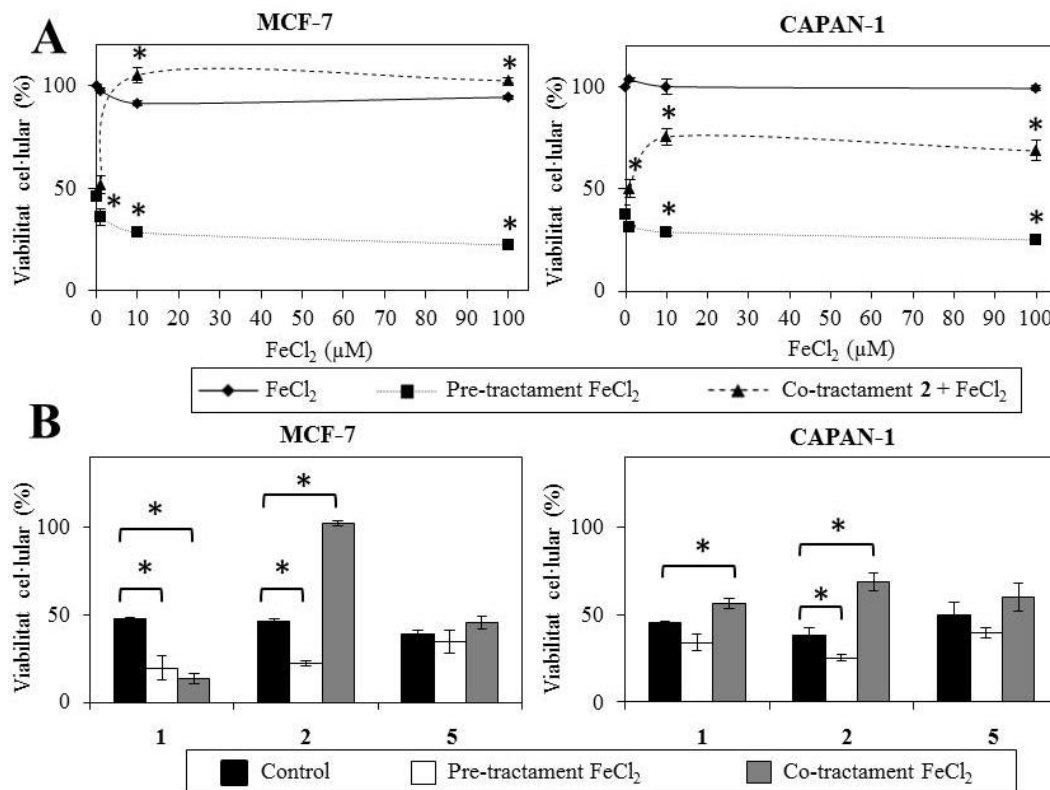
Per altra banda, es van fer els mateixos experiments co-incubant les cèl·lules amb el lligand **2** ( $5 \mu\text{M}$ ) juntament amb les diferents concentracions de  $\text{FeCl}_2$  en el medi de cultiu. En aquests assajos es va observar que l'activitat citotòxica del lligand disminueix o fins i tot, s'inhibeix en presència de ferro, probablement degut a la ràpida generació del seu corresponent complex de ferro no actiu (**Fe-2**) en el medi de cultiu cel·lular (figura 4.10 A). La baixa activitat citotòxica del complex de ferro en comparació al corresponent lligand lliure d'aquest metall, es pot atribuir a diferències en la eficiència d'internalització cel·lular.

Se sap que la conjugació de ferro confereix càrrega positiva a lligands neutres, donant com a resultat molècules menys solubles en lípids amb dificultats per travessar la membrana cel·lular. Per contra, l'apolaritat dels lligands lliures de metalls, els permet travessar fàcilment les membranes cel·lulars i, un cop a dins, unir-se al ferro intracel·lular generant els complexos de ferro actius (Seddon et al. 2009; Z. D. Liu and Hider 2002; D. Kalinowski and Richardson 2005; Chaston et al. 2004).



Aquests estudis es van fer també amb els lligands **1** i **5**. En el cas del lligand **1** es va veure que quan les cèl·lules es pre-tractaven amb  $\text{FeCl}_2$  ( $100 \mu\text{M}$ ) prèviament a l'exposició al lligand, la citotoxicitat del lligand **1** augmentava significativament, en un 58.6% en les cèl·lules MCF-7 i un 25.5% en les cèl·lules CAPAN-1. En canvi, quan les cèl·lules es van co-incubar amb  $\text{FeCl}_2$  juntament amb el lligand **1**, únicament en les cèl·lules CAPAN-1 va augmentar significativament la viabilitat cel·lular. Aquests resultats coincideixen amb els resultats previs de citotoxicitat, on es mostra que el corresponent complex de ferro (**Fe-1**) és citotòxic enfront la línia cel·lular MCF-7, amb una  $\text{IC}_{50} = 17.5 \pm 0.9$ , mentre que en cèl·lules CAPAN-1 no és actiu ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ).

En el cas del lligand **5** ( $10 \mu\text{M}$ ), la seva citotoxicitat no es va veure significativament modificada ni pel pre-tractament ni per la co-incubació amb  $\text{FeCl}_2$ , en especial, en les cèl·lules de càncer de mama MCF-7, el que pot ser degut a la baixa activitat oxidativa d'aquest compost en aquesta línia cel·lular (figura 4.10 B).

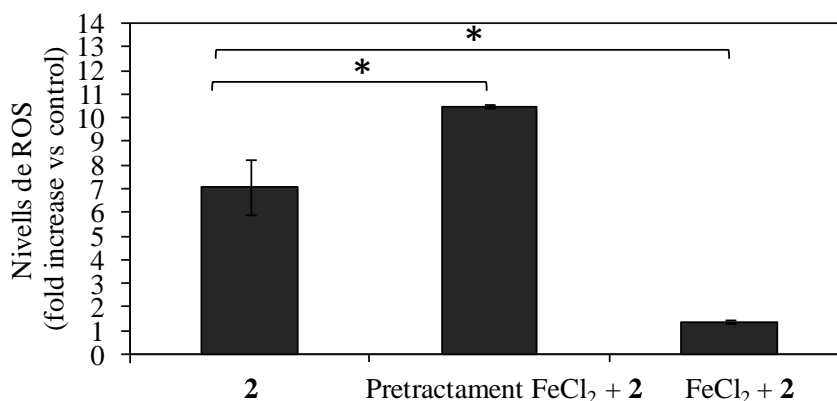


**Figura 4.10. Efecte del ferro en l'activitat citotòxica dels lligands 1, 2 i 5 en cèl·lules MCF-7 i CAPAN-1.** (A) Es van tractar les cèl·lules amb el lligand 2 (5 μM) després de pre-incubar-les durant 2 hores amb FeCl<sub>2</sub> (0, 1, 10 o 100 μM) (línia de punts) i, en paral·lel, es van co-tractar amb el lligand 2 i FeCl<sub>2</sub> (línia discontinua). També es va determinar la citotoxicitat de FeCl<sub>2</sub> a les concentracions assajades (línia continua). La viabilitat cel·lular es va determinar a les 48 hores de tractament mitjançant l'assaig de citotoxicitat MTT. (B) Es va analitzar l'efecte del pre-tractament (blanc) i co-tractament de FeCl<sub>2</sub> (100 μM) (gris) en l'activitat citotòxica dels lligands 2 (5 μM), 1 i 5 (10 μM) en cèl·lules CAPAN-1 i MCF-7. Es van incloure com a control les cèl·lules tractades únicament amb els lligands (negre). Els resultats representen el percentatge de viabilitat cel·lular per a cada tractament respecte el control. Les dades representen la mitjana ± SD de, almenys, tres experiments independents. \*p<0.05 versus cèl·lules control.

#### **4.1.11 Anàlisi de l'efecte del ferro en l'activitat oxidativa dels lligands**

Per estudiar si l'activitat oxidativa del compost **2** en cèl·lules CAPAN-1 es veu modificada quan s'incrementen els nivells de ferro intracel·lular es van mesurar els nivells de ROS en cèl·lules CAPAN-1 després de 24 hores d'incubació amb el lligand **2** (10  $\mu\text{M}$ ), amb el lligand **2** (10  $\mu\text{M}$ ) juntament amb  $\text{FeCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ), i amb el lligand **2** (10  $\mu\text{M}$ ) després de pre-incubar les cèl·lules durant 2 hores amb  $\text{FeCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ). Quan les cèl·lules es van pre-tractar amb  $\text{FeCl}_2$ , els nivells de ROS van augmentar significativament 1.5 vegades respecte les cèl·lules sense pre-tractar (figura 4.11), el que indica que l'augment de la citotoxicitat del lligand observada en els estudis anteriors (Figura 4.10) està associada a un increment de l'activitat oxidativa del lligand. Contràriament, quan les cèl·lules es van co-incubar amb  $\text{FeCl}_2$  i el lligand **2**, els nivells de ROS van disminuir dràsticament respecte les cèl·lules tractades únicament amb el lligand (figura 4.11).

En resum, aquests resultats indiquen que l'increment dels nivells de ferro intracel·lular potencia la formació de complexos oxidants a l'interior de la cèl·lula, el que desencadena un augment de la citotoxicitat. Per altra banda, quan les cèl·lules es co-incuben amb ferro i el lligand conjuntament, s'anul·la la formació de ROS, probablement perquè el ferro es complexa al lligand a l'exterior de la cèl·lula, formant el corresponent complex de ferro i aquest no pot internalitzar. Així doncs, l'efecte antitumoral del lligand està associat a l'elevada activitat oxidativa del lligand quan es complexa amb el ferro a l'interior de la cèl·lula i no a la seva capacitat quelant.



**Figura 4.11. Efecte del ferro en l'activitat oxidativa del lligand 2 en cèl·lules CAPAN-1.** S'han incubat les cèl·lules CAPAN-1 durant 24 hores amb el lligand 2 (10  $\mu$ M) sol, amb el lligand 2 (10  $\mu$ M) després d'incubar-les durant 2 hores amb FeCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M), o amb el lligand 2 (10  $\mu$ M) juntament amb FeCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M). Es van mesurar els nivells de ROS amb la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA per citometria de flux. Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD de, almenys, tres experiments independents. \* $p < 0.05$  versus cèl·lules tractades únicament amb el lligand 2.

#### 4.1.12 Anàlisi de la interacció dels lligands amb el DNA plasmídic

La capacitat dels lligands **1**, **2** i **5** i els seus respectius complexos de Fe(II) **1-Fe**, **2-Fe** i **5-Fe** per interaccionar i/o induir talls a les molècules de DNA (activitat nucleasa) es va estudiar incubant els compostos (25  $\mu$ M) amb DNA plasmídic (pUC18) en presència i absència de peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), un agent oxidant. El plasmidi pUC18 es troba en un 90 % en forma superenrotllada, i el 10 % restant, en una forma circular, més relaxada. L'efecte dels compostos en la conformació del plasmidi (superenrotllat, circular o lineal) es van analitzar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa.

Es va veure que els lligands **1**, **2** i **5** eren capaços d'interaccionar amb el DNA en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i generar una forma més relaxada del plasmidi ja que es veia incrementada la forma circular (forma I), concretament de 13.1% (control) a

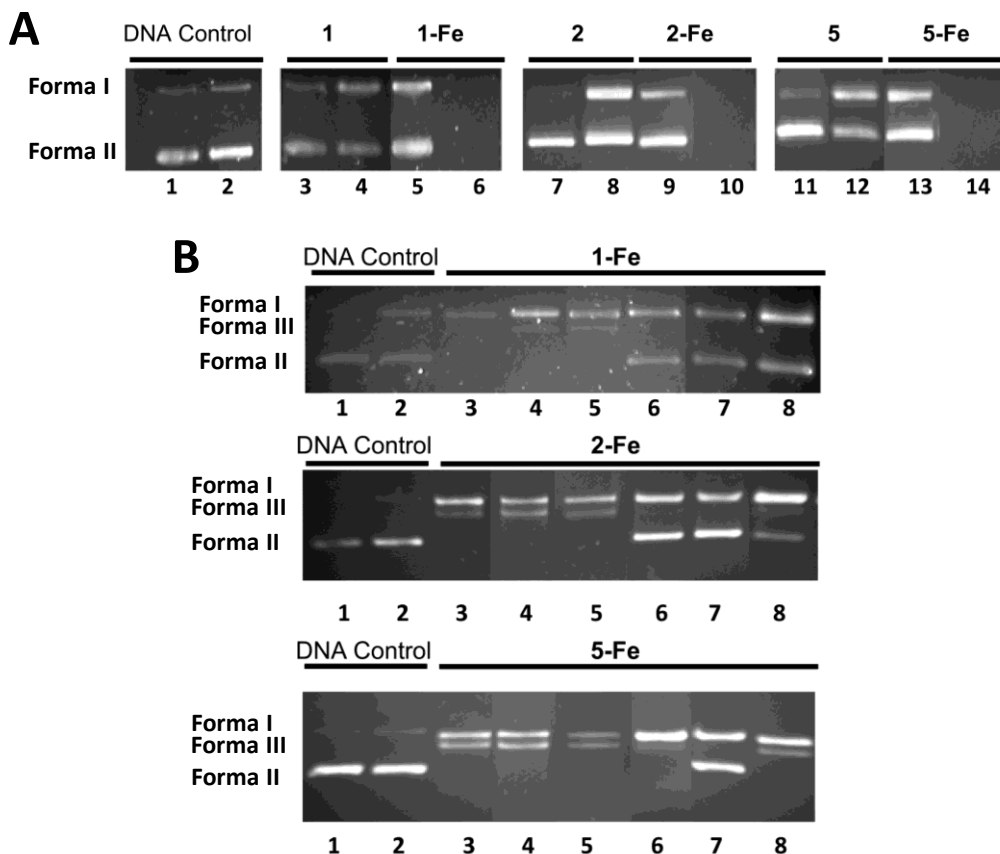
47.2%, a 43.2% i a 46.7% respectivament. En absència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, però, les conformacions del plasmidi no presentaven pràcticament canvis, el que indicava que l'activitat dels lligands sobre el DNA requereix la presència d'agents oxidants (figura 4.12 A, taula 4.3). Per altra banda, es va veure que els complexos de ferro **1-Fe**, **2-Fe** i **5-Fe** per sí sols interaccionaven amb el DNA ja que els percentatges de les formes circulars es veien incrementats, en concret de 13.1 % (control) a 38.2%, a 25.9% i a 35.2% respectivament. A més, en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aquests presentaven una forta activitat nucleasa, degradant completament el DNA plasmídic a la concentració assajada (0% formes superenrotllades i 0% formes circulars) (carrils 6, 10 i 14 figura 4.12 A, taula 4.3).

Quan la concentració dels complexos de ferro es va reduir (15 µM), i en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es va veure que els complexos **1-Fe**, **2-Fe** i **5-Fe** eren capaços d'induir la conversió total de DNA superenrotllat (0%) a circular (82.4%, 84% i 56.9% respectivament), i també a una forma lineal (17.6%, 16% i 43.1% respectivament), la qual és causada per dobles talls en el DNA plasmídic (figura 4.12 B, taula 4.4), el que va verificar que els complexos metàl·lics presentaven una potent activitat nucleasa.

Per altra banda, es va analitzar si els complexos de ferro tenien especificitat per interaccionar amb un determinat solc del DNA incubant el compostos en presència de Hoechst 33258, que s'uneix al solc menor del DNA (Karlsson et al. 2003; García-Giménez et al. 2007), o verd metil, un bloquejador del solc major (Kim and Norden 1993; Borrás et al. 2007). Es va veure que els complexos **1-Fe**, **2-Fe** i **5-Fe** no tenien especificitat per interaccionar amb un determinat solc del DNA ja que en presència dels diferents bloquejadors, la proporció de la forma lineal del plasmidi no es veia gairebé alterada (de 17.6%, 16% i 43.1% respectivament a 13.6%, 36.3% i 43.1% respectivament en presència de Hoechst 33258, i a 9.3%, 21.4% i 49% respectivament en presència de verd metil (figura 4.12 B, taula 4.4). Aquests resultats indiquen, per tant, que l'activitat nucleasa dels complexos de ferro afecta a qualsevol regió del DNA.

A més, es va estudiar si l'activitat pro-oxidant dels complexos de ferro podien estar implicats en les reaccions d'escissió del DNA (Luis García-Giménez et al. 2009). Donat que els ROS que poden malmetre el DNA sota les condicions experimentals utilitzades són el radical superòxid, el radical hidroxil i l'oxigen singlet, els quals es generen a través de la reacció de Fenton o Haber-Weiss; els additius que es van utilitzar en aquesta tècnica són els següents inhibidors de ROS: el Tiron, captador de radicals superòxid, l'àcida sòdica, inhibidor de l'oxigen singlet, i el DMSO, inhibidor del radical hidroxil.

Es va veure que l'activitat nucleasa dels complexos **1-Fe** i **2-Fe** es veia revertida pels diferents inhibidors de ROS utilitzats (Tiron, àcida sòdica i DMSO) ja que les formes obtingudes corresponien bàsicament a la forma circular (**1-Fe**: 52.4% amb Tiron, 58.2% amb àcida sòdica i 42.5% amb DMSO; **2-Fe**: 39.3% amb Tiron, 36.4% amb àcida sòdica i 62.7% amb DMSO) i a la forma superenrotllada del DNA (**1-Fe**: 47.6% amb Tiron, 41.8% amb àcida sòdica i 57.5% amb DMSO; **2-Fe**: 60.7% amb Tiron, 63.6% amb àcida sòdica i 26% amb DMSO) (figura 4.13 B, taula 4.4), essent pràcticament absent la forma lineal, el que indica que en la reacció d'escissió del DNA intervien diferents espècies reactives d'oxigen. L'activitat nucleasa del complexo **5-Fe**, en canvi, només es veia revertida en presència de l'inhibidor de ROS àcida sòdica (54.5% forma superenrotllada i 45.5% forma circular), el que indica que l'activitat nucleasa d'aquest està lligada a la formació de l'espècie oxigen singlet (X. Zhang et al. 1997). Aquests resultats suggereixen, doncs, que els complexos de ferro indueixen dany oxidatiu en el DNA causat per les ROS, els quals interaccionen i provoquen talls en el DNA.



**Figura 4.12. Anàlisi de la interacció dels lligands 1, 2 i 5 amb el DNA mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. A)** El plasmidi de DNA pUC18 (18.9  $\mu$ M) es va incubar amb els lligands 1, 2 i 5 i amb els complexos de ferro 1-Fe, 2-Fe i 5-Fe (25  $\mu$ M) en presència o absència de peròxid d'hidrogen (1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 wt. % en aigua) durant 1 hora a 37 °C. Carril 1: DNA control; Carril 2: DNA control + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Carril 3, 5, 7, 9, 11, 13: lligand o complex de ferro en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **B)** El plasmidi de DNA pUC18 (18.9  $\mu$ M) es va incubar amb els complexos de ferro 1-Fe, 2-Fe i 5-Fe (15  $\mu$ M) en presència de peròxid d'hidrogen (1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 wt. % en aigua) durant 1 hora a 37 °C i els inhibidors de ROS o els bloquejadors dels solcs de DNA. Carril 1: DNA control; Carril 2: DNA control + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Carril 3: Complex de ferro en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Carril 4: Complex de ferro en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i Hoechst 33258 40  $\mu$ M; Carril 5: Complex de ferro en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i verd metil 20  $\mu$ M; Carril 6: Complex de ferro en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i Tiron 10 mM; Carril 7: Complex de ferro en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i àcida sòdica 0.4 M; Carril 8: Complex de ferro en presència de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 3  $\mu$ l de dimetilsulfòxid.

**Taula 4.3. Proporcions relatives de les diferents formes del DNA després del tractament amb 1, 1-Fe, 2, 2-Fe, 5 i 5-Fe.**

Forma:	Proporció [%]	
	I	II
Sense tractar	86.9	13.1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	83.7	16.3
1	84.3	15.7
1 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	52.8	47.2
1-Fe	61.8	38.2
1-Fe + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	0
2	91.3	8.7
2 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	56.8	43.2
2-Fe	74.1	25.9
2-Fe + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	0
5	92.3	7.7
5 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	53.3	46.7
5-Fe	64.8	35.2
5-Fe + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	0

Forma I: forma superenrotllada, Forma II: forma oberta

**Taula 4.4. Proporcions relatives de les diferents formes del DNA després del tractament amb 1-Fe, 2-Fe i 5-Fe en presència de inhibidors de ROS i bloquejadors dels solcs del DNA.**

Forma:	Proporció [%]								
	1-Fe			2-Fe			5-Fe		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Sense tractar	89.2	10.8	0	99.8	0.2	0	98.1	1.9	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	59.3	40.7	0	95.5	4.5	0	94.7	5.3	0
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	82.4	17.6	0	84.0	16.0	0	56.9	43.1
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + hoechst	0	86.8	13.2	0	63.7	36.3	0	52.8	47.2
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + verd metil	0	90.7	9.3	0	78.6	21.4	0	51.0	49.0
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Tiron	47.6	52.4	0	60.7	39.3	0	0	96.7	3.3
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + àcida sòdica	41.8	58.2	0	63.6	36.4	0	54.5	45.5	0
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DMSO	57.5	42.5	0	26.0	62.7	11.3	0	74.8	25.2

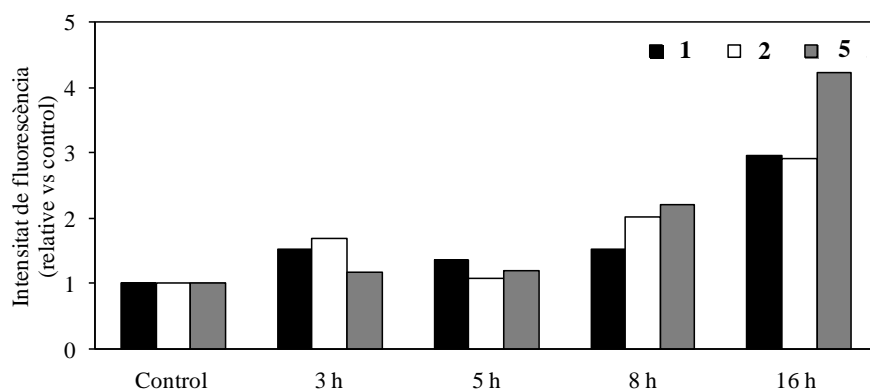
Forma I: forma superenrotllada, Forma II: forma oberta; Forma III: forma lineal

### 4.1.13 Anàlisi del dany al DNA cel·lular

A continuació es va avaluar si la capacitat dels compostos **1**, **2** i **5** d'induir dany en el DNA observada a nivell de DNA molecular es reproduïa a nivell cel·lular. Es van determinar els nivells de fosforilació de la serina 139 de la histona H2AX (p-H2AX), el que es considera un marcador específic de talls de la doble cadena en el DNA, amb anticossos específics, mitjançant citometria de flux (Podhorecka, Skladanowski, and Bozko 2010).



Les cèl·lules MCF-7 es van tractar amb els lligands **1**, **2** i **5** (10  $\mu$ M) durant 3, 5, 8 i 16 hores i posteriorment es van examinar els nivells de p-H2AX mitjançant tècniques citometria de flux. Es va veure que aquests nivells de p-H2AX augmentaven sobretot a partir de les 8 hores, incrementant-se els nivells fins a 3 vegades respecte les cèl·lules no tractades a les 16 hores de tractament amb els lligands **1** i **2**; i fins a 4 vegades quan es van tractar amb el lligand **5** (figura 4.13). És important destacar que l'acumulació de p-H2AX, i per tant el dany al DNA cel·lular, és paral·lela a la cinètica de l' increment de ROS i precedeix a l'activació de les caspases i a l'apoptosi.



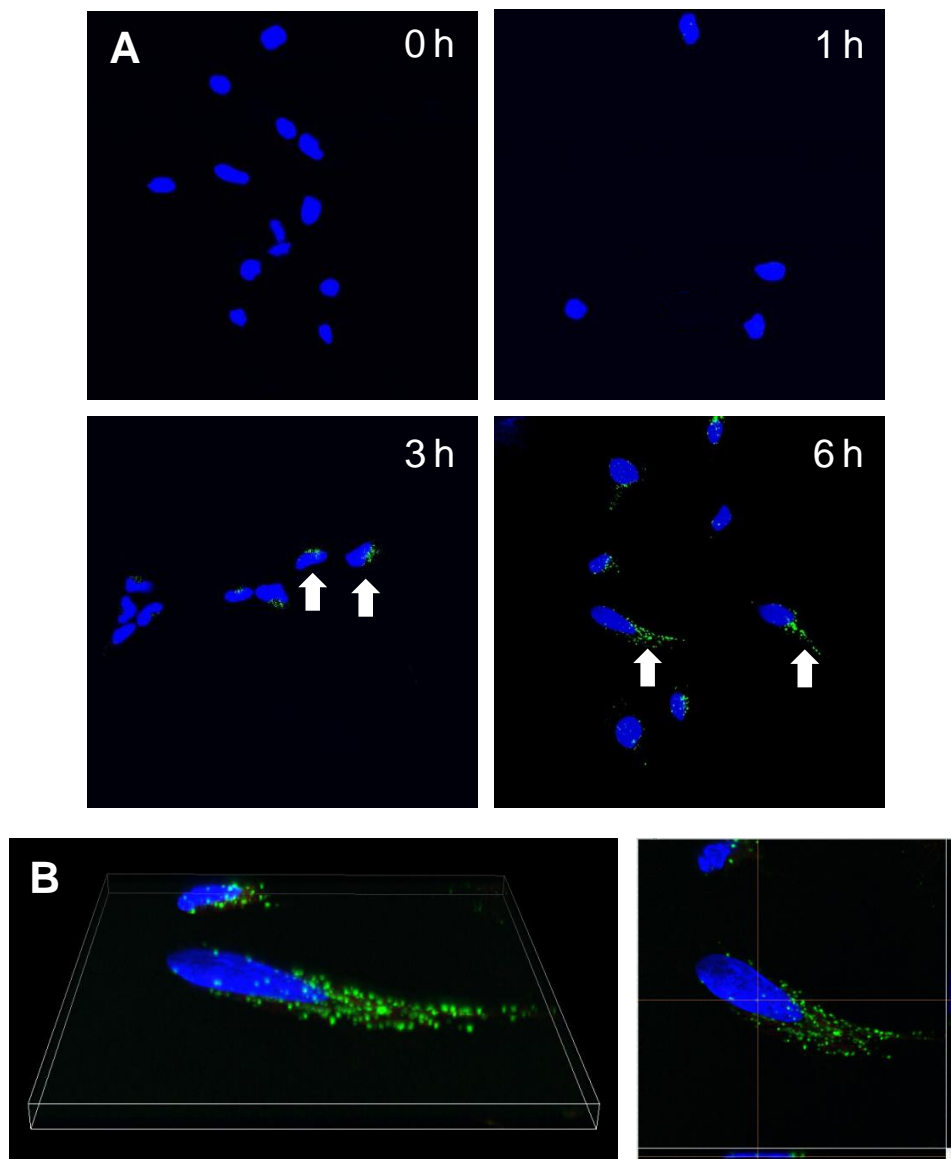
**Figura 4.13. Dany al DNA induït pels lligands 1, 2 i 5 en cèl·lules MCF-7.** Les cèl·lules MCF-7 es van incubar amb els lligands 1, 2 i 5 (10  $\mu$ M) durant 3, 5, 8 i 16 hores. Posteriorment, es van quantificar els nivells de p-H2A.X per citometria de flux utilitzant anticossos específics anti-pH2A.X. El gràfic representa la mitjana de la intensitat de fluorescència per a cada condició en relació a les cèl·lules sense tractar.

#### 4.1.14 Internalització del lligand 1-CF

Donat que es disposava del lligand **1** fluoresceïnat **1-CF**, es va estudiar la seva capacitat d'internalització, mitjançant microscòpia confocal.

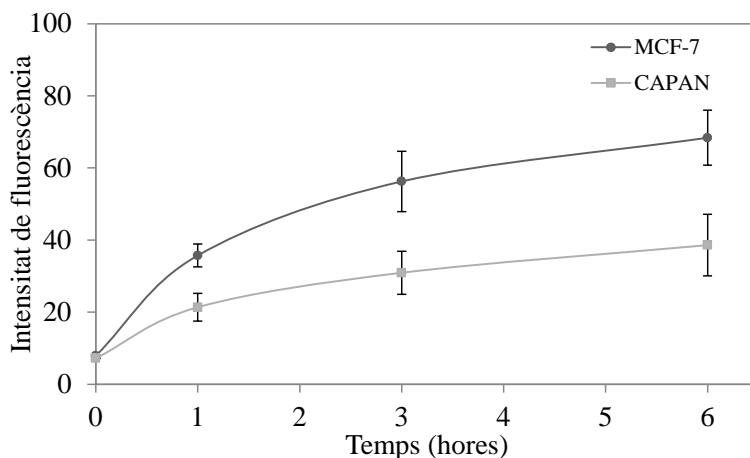
Les cèl·lules MCF-7 es van tractar durant 0, 1, 3 i 6 hores amb el lligand **1-CF** (50  $\mu$ M) i posteriorment es van observar al microscopi confocal. A les imatges obtingudes s'observa fluorescència verda corresponent al lligand a partir de les 3 hores. A les 6 hores, el nombre de partícules fluorescents incrementa (Figura

4.14A). Al fer l'anàlisi tridimensional de les imatges, s'observa que el lligand **1-CF** es localitza al citoplasma i a la perifèria nuclear, essent absent dins del nucli cel·lular (figura 4.14B).



**Figura 4.14.** Imatges de la internalització del lligand **1-CF** en les cèl·lules MCF-7 obtingudes per microscòpia confocal. **(A)** Les cèl·lules MCF-7 es van incubar amb el lligand **1-CF** (50 $\mu$ M) durant 0, 1, 3 i 6 hores a 37 °C. La localització del lligand s'indica de color verd. El nucli cel·lular es va marcar amb Hoechst 33258, de color blau. **(B)** Les imatges mostren la reconstrucció en 3D d'imatges en pla z obtingudes amb el microscopi confocal.

Per altra banda, les dades quantitatives obtingudes mitjançant citometria de flux, corroboren els resultats qualitius obtinguts mitjançant el microscopi confocal. Al gràfic (figura 4.15) s'observa un increment de la intensitat de la fluorescència mitjana intracel·lular en ambdues línies cel·lulars a mesura que s'incrementa el temps d'incubació amb el lligand, el que indica que la internalització del lligand **1-CF** augmenta amb el temps. En concret, en la línia cel·lular MCF-7, la intensitat de fluorescència va incrementar de 7,92 en cèl·lules control, fins a 35,7 després de 1 hora d'incubació, fins a 56,25 a les 3 hores, i fins a 68,38 a les 6 hores de tractament. En la línia cel·lular CAPAN-1, la intensitat de fluorescència va incrementar de 7,20 en cèl·lules control, a 21,36 després de 1 hora d'incubació, a 30,92 a les 3 hores, i a 38,59 a les 6 hores de tractament. Aquests resultats concorden amb els de l'anàlisi de l'activitat citotòxica dels lligands, on es determina que el lligand **1** és lleugerament més actiu en cèl·lules MCF-7.



**Figura 4.15. Cinètica de la internalització del lligand 1-CF en cèl·lules MCF-7 i CAPAN-1.** Les cèl·lules MCF-7 i CAPAN-1 es van incubar amb el lligand **1-CF** (50  $\mu$ M) durant 0, 1, 3 i 6 hores a 37 °C. Es representa la mitjana de la intensitat de fluorescència intracel·lular, obtinguda per citometria de flux, per a cada tractament  $\pm$  SD de, almenys, tres experiments independents.

## 4.2 Anàlisi de la citotoxicitat dels compostos en cèl·lules mare tumorals

Les teràpies antitumorals actuals tenen una baixa eficàcia enfront les CSC, les quals han demostrat gran resistència a la radioteràpia i a la quimioteràpia i gran capacitat de proliferar, diferenciar-se i regenerar el tumor. Per tant, actualment hi ha gran interès en trobar nous agents que siguin actius en aquest subtipus de cèl·lules tumorals.

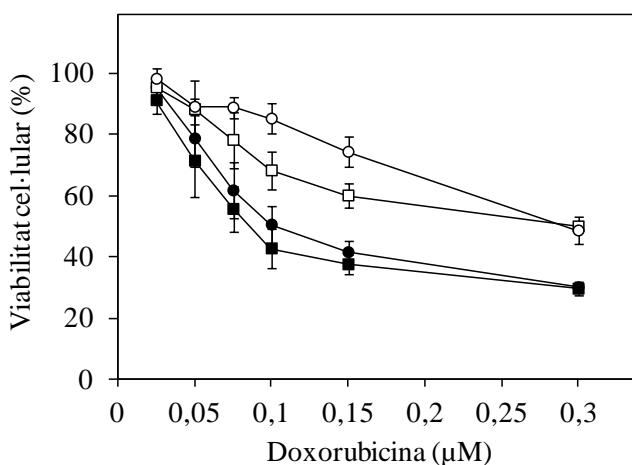
Per a completar l'estudi de l'activitat antitumoral dels nostres lligands, es va analitzar la seva activitat citotòxica enfront línies cel·lulars de mama amb propietats de cèl·lules mare (*cancer stem-like cells, CS-like cells*). Els estudis es van realitzar amb els lligands sols i combinats amb un agent quimioterapèutic tradicional, la doxorubicina, el mecanisme d'acció del qual inclou la inducció de ROS. La doxorubicina ha mostrat tenir menor activitat citotòxica en cèl·lules en les quals s'ha induït EMT per conferir-lis propietats de cèl·lules mare (Saxena et al. 2011; Gupta et al. 2009).

### 4.2.1 Anàlisi de l'activitat citotòxica de l'agent doxorubicina i dels lligands en les línies cel·lulars HMLE<sup>ShCntrl</sup>, HMLE<sup>ShEcad</sup>, HMLER<sup>ShCntrl</sup> i HMLER<sup>ShEcad</sup>

L'activitat citotòxica dels lligands **1**, **2** i **5**, es va avaluar, mitjançant la tècnica colorimètrica MTT, en *CS-like cells* de mama, les quals provenen de cèl·lules epitelials mamàries immortalitzades (cèl·lules HMLE<sup>ShCntrl</sup>) a les quals se les ha introduït l'oncogen H-Ras<sup>V12</sup> (cèl·lules HMLER<sup>ShCntrl</sup>) i induït la transició epiteli-mesenquima (EMT) mitjançant el silenciament de l'e-caderina (cèl·lules HMLER<sup>ShEcad</sup>).

Primerament, però, es va assajar l'activitat citotòxica de la doxorubicina, en les diferents línies cel·lulars HMLE<sup>ShCntrl</sup>, HMLE<sup>ShEcad</sup>, HMLER<sup>ShCntrl</sup> i HMLER<sup>ShEcad</sup>. Els

resultats obtinguts (figura 4.17, taula 4.5) eren els esperats, ja que es va veure que les *CS-like cells* (HMLER<sup>ShEcad</sup>) eren més resistents ( $IC_{50}=0.29 \pm 0.02 \mu M$ ) que les *non CS-like cells* (HMLER<sup>ShCntrl</sup>) ( $IC_{50}=0.1 \pm 0.02 \mu M$ ) a la doxorubicina, el que concordava amb estudis previs (Saxena et al. 2011; Gupta et al. 2009). Per altra banda, també es va veure que les cèl·lules no tumorals induïdes a EMT (HMLE<sup>ShEcad</sup>) ( $IC_{50}=0.28 \pm 0.02 \mu M$ ) també eren més resistents a aquesta droga que les cèl·lules no induïdes a EMT (HMLE<sup>ShCntrl</sup>) ( $IC_{50}=0.08 \pm 0.02 \mu M$ ) (figura 4.16, taula 4.5).



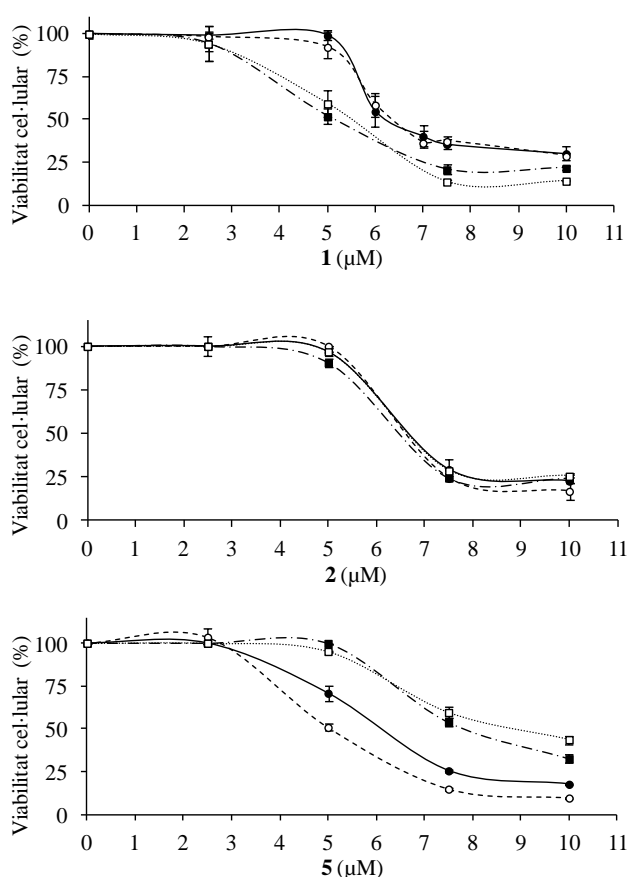
**Figura 4.16.** Efecte de la doxorubicina sobre la viabilitat (%) en les cèl·lules HMLE<sup>ShCntrl</sup> (■), HMLE<sup>ShEcad</sup> (□), HMLER<sup>ShCntrl</sup> (●) i HMLER<sup>ShEcad</sup> (○). Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD de, almenys, tres experiments independents amb les corresponents rèpliques.

En quant a l'activitat dels lligands, es va veure que els lligands **1**, **2** i **5** (figura 4.17, taula 4.5) eren citotòxics tant en les *non CS-like cells* (HMLER<sup>ShCntrl</sup>) ( $IC_{50}=6.5 \pm 0.45$ ,  $6.63 \pm 0.38$  i  $5.1 \pm 0.14 \mu M$  respectivament), com en les *CS-like cells* (HMLER<sup>ShEcad</sup>) ( $IC_{50}=5.3 \pm 0.7$ ,  $6.77 \pm 0.15$  i  $8.55 \pm 0.49 \mu M$  respectivament), indicant que aquests lligands indueixen la mort cel·lular mitjançant un mecanisme que no pot ser reprimat pel fenotip quimioresistent *CS-like*. Curiosament, els lligands mantenen una  $IC_{50}$  similar a la obtinguda en les cèl·lules tumorals (nivell  $\mu M$ ) (taula 4.2).

**Taula 4.5. Citotoxicitat dels lligands 1, 2 i 5 i de la doxorubicina en cèl·lules HMLE<sup>ShCntrl</sup>, HMLER<sup>ShCntrl</sup>, HMLE<sup>ShEcad</sup> i HMLER<sup>ShEcad</sup>.**

	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)			
	HMLE <sup>ShCntrl</sup>	HMLER <sup>ShCntrl</sup>	HMLE <sup>ShEcad</sup>	HMLER <sup>ShEcad</sup>
<b>1</b>	6.4 ± 0.4	6.5 ± 0.45	5.1 ± 0.2	5.3 ± 0.7
<b>2</b>	7.03 ± 0.32	6.63 ± 0.38	6.63 ± 0.15	6.77 ± 0.15
<b>5</b>	6.1 ± 0.14	5.1 ± 0.14	7.9 ± 0.14	8.55 ± 0.49
<b>Doxorubicina</b>	0.08 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02

<sup>a</sup> Els valors de IC<sub>50</sub> s'han determinat mitjançant l'assaig MTT 48 hores després de l'exposició al tractament. Les dades representen la mitjana ± SD de, almenys, tres experiments independents amb les seves corresponents rèpliques.

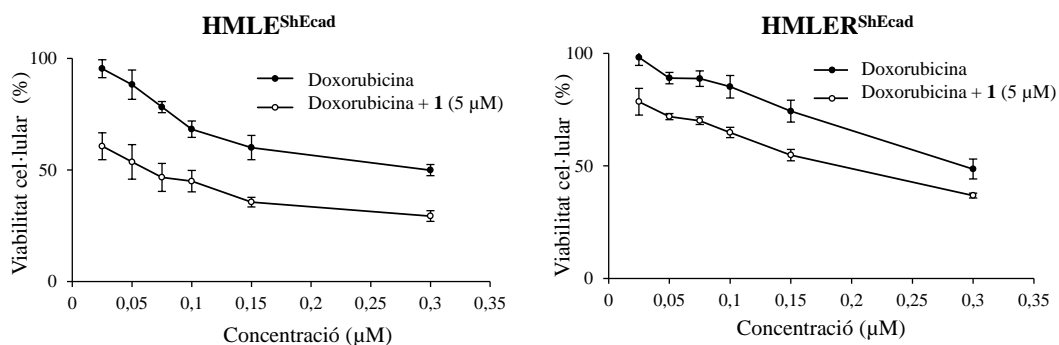


**Figura 4.17. Efecte dels lligands 1, 2 i 5 sobre la viabilitat (%) en les cèl·lules HMLE<sup>ShCntrl</sup> (●), HMLE<sup>ShEcad</sup> (■), HMLER<sup>ShCntrl</sup> (○) i HMLER<sup>ShEcad</sup> (□).** Les dades representen la mitjana ± SD de, almenys, tres experiments independents amb les corresponents rèpliques.

## 4.2.2 Anàlisi isobologràfic de la combinació de doxorubicina i el lligand 1

Es va analitzar mitjançant la tècnica MTT si l'efecte citotòxic produït per la doxorubicina en les *non CS-like cell* (HMLE<sup>ShEcad</sup>) i *CS-like cells* (HMLER<sup>ShEcad</sup>) es veia incrementat pel lligand **1**, el lligand més actiu en les cèl·lules HMLER<sup>ShEcad</sup> respecte les HMLE<sup>ShEcad</sup>. Es van tractar les diferents cèl·lules amb dosis creixents de doxorubicina (0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.3 µM) en absència o presència d'una dosi fixa del lligand **1** (5 µM) durant 48 hores.

El tractament de les cèl·lules HMLE<sup>ShEcad</sup> i HMLER<sup>ShEcad</sup> amb doxorubicina en presència del lligand **1** va resultar en una davallada de la viabilitat cel·lular en comparació amb el tractament amb la doxorubicina sola, especialment en els següents casos. Quan les cèl·lules HMLE<sup>ShEcad</sup> es van tractar amb 5 µM del lligand **1** la viabilitat cel·lular va ser del  $51.2 \pm 5.8\%$ , amb 0.15 µM de doxorubicina la viabilitat cel·lular va ser del  $60 \pm 5.4\%$  i quan es van tractar amb 5 µM de lligand **1** i 0.15 µM de doxorubicina la viabilitat cel·lular va reduir-se al  $35.6 \pm 2.1\%$ . Per altra banda, quan les cèl·lules HMLER<sup>ShEcad</sup> es van tractar amb 5 µM del lligand **1** la viabilitat cel·lular va ser del  $74.4 \pm 2.2\%$ , amb 0.15 µM de doxorubicina la viabilitat cel·lular és del  $74.3 \pm 4.9\%$  i quan es van tractar amb 5 µM de lligand **1** i 0.15 µM de doxorubicina la viabilitat cel·lular va ser del  $54.8 \pm 2.5\%$  (figura 4.18). L'efecte resultant de les combinacions és menor que la suma dels 2 agents, però major que el de cada un d'ells per separat, el que suggereix que hi ha subadditivisme entre els dos compostos.



**Figura 4.18. Efecte de la doxorubicina sola (●) i de la doxorubicina combinada amb el lligand 1 (○) en les cèl·lules HMLE<sup>ShEcad</sup> i HMLER<sup>ShEcad</sup>.** Les cèl·lules es van incubar durant 48 hores amb concentracions creixents (0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,15, 0,3 µM) de doxorubicina sola o amb concentracions creixents de doxorubicina en presència d'una concentració fixa de lligand 1 (5 µM). La viabilitat cel·lular es va mesurar mitjançant la tècnica MTT. Es representen els valors de la mitjana ± SD de, almenys, tres experiments independents.

La possible interacció entre el lligand 1 i la doxorubicina es va analitzar mitjançant el mètode isobologràfic descrit per Berenbaum (Berenbaum 1989). En ambdós línies cel·lulars (HMLE<sup>ShEcad</sup> i HMLER<sup>ShEcad</sup>), únicament quan la concentració de la doxorubicina és de 0,15 µM l'índex d'interacció és inferior o igual a 1, en canvi, la majoria dels índexs d'interacció a les concentracions assajades són superiors a 1, amb un valor de mitjana de  $1,16 \pm 0,08$  (significativament diferent de 1) en les cèl·lules HMLE<sup>ShEcad</sup>, i de  $1,2 \pm 0,24$  (significativament diferent de 1) en les cèl·lules HMLER<sup>ShEcad</sup> (taula 4.6). Segons aquest mètode, aquests resultats indiquen que la interacció entre el lligand 1 i la doxorubicina és antagonística.

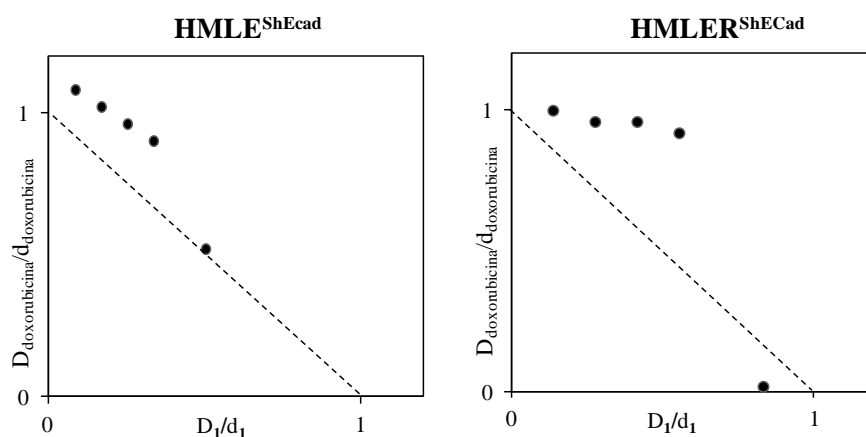
S'han situat als isoblogrames els punts que representen les dosis isoeffectives ( $D_1/d_1$  i  $D_{\text{doxorubicina}}/d_{\text{doxorubicina}}$ ), els quals majoritàriament es troben per sobre de la línia d'additivitat ( $>1$ ), indicant antagonisme (figura 4.19).



**Taula 4.6. Valors dels índexs d'interacció (Ix) per la combinació del lligand 1 i diferents concentracions de doxorubicina quan la inhibició de la viabilitat cel·lular és del 50% en les cèl·lules HMLE<sup>ShEcad</sup> i del 30% en les cèl·lules HMLER<sup>ShEcad</sup>.**

Doxorubicina ( $\mu\text{M}$ )	Línia cel·lular	
	HMLE <sup>ShEcad</sup>	HMLER <sup>ShEcad</sup>
0.025	1.16	1.13
0.05	1.18	1.19
0.075	1.21	1.37
0.1	1.23	1.47
0.15	1.02	0.85
Mitjana $\pm$ DS	1.16* $\pm$ 0.08	1.20* $\pm$ 0.24

\*Significativament diferent de 1 ( $p < 0.05$ )



**Figura 4.19. Isobologrames de la interacció entre el lligand 1 i la doxorubicina en les cèl·lules HMLE<sup>ShEcad</sup> i HMLER<sup>ShEcad</sup> a les 48 hores de tractament.** La línia diagonal és la línia d'additivitat. Els valors que estan per sobre d'aquesta línia indiquen una interacció antagonística i, per contra, els valors que estan per sota d'aquesta línia indiquen una interacció sinèrgica.

---

# 5 Discussió

---



Pel desenvolupament de noves teràpies contra el càncer és essencial estudiar les diferències entre les cèl·lules tumorals i les cèl·lules normals. Es coneix que les cèl·lules tumorals presenten de forma constitutiva nivells de ROS més elevats que les cèl·lules no tumorals, i s'ha plantejat que podrien presentar una major vulnerabilitat enfront agents pro-oxidants que les cèl·lules no tumorals. És per això, que en els darrers anys està creixent l'interès en desenvolupar noves estratègies terapèutiques dirigides a modificar l'estat redox de les cèl·lules tumorals per induir un estrès oxidatiu que condueixi a la seva mort (Wondrak 2009; Trachootham, Alexandre, and Huang 2009). Això ens ha dut a analitzar un conjunt de complexos metàl·lics sintetitzats pel QBIS-CAT (UdG), els quals es caracteritzen per generar espècies altament oxidants quan reaccionen amb agents oxidants, com peròxids. Aquests espècies intermèdies poden oxidar molècules com alcans, alquens o l'aigua (Costas and Que 2002; Cusso et al. 2013; Company et al. 2007; Company et al. 2014; Chen MS 2007). Aquests complexos metàl·lics podrien desencadenar reaccions cícliques redox a l'interior de la cèl·lula tumoral, incrementant els nivells de ROS, i en conseqüència, desencadenant l'estrès oxidatiu i l'apoptosi.

En l'estudi s'han inclòs 35 compostos, agrupats en 12 famílies. Cada família comprenia els lligands sense conjugar (**1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11** i **12**), que diferien en l'estructura química i en els punts de coordinació amb els metalls i els corresponents complexos amb metalls de transició: Fe(II), Mn(II), Cu(II) o Co(II). Inicialment es va fer un cribratge amb dues línies tumorals (CAPAN-1 i MCF-7) amb la finalitat d'escollir compostos amb major citotoxicitat per a posteriorment dur a terme l'estudi de la seva activitat antitumoral.

En contra de la hipòtesi inicial, s'ha observat que els complexos de Fe(II) analitzats, tot i ser potents agents prooxidants, presenten una activitat citotòxica molt poc rellevant o fins i tot, nul·la, a excepció d'un d'ells, el compost **1-Fe**, el qual és actiu en cèl·lules MCF-7. El mateixos resultats s'han obtingut amb els dos complexos de Cu(II) analitzats, els quals han mostrat ser inactius en les dues línies

cel·lulars tumorals. En el cas del complex de Co(II) l'absència d'activitat citotòxica era esperada, ja que és un metall molt inert, amb poca activitat redox. La baixa o nul·la activitat dels complexos metàl·lics podria estar relacionada amb la dificultat de les molècules amb càrrega per travessar la membrana cel·lular. La conjugació del metall confereix càrrega positiva a la naturalesa apolar dels lligands, el que dóna lloc a molècules menys solubles en la bicapa lipídica altament apolar, i per tant amb més dificultats o pèrdua de la capacitat per travessar la membrana cel·lular. Per altra banda, les diferències en la citotoxicitat dels diferents complexos metàl·lics (Co(II), Cu(II), Mn(II), Fe(II)) podria estar relacionada en l'impacte dels metalls sobre el potencial redox dels complexos formats, és a dir, la citotoxicitat de diferents complexos metàl·lics que comparteixen un mateix lligand varia en funció del metall coordinat ja que aquest determina el potencial redox del lligand (Jungwirth et al. 2011).

Els resultats inicials van mostrar que tant el lligands com el complexos de Mn analitzats, presentaven una activitat antitumoral rellevant. Tot i que hi ha estudis que demostren que hi ha compostos de Mn amb activitat antitumoral (J. Liu et al. 2015; X. Li et al. 2014), el fet que els nostres resultats mostrin uns valors de IC<sub>50</sub> pels complexos de Mn(II) d'un ordre similar a la dels lligands ens va portar a plantejar la hipòtesi de que l'activitat dels complexos de Mn es podria explicar pel fet que la unió dels lligands amb el Mn(II) (pel fet de presentar una configuració electrònica d<sup>5</sup>) és més làbil que amb la resta de metalls de transició, i els complexos es podrien dissociar en el medi aquós, obtenint-ne el lligand orgànic lliure. El lligand amb naturalesa apolar, llavors podria travessar fàcilment la membrana cel·lular i generar intracel·lularment complexos metàl·lics altament oxidants (Seddon et al. 2009; Z. D. Liu and Hider 2002; D. Kalinowski and Richardson 2005; Chaston et al. 2004).

En base a la bona solubilitat i activitat citotòxica dels lligands **1, 2, 3, 4 i 5**, aquests es van seleccionar per a caracteritzar la seva activitat biològica.

Aquests lligands mantenen la seva activitat citotòxica enfront la majoria de les línies cel·lulars tumorals assajades (5 línies cel·lulars tumorals), amb uns valors de  $IC_{50}$  en el rang micromolar, similars als del cisplatí. Per altra banda, s'ha vist que els lligands **1**, **2**, **3**, **4** i **5** presenten menys citotoxicitat enfront les cèl·lules no tumorals, en concret front la línia de fibroblastes de còlon humans CCD18-Co. Aquesta menor citotoxicitat no es va observar en la línia de fibroblasts humans 1BR3G, en les quals els valors de  $IC_{50}$  coincidien en alguns casos amb els obtinguts en alguna de les línies cel·lulars tumorals assajades. La diferent sensibilitat de les dues línies no tumorals a l'activitat dels lligands es podria explicar pel fet que les cèl·lules CCD18-Co no han estat transformades per a ser immortals, mentre que els fibroblastes 1BR3G han estat transformats amb el plasmidi pSV3gpt, que expressa l'antigen SVt40, i per tant, presenten un fenotip proliferatiu similar al de les cèl·lules tumorals i en conseqüència, major susceptibilitat als agents citotòxics. Per acabar de caracteritzar la citotoxicitat dels compostos envers cèl·lules no tumorals, es va analitzar la seva activitat hemolítica enfront eritròcits humans. De forma molt positiva, s'ha determinat que no són tòxics pels eritròcits, propietat favorable per a la seva potencial utilització en teràpies antitumorals en pacients. En aquests estudis, es va comprovar que en totes les línies tumorals analitzades, els lligands **3** i **4** presentaven una activitat més moderada, de manera que els estudis posteriors s'han centrat únicament amb els lligands **1**, **2** i **5**.

L'estudi de l'activitat citotòxica dels lligands **1**, **2** i **5** es va ampliar enfront un ampli panell de línies de leucèmia, limfoma i glioma (8 línies cel·lulars tumorals). Els resultats han determinat que en aquestes cèl·lules els lligands presenten una potent activitat antiproliferativa amb uns valors de  $IC_{50}$  baixos, essent uns resultats similars als obtinguts prèviament en les línies cel·lulars tumorals assajades.

Per a caracteritzar el mecanisme d'acció dels lligands, es van realitzar assaigs de clonogènia, els quals permeten determinar si un compost provoca un dany irreparable a les cèl·lules i, en conseqüència, inhibeix la seva capacitat per dividir-

se i generar clons o tumors. Els resultats han demostrat que els lligands **1**, **2** i **5** inhibeixen la capacitat de les cèl·lules de dividir-se, el que indica que indueixen un dany permanent a la cèl·lula, que seria compatible amb la generació d'elevats nivells ROS que poden induir un dany oxidatiu al DNA (Klaunig, Kamendulis, and Hocevar 2010; Pelicano, Carney, and Huang 2004). Per altra banda, s'ha observat que la inhibició de la formació de colònies incrementa amb el temps d'exposició als compostos, i que és especialment rellevant en el cas del lligand **2**. Els assaigs de clonogènia també han mostrat que el mecanisme de mort cel·lular induït per aquests lligands és lent, en comparació a l'activitat del cisplatí, ja que requereix major temps d'exposició de les cèl·lules al compost per inhibir la formació de colònies.

Per a caracteritzar el mecanisme de mort cel·lular induït pels compostos es va determinar l'activitat caspasa 3 i 7, indicativa d'apoptosi, i l'efecte dels compostos a nivell del cycle cel·lular. Els resultats mostren diferències entre l'activitat pro-apoptòtica dels lligands en les diferents línies cel·lulars assajades. Els lligands **2** i **5** indueixen l'apoptosi, ja que incrementen l'activitat caspasa en la majoria de les línies cel·lulars assajades, en canvi, el lligand **1**, només indueix la mort cel·lular per apoptosi en determinades línies cel·lulars: cèl·lules de limfoma no-Hodgkin's, cèl·lules de glioma U87MG i cèl·lules CAPAN-1, MCF-7 i 1BR3G.

A l'analitzar l'efecte dels lligands **1**, **2** i **5** sobre la progressió del cycle cel·lular de cèl·lules tumorals MCF-7 i LN229, es veu que lligand **2** atura el cycle cel·lular a la fase  $G_0/G_1$  a les 24 hores de tractament en ambdós línies cel·lulars, seguit d'un increment de la població de cèl·lules apoptòtiques a les 48 hores, el que es confirma amb l'increment de l'activitat de les caspases 3 i 7 anteriorment descrites. El lligand **5**, en canvi, atura el cycle cel·lular a la fase  $G_2/M$  a les 24 hores de tractament, el que indica que aquest lligand presenta un mecanisme d'acció diferent, que també acaba induint l'apoptosi de les cèl·lules tal com indica l'increment d'activitat caspasa i l'increment de la població sub- $G_1$  a les 48 hores. El lligand **1**, a diferència dels altres lligands, a la concentració assajada només

provoca efectes evidents a les 48 hores de tractament, en concret, incrementa la població de cèl·lules apoptòtiques en les cèl·lules MCF-7, i redueix la població de cèl·lules en fase S en les cèl·lules LN229. L'efecte observat pel lligand **2** sobre el cycle cel·lular seria similar al de l'agent quelant de ferro DFO, el qual inhibeix l'entrada a la fase S del cycle cel·lular i en conseqüència, incrementa la població de cèl·lules en fase  $G_0/G_1$ , desencadenant posteriorment l'apoptosi (D R Richardson and Milnes 1997). Se sap que les cèl·lules no poden fer la transició de fase  $G_0/G_1$  a fase S degut a la davallada del ferro intracel·lular generada per l'agent quelant de ferro, el que inhibeix la ribonucleòtid reductasa i altres enzims dependents d'aquest metall implicats en la síntesi i reparació del DNA. A més, baixos nivells de ferro afecten l'expressió de molècules involucrades en la progressió del cycle cel·lular com la ciclina D1, p21 o Ndrp1 (D. S. Kalinowski and Richardson 2007; Suzy V Torti and Torti 2013). Per altra banda, el lligand **5**, tot i que s'ha vist que la seva activitat citotòxica no és principalment deguda a la inducció de ROS, tindria un efecte sobre el cycle cel·lular similar al que provoquen els agents generadors de ROS, els quals indueixen l'aturada del cycle cel·lular a la fase  $G_2/M$ . L'increment de la població de cèl·lules a la fase  $G_2/M$  és degut a la inhibició de la ciclina Cdc25C causada per ROS, la qual és necessària per la transició a la fase M (Z. Zhang et al. 2013; Verbon, Post, and Boonstra 2012). Val a dir que s'ha vist que, tot i que la majoria dels agents inductors de ROS incrementen la població de cèl·lules en fase  $G_2/M$ , alguns d'ells incrementen la població de cèl·lules en fase  $G_0/G_1$ . Això pot ser per diverses causes, com per exemple, que l'agent afecti les ciclines D i les quinases dependents de ciclines CDK4, i en conseqüència, aturi el cycle cel·lular en aquesta determinada fase cel·lular (Bair, Palchaudhuri, and Hergenrother 2010; Pizzimenti et al. 1999).

L'avaluació de l'activitat oxidativa mitjançant citometria de flux ha demostrat que els lligands **1** i **2** són potents inductors d'estrès oxidatiu, els quals generen un increment de més de 5 vegades els nivells basals de ROS de les cèl·lules CAPAN-1, mentre que l'activitat oxidativa del lligand **5** és més moderada, doblant els nivells



de ROS en aquesta línia cel·lular. El perfil cinètic dels nivells de ROS en les cèl·lules és paral·lel als resultats obtinguts en els assajos clonogènics, el que indica que es requereix una exposició prolongada als lligands per sobrepassar els nivells de ROS, capaços de comprometre la viabilitat cel·lular. S'ha detectat que els lligands presenten una activitat oxidativa inferior en les cèl·lules MCF-7 i en les cèl·lules Jurkat en comparació amb les cèl·lules CAPAN-1, tot i que l'activitat citotòxica és similar. Els resultats de citometria de flux van mostrar que en les cèl·lules MCF-7, el lligand **2** és el que presenta més activitat oxidativa, resultat que es corrobora amb les imatges de microscòpia confocal. La vulnerabilitat de les cèl·lules tumorals a l'estrès oxidatiu és molt dependent de les vies desregulades en aquestes i de les seves condicions antioxidants (Montero and Jassem 2011), per tant, diferents alteracions en els nivells de ROS poden conduir a resultats citotòxics similars en diferents tumors. Per exemple, els limfòcits de leucèmia limfocítica crònica (LLC) presenten un estat permanent d'estrès oxidatiu, el que pot incrementar la resposta citotòxica a teràpies prooxidants (Oltra et al. 2001; Al-Gayyar et al. 2007).

Els assajos amb l'antioxidant NAC han mostrat que la reducció dels nivells de ROS resulta en un increment de la viabilitat cel·lular quan les cèl·lules són tractades amb els lligands **1** i **2**, el que confirma que l'estrès oxidatiu intervé en la inducció de la mort cel·lular. Per contra, es va observar poc efecte de l'antioxidant sobre els nivells de ROS generats pel lligand **5**, i en conseqüència, sobre la citotoxicitat. Aquests resultats indiquen que no es pot descartar que estiguin implicats altres mecanismes en l'activitat citotòxica del lligand **5**.

Se sap que privar les cèl·lules de ferro pot conduir a la mort cel·lular ja que aquest metall és essencial per a la síntesi del DNA i el creixement cel·lular (D. Kalinowski and Richardson 2005; De Domenico, McVey Ward, and Kaplan 2008; Suzy V Torti and Torti 2013). Estudis i assajos clínics han revelat que agents quelants de ferro són eficaços agents antitumorals, tant per la seva activitat quelatant, com per la seva acció prooxidant (Whitnall et al. 2006; Lovejoy et al. 2011; Bystrom, Guzman, and Rivella 2013). Per determinar si la generació de ROS induïda pels lligands **1**, **2**

i **5** està associada a l'elevada capacitat d'aquests per unir-se al ferro intracel·lular, primerament s'ha fet un estudi amb la sonda calceina-AM, en el qual s'ha confirmat la capacitat dels lligands per quelar el ferro intracel·lular. Posteriorment, s'ha analitzat si la davallada dels nivells de ferro intracel·lular causada per l'activitat quelant dels lligands pot estar implicada en la seva activitat antitumoral. Els resultats d'aquest estudi han revelat que l'activitat citotòxica dels lligands no es reverteix quan les cèl·lules es sobrecarreguen amb ferro ( $\text{FeCl}_2$ ) per compensar el Fe segrestat pel lligands. Al contrari, a l'incrementar els nivells de ferro intracel·lular es desencadena un augment de l'activitat citotòxica dels compostos, probablement degut a un increment en la formació de complexos de ferro oxidants a l'interior de la cèl·lula, fet que comporta un increment significatiu dels nivells de ROS intracel·lular, tal com s'ha vist mitjançant citometria de flux. Per tant, l'efecte antitumoral dels lligands es basa en la seva elevada activitat oxidativa i no en la seva capacitat quelant de ferro. Per altra banda, s'ha confirmat que la formació extracel·lular dels complexos de ferro mitjançant la co-incubació dels lligands amb  $\text{FeCl}_2$ , inhibeix la seva activitat citotòxica.

Diversos compostos antitumorals amb propietats d'unió a metalls són capaços d'induir talls en la cadena de DNA quan s'ha format el complex de metall redox actiu en presència d'oxigen (Suzy V Torti and Torti 2013). La bleomicina constitueix un exemple que es troba en ús en la quimioteràpia actual. Se sap que la citotoxicitat d'aquesta es basa en un mecanisme prooxidant dependent de metall que desencadena la fragmentació del DNA per talls de cadena simple o de doble cadena. L'activació de la bleomicina [BLM-Fe(III)-OOH] requereix la unió a ferro ferrós (o altres metalls de transició com el Cu(II)), una molècula d'oxigen i un agent reductor (Wondrak 2009; Hecht 2000). En l'anàlisi de la interacció dels lligands i els complexos de ferro amb el DNA plasmídic s'ha observat que només els complexos metàl·lics (**1-Fe**, **2-Fe** i **5-Fe**) presenten activitat nucleasa, produint doble talls en el DNA en presència de peròxid d'hidrogen. En aquests estudis s'han utilitzat els complexos metàl·lics directament donat que a la solució de treball hi

ha absència de ferro, a diferència de l'interior de les cèl·lules, on el lligand es complexa al ferro. Els resultats han mostrat que en l'activitat nucleasa dels complexos de ferro **1-Fe** i **2-Fe** hi ha implicats diferents ROS; mentre que en l'activitat nucleasa del complex de ferro **5-Fe** sembla que només està implicat l'oxigen singlet. Aquesta observació concorda en la menor capacitat de generar ROS descrita prèviament pel lligand **5**. Per altra banda, s'ha determinat que no hi ha una especificitat d'interacció dels complexos per un solc concret del DNA, el que concorda amb el fet que el dany al DNA es produeix per mecanismes oxidatius. S'ha vist que els lligands **1**, **2** i **5** actuen de manera similar a la bleomicina, produint dobles talls en el DNA cel·lular, amb una cinètica que és paral·lela a l'acumulació intracel·lular de ROS. En conjunt, els resultats d'ambdós estudis indiquen que els complexos de ferro indueixen dany oxidatiu al DNA mitjançant ROS, provocant talls en la doble cadena de DNA.

Per determinar la capacitat d'internalitzar d'un dels lligands actius, en concret, del lligand **1**, les cèl·lules MCF-7 s'han tractat amb el lligand **1** fluoresceïnat **1-CF**. Les imatges obtingudes per microscòpia confocal confirmen l'entrada del lligand **1-CF** a les cèl·lules, i que la seva acumulació incrementa amb el temps d'exposició (fins a les 6 hores). Aquests resultats s'han confirmat quantitativament per citometria de flux, en cèl·lules MCF-7 i CAPAN-1, on es corrobora que la internalització del lligand augmenta amb el temps ja que la intensitat de la fluorescència mitjana intracel·lular incrementa a mesura que s'incrementa el temps d'incubació amb el lligand.

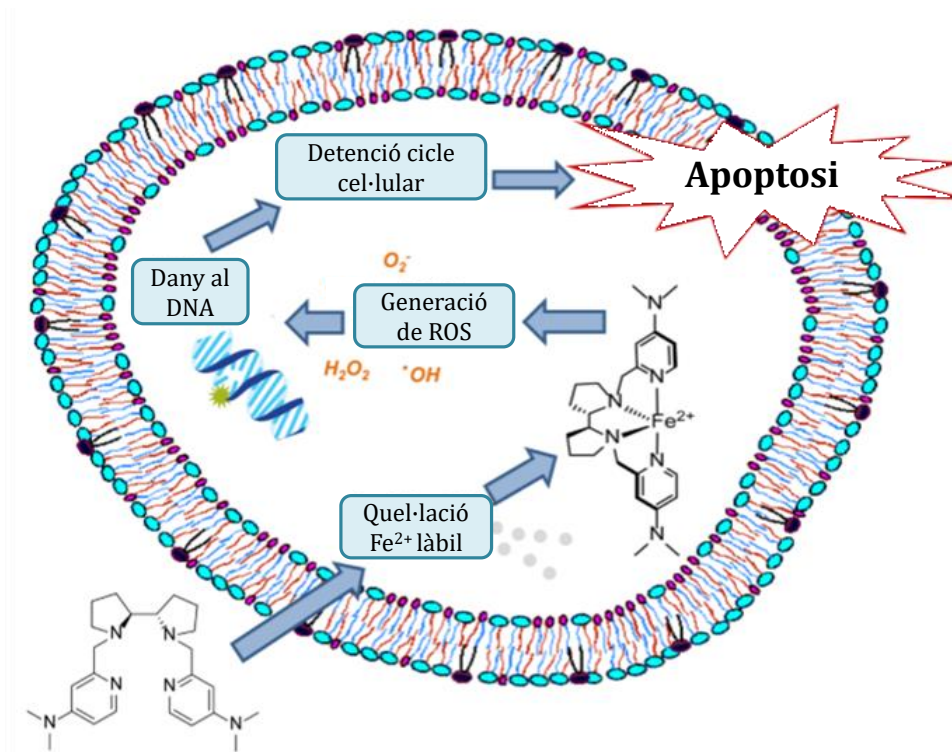
Degut a que un tumor comprèn dues poblacions de cèl·lules, la població de cèl·lules tumorals, i la població de CSC, es va decidir analitzar l'activitat citotòxica dels lligands **1**, **2** i **5** en cèl·lules amb propietats de cèl·lula mare tumoral (*CS-like cells*) i el seu potencial en teràpies combinades amb doxorubicina, un agent que s'utilitza actualment, concretament en el tractament de càncer de mama, el qual genera efectes secundaris en els pacients i enfront el qual les cèl·lules tumorals adquireixen resistència.

S'ha vist que els lligands **1**, **2** i **5** també presenten activitat antiproliferativa enfront els models de cèl·lules mare tumoral EMT (HMLE<sup>ShEcad</sup> i HMLER<sup>ShEcad</sup>), amb uns valors de IC<sub>50</sub> similars als obtinguts en les cèl·lules tumorals, el que incrementa l'interès dels lligands com a potencials agents capaços d'eliminar tots els subtipus cel·lulars del tumor.

Per altra banda, els models de CSC, (HMLE<sup>ShEcad</sup> i HMLER<sup>ShEcad</sup>) han mostrat una sensibilitat per la doxorubicina similar a la descrita en estudis previs, demostrant que aquestes cèl·lules són més resistents a la doxorubicina que les respectives línies cel·lulars isogèniques (HMLE<sup>ShCntrl</sup> i HMLER<sup>ShCntrl</sup>) (Saxena et al. 2011; Gupta et al. 2009). S'han estudiat els efectes citotòxics de la teràpia combinada de l'agent doxorubicina amb el lligand **1**, el lligand més actiu en aquests models cel·lulars. L'anàlisi de la interacció entre el lligand **1** i la doxorubicina amb el mètode isobologràfic descrit per Berenbaum, indica que hi ha una interacció antagonística, amb un valor mig significativament diferent de 1.

En **conclusió**, l'activitat antitumoral dels lligands estudiats es basa en diferents processos interdependents: la quelació del Fe (II) intracel·lular, la formació de complexos de ferro actius a l'interior de la cèl·lula i la posterior generació de ROS, la fragmentació del DNA a través de mecanismes oxidatius, la inducció de l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi. Però tot i que aquests processos estan associats amb els efectes citotòxics causats pels lligands, no podem excloure que hi hagi involucrats mecanismes de citotoxicitat addicionals, especialment en l'activitat antitumoral del lligand **5**, el qual presenta una activitat antiproliferativa i proapoptòtica similar a la dels lligands **1** i **2**, però una limitada generació de ROS. És important destacar que els lligands són menys citotòxics enfront cèl·lules no tumorals, que no són hemolítics i que mantenen la seva citotoxicitat enfront *CS-like cells* i *non-CS like cells*. Per tant, aquests lligands són prometedors agents antitumorals, els quals poden eliminar selectivament les cèl·lules canceroses, aprofitant propietats d'aquestes com els elevats nivells de ROS i de ferro

intracel·lular que presenten (Cairns, Harris, and Mak 2011; Suzy V Torti and Torti 2013); i les cèl·lules mare tumorals, causants de la metàstasi. Aquestes drogues representarien, doncs, una alternativa als tractaments quimioterapèutics actuals, especialment en els casos en que s'estableixen resistències, el que contribuiria a solucionar un problema de primer ordre en el camp de la biomedicina



**Figura 5.1. Mecanisme d'acció dels lligands.** L'activitat antitumoral dels lligands es basa en diferents processos interdependents: la quel·lació del Fe (II) intracel·lular, la generació de complexos de ferro actius a l'interior de la cèl·lula i la posterior generació de ROS, la fragmentació del DNA a través de mecanismes oxidatius, la inducció de l'aturada del cicle cel·lular i, finalment, l'apoptosi.

## Altres estudis realitzats durant la tesi

Durant la realització de la tesi he participat en diferents estudis centrats en la utilització de CPPs com a estratègia per millorar l'activitat d'agents antitumorals. L'objectiu d'aquests estudis és sintetitzar CPP's capaços d'unir-se a lligands amb activitat citotòxica, amb la finalitat d'incrementar la seva internalització, i per tant, la seva activitat, en les cèl·lules tumorals.

El disseny i síntesi dels conjugats es va realitzar al laboratori LIPSO de la Univesitat de Girona (com a treball de tesi de la Marta Soler i sota la direcció de les Doctores Lídia Feliu i Marta Planas). La meva contribució va ser la caracterització de la activitat biològica dels diferents conjugats sintetitzats. Els resultats obtinguts van donar lloc a 5 publicacions científiques, 3 de les quals formen part de la tesi de la doctora Marta Soler.

En el primer treball es va seleccionar el pèptid BP16 com a CPP. El BP16 és un pèptid amb activitat antimicrobiana (antimicrobial peptide, AMP) lineal i catiònic (KKLFFKKILKKL), membre de la llibreria CECMEL11. Aquest CPP és capaç d'adoptar una estructura amfipàtica i no presenta activitat citotòxica i ni hemolítica (Soler et al. 2014). A la seqüència del pèptid, es va afegir la seqüència CREKA, pèptid vehiculitzador (HP) (Cys-Arg-Glu-Lys-Ala), que s'uneix a la fibrina present als vasos i a l'estroma intersticial dels tumors (Svensen, Walton, and Bradley 2012). Seguidament es va conjuguar el pèptid BP16-CREKA a Clorambucil (Clb), un derivat de mostassa nitrogenada inespecífic i poc permeable enfront la membrana cel·lular, que actua com agent alquilant i que s'empra en casos de leucèmia, càncer d'ovari, de pulmó o de mama (Rajski and Williams 1998). Els resultats d'aquest estudi indiquen que la citotoxicitat del Clb es veu incrementada quan es conjuga tant a BP16-CREKA com a BP16 únicament, demostrant que BP16 és un excel·lent transportador de drogues a l'interior de cèl·lules tumorals. A més, es va caracteritzar el mecanisme d'internalització del conjugat (Soler et al. 2014).

Posteriorment, es va estudiar la influència de la conjugació del Clb a l'extrem N- o C- terminal de dos CPPs (BP16 i BP308 (anàleg d'arginina de BP16)) sobre la seva activitat citotòxica i la capacitat d'internalització en les cèl·lules tumorals. Es va observar que l'activitat citotòxica millorava significativament quan el Clb es conjugava tant a l'extrem N- com C- terminal del BP16 o a l'extrem N-terminal del BP308, mentre que el Clb sol no era actiu. Donat que la internalització del CPP BP16 es dona principalment en cèl·lules tumorals a través d'un mecanisme d'endocitosis depenent de clatrina i es localitza a endosomes tardans, es va avaluar l'efecte de la incorporació de la seqüència Gly-Phe-Leu-Gly (GFLG) al pèptid. Aquesta seqüència es reconeguda per l'enzim catepsina, proteasa abundant a lisosomes, el qual la hidrolitza selectivament. D'aquesta manera, s'alliberaria el Clb a l'interior de la cèl·lula i s'incrementaria la citotoxicitat d'aquest. Es va veure que la presència de la seqüència GFLG, tant a l'extrem N- com al C- terminal del conjugat Clb-BP16 incrementava encara més la citotoxicitat, el que es podria atribuir a l'alliberament selectiu de la droga al compartiment lisosomal (Soler, González-Bártulos, et al. 2015).

També es va treballar amb els lligands sintetitzats pel grup QBIS-CAT **Pytacn** (lligand **4**) i **bpbp** (lligand **1**). Aquests lligands es van complexar als metalls de transició Zn(II) i Cu(II) i es van conjuguar a una curta seqüència peptídica catiònica, LKKL. Seguidament es analitzar si els complexos presentaven activitat nucleasa front el DNA, i si aquesta variava per la conjugació a la seqüència peptídica. Es va veure que els metal·lopeptids (Cu) presentaven major capacitat d'escissió del DNA que els corresponents complexos Cu(II)-**Pytacn** i Cu(II)-**bpbp**. Assajos addicionals, indiquen que l'increment en l'activitat d'escissió del DNA és deguda a la presència de la seqüència catiònica LKKL, la qual indueix la unió amb el DNA (que té una càrrega neta negativa) i incrementa la proximitat del metall a aquest, de manera que pot provocar més fàcilment l'escissió (Soler, Figueras, et al. 2015).

Finalment, es va estudiar l'efecte sobre la citotoxicitat dels lligands **Pytacn** i **bpbp** al conjugar-los a l'extrem N- o C- terminal del CPP BP16-GFLG. Es va veure que la

posició dels lligands influïa sobre la citotoxicitat d'aquests. També es va comprovar que els conjugats amb el lligands BPBP eren més actius que els conjugats amb el lligand **Pytactn**, i que la seqüència GFLG incrementava la citotoxicitat dels conjugats amb el lligand BPBP (Soler et al. 2016).

Globalment, aquests resultats indiquen que la conjugació dels agents citotòxics a pèptids que facilitin la seva internalització en les cèl·lules tumorals és una estratègia efectiva per a millorar la seva eficàcia terapèutica. Aquesta estratègia es podria aplicar també per incrementar l'efectivitat de les teràpies pro-oxidants en el tractament del càncer.









- I. Després de l'anàlisi de 12 famílies de complexos metàl·lics i els corresponents lligands, s'han identificat 5 lligands (**1**, **2**, **3**, **4** i **5**) amb activitat citotòxica enfront cèl·lules tumorals, essent els lligands **1**, **2** i **5** els més actius, amb una  $IC_{50}$  similar a la del cisplatí.
- II. Només un dels complexos de ferro analitzats, **1-Fe**, presenta activitat antitumoral, concretament en cèl·lules de càncer de mama MCF-7. Cap dels complexos de coure o cobalt són citotòxics. Els complexos de manganès, en canvi, presenten una activitat similar a la del lligand lliure de metall.
- III. Els lligands **1**, **2** i **5** presenten una activitat citotòxica enfront línies cel·lulars tumorals de diferents orígens: mama, pàncrees, pròstata, glioma, cèl·lules de limfoma no-Hodgkin i cèl·lules de leucèmia limfoide. La seva citotoxicitat és menor en les cèl·lules no tumorals CCD-18. Cap dels lligands presenta activitat hemolítica.
- IV. Els lligands **1**, **2** i **5** inhibeixen la capacitat de les cèl·lules MCF-7 per créixer i generar colònies amb una cinètica més lenta que la observada pel cisplatí.
- V. Els lligands **1**, **2** i **5** indueixen l'activació de les caspases 3 i 7, les quals són marcadors característics de la inducció de l'apoptosi.
- VI. A les 24 hores de tractament, el lligand **2** indueix una aturada del cicle cel·lular en fase  $G_0/G_1$ . El lligand **5**, en canvi, indueix una aturada a la fase  $G_2/M$ . El lligand **1**, per contra, no provoca grans efectes en el cicle cel·lular, indicant que els lligands presenten diferents mecanismes d'acció. Els tres lligands, però, a les 48 hores, incrementen el percentatge de cèl·lules apoptòtiques.

- VII. El lligand **2** incrementa significativament els nivells de ROS en les cèl·lules tumorals MCF-7, CAPAN-1 i JURKAT, mentre que els lligands **1** i **5** només incrementen significativament aquests nivells en les cèl·lules CAPAN-1. L'activitat oxidativa del lligand **5** és més moderada que la dels lligands **1** i **2**.
- VIII. L'activitat oxidativa dels lligands **1** i **2** es veu reduïda per l'antioxidant NAC. Paral·lelament el NAC redueix la seva citotoxicitat, el que indica que l'estrès oxidatiu està implicat en el seu mecanisme d'inducció de mort cel·lular.
- IX. Els nivells intracel·lulars de ferro disminueixen en les cèl·lules tractades amb els lligands **1**, **2** i **5**, el que indica que aquests quelen el Fe (II) intracel·lular, i per tant podrien generar els complexos altament oxidants a l'interior de la cèl·lula. S'ha demostrat, però, que l'activitat citotòxica dels lligands no està associada a la seva capacitat de segrestar el ferro intracel·lular sinó a la seva activitat oxidativa un cop han complexat el ferro intracel·lular.
- X. Els complexos **1-Fe**, **2-Fe** i **5-Fe** indueixen dany oxidatiu al DNA cel·lular mitjançant ROS, provocant talls de doble cadena en el DNA.
- XI. Els lligands **1**, **2** i **5** presenten activitat antiproliferativa enfront *CS-like cells* de mama, amb uns valors de IC<sub>50</sub> similars als obtinguts en les corresponents cèl·lules tumorals.
- XII. Els efectes citotòxics de la combinació del lligand **1** amb la doxorubicina en les línies *CSC-like cells* presenten una interacció antagonística segons el mètode isobologràfic descrit per Berenbaum.

- XIII. Tot i que els lligands presenten una activitat antitumoral principalment dirigida a alterar l'estat redox de les cèl·lules tumorals i a generar la seva mort per mecanismes oxidatius, no podem excloure que altres mecanismes puguin estar contribuint a la seva citotoxicitat, especialment del lligand **5**.









- Acharya, Asha, Ila Das, Des Chandhok, and Tapas Saha. 2010. "Redox Regulation in Cancer: A Double-Edged Sword with Therapeutic Potential." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3 (1): 23–34. doi:10.4161/oxim.3.1.10095.
- Ahuia, P, P Zhao, R Ruan, P Korge, a Olson, M Portman, Y Wang, J N Weiss, and W R MacLellan. 2009. "Transcriptional Regulation of Cardiac Metabolism and Mitochondrial Biogenesis in Response to Pathological Stress." *Journal of In Press* (5). doi:10.1172/JCI38331.1494.
- Alexandre, Jérôme, Frédéric Batteux, Carole Nicco, Christiane Chéreau, Alexis Laurent, Loïc Guillevin, Bernard Weill, and François Goldwasser. 2006. "Accumulation of Hydrogen Peroxide Is an Early and Crucial Step for Paclitaxel-Induced Cancer Cell Death Both in Vitro and in Vivo." *International Journal of Cancer* 119 (1): 41–48. doi:10.1002/ijc.21685.
- Al-Gayyar, Mohammed M H, Laila a Eissa, Ahmed M Rabie, and Amal M El-Gayar. 2007. "Measurements of Oxidative Stress Status and Antioxidant Activity in Chronic Leukaemia Patients." *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59 (3): 409–17. doi:DOI 10.1211/jpp.59.3.0011.
- Al-Hajj, Muhammad, Max S Wicha, Adalberto Benito-Hernandez, Sean J Morrison, and Michael F Clarke. 2003. "Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 3983–88. doi:10.1073/pnas.0530291100.
- Ames, B N, M K Shigenaga, and T M Hagen. 1993. "Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (17): 7915–22. doi:10.1073/pnas.90.17.7915.
- Ayoub, Nabieh, Anand D. Jeyasekharan, Juan a. Bernal, and Ashok R. Venkitaraman. 2009. "Paving the Way for H2AX Phosphorylation: Chromatin Changes in the DNA Damage Response." *Cell Cycle* 8 (10): 1494–1500. doi:10.4161/cc.8.10.8501.
- Bachmann, Martin F, and Annette Oxenius. 2007. "Interleukin 2: From Immunostimulation to Immunoregulation and Back Again." *EMBO Reports* 8 (12): 1142–48. doi:10.1038/sj.embor.7401099.
- Bair, Joseph S, Rahul Palchaudhuri, and Paul J Hergenrother. 2010. "Chemistry and Biology of Deoxyxyboquinone, a Potent Inducer of Cancer Cell Death." *Journal of the American Chemical Society* 132: 5469–78.

- Bao, Shideng, Qiulian Wu, Roger E McLendon, Yueling Hao, Qing Shi, Anita B Hjelmeland, Mark W Dewhirst, Darell D Bigner, and Jeremy N Rich. 2006. "Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response." *Nature* 444 (7120): 756–60. doi:10.1038/nature05236.
- Bassan, Arianna, Margareta R a Blomberg, Per E M Siegbahn, and Lawrence Que. 2002. "A Density Functional Study of O-O Bond Cleavage for a Biomimetic Non-Heme Iron Complex Demonstrating an FeV-Intermediate." *Journal of the American Chemical Society* 124 (37): 11056–63. doi:10.1021/ja026488g.
- Bedard, Karen, and Karl-Heinz Krause. 2007. "The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology." *Physiological Reviews* 87 (1): 245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005.
- Berenbaum, M C. 1989. "What Is Synergy?" *Pharmacological Reviews* 41: 93–141.
- Bhatia, M, J C Wang, U Kapp, D Bonnet, and J E Dick. 1997. "Purification of Primitive Human Hematopoietic Cells Capable of Repopulating Immune-Deficient Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (10): 5320–25. doi:10.1073/pnas.94.10.5320.
- Borrás, Joaquín, Gloria Alzuet, Marta González-Alvarez, Jose L. García-Giménez, Benigno Macías, and Malva Liu-González. 2007. "Efficient DNA Cleavage Induced by copper(II) Complexes of Hydrolysis Derivatives of 2,4,6-tri(2-Pyridyl)-1,3,5-Triazine in the Presence of Reducing Agents." *European Journal of Inorganic Chemistry*, no. 6: 822–34. doi:10.1002/ejic.200600821.
- Brassard, Diana L, Michael J Grace, and Ronald W Bordens. 2002. "Interferon-Alpha as an Immunotherapeutic Protein." *Journal of Leukocyte Biology* 71 (4): 565–81.
- Brenner, M K. 2004. "A Distinct "Side Population" of Cells with High Drug Efflux Capacity in Human Tumor Cells" 101 (39).
- Burma, S, B P Chen, M Murphy, a Kurimasa, and D J Chen. 2001. "ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-Strand Breaks." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 42462–67. doi:10.1074/jbc.C100466200.
- Bystrom, Laura M, Monica L Guzman, and Stefano Rivella. 2013. "Iron and Reactive Oxygen Species: Friends or Foes of Cancer Cells?" *Antioxidants & Redox Signaling* in press (00): 1–34. doi:10.1089/ars.2012.5014.

- Cairns, Rob a, Isaac S Harris, and Tak W Mak. 2011. "Regulation of Cancer Cell Metabolism." *Nature Reviews. Cancer* 11 (2). Nature Publishing Group: 85–95. doi:10.1038/nrc2981.
- Canta, Mercè, David Font, Laura Gómez, Xavi Ribas, and Miquel Costas. 2014. "The iron(II) Complex [Fe(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(mcp)] as a Convenient, Readily Available Catalyst for the Selective Oxidation of Methylenic Sites in Alkanes." *Advanced Synthesis and Catalysis* 356 (4): 818–30. doi:10.1002/adsc.201300923.
- Chabner, Bruce a, and Thomas G Roberts. 2005. "Timeline: Chemotherapy and the War on Cancer." *Nature Reviews. Cancer* 5 (1): 65–72. doi:10.1038/nrc1529.
- Chaston, Timothy B, Ralph N Watts, Jun Yuan, and Des R Richardson. 2004. "Potent Antitumor Activity of Novel Iron Chelators Derived from Di-2-Pyridylketone Isonicotinoyl Hydrazone Involves Fenton-Derived Free Radical Generation Potent Antitumor Activity of Novel Iron Chelators Derived from Di-2-Pyridylketone Isonicotinoyl Hydra." *Clinical Cancer Research* 10: 7365–74.
- Chen MS, White MC. 2007. "A Predictably Selective Aliphatic C-H Oxidation Reaction for Complex Molecule Synthesis," no. November: 783–87.
- Chen, Zhiqiang, Daohai Zhang, Fei Yue, Minhua Zheng, Zaklina Kovacevic, and Des R. Richardson. 2012. "The Iron Chelators Dp44mT and DFO Inhibit TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition via up-Regulation of N-Myc Downstream-Regulated Gene 1 (NDRG1)." *Journal of Biological Chemistry* 287 (21): 17016–28. doi:10.1074/jbc.M112.350470.
- Chirino, Yolanda I., and José Pedraza-Chaverri. 2009. "Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity." *Experimental and Toxicologic Pathology* 61 (3): 223–42. doi:10.1016/j.etp.2008.09.003.
- Ciardello, Fortunato, and Giampaolo Tortora. 2008. "EGFR Antagonists in Cancer Treatment." *The New England Journal of Medicine* 358 (11): 1160–74. doi:10.1056/NEJMra0707704.
- Clarke, M.J., and P.J. Sadler, eds. 1999. *Topics in Biological Inorganic Chemistry*. Springer Verlag, Berlin. Vol. 1.
- Clèries, R, L Esteban, J Borràs, R Marcos-Gragera, a Freitas, M Carulla, M Buxó, et al. 2014. "Time Trends of Cancer Incidence and Mortality in Catalonia during 1993-2007." *Clinical & Translational Oncology : Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 16 (1): 18–28. doi:10.1007/s12094-013-1060-y.

- Collins, Anne T., Paul a. Berry, Catherine Hyde, Michael J. Stower, and Norman J. Maitland. 2005. "Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells." *Cancer Research* 65 (23): 10946–51. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018.
- Company, Anna, Yan Feng, Mireia Güell, Xavi Ribas, Josep M. Luis, Lawrence Que, and Miquel Costas. 2009. "Olefin-Dependent Discrimination between Two Nonheme HO-Fev=O Tautomeric Species in Catalytic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Epoxidations." *Chemistry - A European Journal* 15 (14): 3359–62. doi:10.1002/chem.200802597.
- Company, Anna, Laura Gómez, Mireia Güell, Xavi Ribas, Josep M. Luis, Lawrence Que, and Miquel Costas. 2007. "Alkane Hydroxylation by a Nonheme Iron Catalyst That Challenges the Heme Paradigm for Oxygenase Action." *J. Am Chem. Soc.* 129: 15766–67.
- Company, Anna, Gerard Sabenya, María González-Béjar, Laura Gómez, Martin Clémancey, Geneviève Blondin, Andrew J. Jasniewski, et al. 2014. "Triggering the Generation of an iron(IV)-Oxo Compound and Its Reactivity toward Sulfides by RuII Photocatalysis." *Journal of the American Chemical Society* 136 (12): 4624–33. doi:10.1021/ja412059c.
- Cooke, Marcus S, Mark D Evans, Miral Dizdaroglu, and Joseph Lunec. 2003. "Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease." *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (10): 1195–1214. doi:10.1096/fj.02-0752rev.
- Costas, Miquel, and Lawrence Que. 2002. "Ligand Topology Tuning of Iron-Catalyzed Hydrocarbon Oxidations." *Angewandte Chemie - International Edition* 41 (12): 2179–81. doi:10.1002/1521-3773(20020617)41:12<2179::AID-ANIE2179>3.0.CO;2-F.
- Creighton, Chad J, Xiaoxian Li, Melissa Landis, J Michael Dixon, Veronique M Neumeister, Ashley Sjolund, David L Rimm, et al. 2009. "Residual Breast Cancers after Conventional Therapy Display Mesenchymal as Well as Tumor-Initiating Features." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (33): 13820–25. doi:10.1073/pnas.0905718106.
- Cusso, Olaf, Xavi Ribas, Julio Lloret-fillol, and Miquel Costas. 2013. "Asymmetric Epoxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Manipulating the Electronic Properties of Non-Heme Iron Catalysts." *Journal of the American Chemical Society* 135: 14871–78.

- Cuyàs, Elisabet, Bruna Corominas-Faja, and Javier a Menendez. 2014. "The Nutritional Phenome of EMT-Induced Cancer Stem-like Cells." *Oncotarget* 5 (12): 3970–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24994116>.
- D'Autréaux, Benoît, and Michel B Toledano. 2007. "ROS as Signalling Molecules: Mechanisms That Generate Specificity in ROS Homeostasis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (10): 813–24. doi:10.1038/nrm2256.
- Da Rocha, Adriana B., Rafael M. Loper, and Gilberto Schwatsmann. 2001. "Natural Products in Anticancer Therapy." *Current Opinion in Pharmacology* 1: 364–69. doi:10.1016/S1471-4892(01)00063-7.
- Dalerba, Piero, Robert W Cho, and Michael F Clarke. 2007. "Cancer Stem Cells: Models and Concepts." *Annual Review of Medicine* 58: 267–84. doi:10.1146/annurev.med.58.062105.204854.
- De Craene, Bram, and Geert Berx. 2013. "Regulatory Networks Defining EMT during Cancer Initiation and Progression." *Nature Reviews. Cancer* 13 (2). Nature Publishing Group: 97–110. doi:10.1038/nrc3447.
- De Domenico, Ivana, Diane McVey Ward, and Jerry Kaplan. 2008. "Regulation of Iron Acquisition and Storage: Consequences for Iron-Linked Disorders." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (1): 72–81. doi:10.1038/nrm2295.
- DeBerardinis, Ralph J., Julian J. Lum, Georgia Hatzivassiliou, and Craig B. Thompson. 2008. "The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation." *Cell Metabolism* 7 (1): 11–20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002.
- Demain, Arnold L, and Sergio Sanchez. 2009. "Microbial Drug Discovery: 80 Years of Progress." *The Journal of Antibiotics* 62: 5–16. doi:10.1038/ja.2008.16.
- Dixon, Scott J, and Brent R Stockwell. 2014. "The Role of Iron and Reactive Oxygen Species in Cell Death." *Nature Chemical Biology* 10 (1): 9–17. doi:10.1038/nchembio.1416.
- Dutcher, Janice P, Douglas J Schwartzentruber, Howard L Kaufman, Sanjiv S Agarwala, Ahmad a Tarhini, James N Lowder, and Michael B Atkins. 2014. "High Dose Interleukin-2 (Aldesleukin) - Expert Consensus on Best Management Practices-2014." *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2 (1): 1–23. doi:10.1186/s40425-014-0026-0.
- Eramo, a, F Lotti, G Sette, E Pillozzi, M Biffoni, a Di Virgilio, C Conticello, L Ruco, C Peschle, and R De Maria. 2008. "Identification and Expansion of the

Tumorigenic Lung Cancer Stem Cell Population." *Cell Death and Differentiation* 15 (3): 504–14. doi:10.1038/sj.cdd.4402283.

Fang, Dong, Thiennga K. Nguyen, Kim Leishear, Rena Finko, Angela N. Kulp, Susan Hotz, Patricia a. Van Belle, Xiaowei Xu, David E. Elder, and Meenhard Herlyn. 2005. "A Tumorigenic Subpopulation with Stem Cell Properties in Melanomas." *Cancer Research* 65 (20): 9328–37. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1343.

Fearon, Eric R, and Bert Vogelstein. 2016. "A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis." *Cell* 61 (5). Elsevier: 759–67. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-I.

Fiaschi, Tania, and Paola Chiarugi. 2012. "Oxidative Stress, Tumor Microenvironment, and Metabolic Reprogramming: A Diabolic Liaison." *International Journal of Cell Biology* 2012. doi:10.1155/2012/762825.

Fillo, Julio Lloret, Zoel Codolà, Isaac Garcia-Bosch, Laura Gómez, Juan José Pla, and Miquel Costas. 2011. "Efficient Water Oxidation Catalysts Based on Readily Available Iron Coordination Complexes." *Nature Chemistry* 3 (10): 807–13. doi:10.1038/nchem.1140.

Fomby, Paula, and Andrew J Cherlin. 2011. "NIH Public Access" 72 (2): 181–204. doi:10.1038/nature13314.A.

Fonseca, Sonali B., Mark P. Pereira, and Shana O. Kelley. 2009. "Recent Advances in the Use of Cell-Penetrating Peptides for Medical and Biological Applications." *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (11). Elsevier B.V.: 953–64. doi:10.1016/j.addr.2009.06.001.

García-Giménez, José Luis, Gloria Alzuet, Marta González-Álvarez, Alfonso Castiñeiras, Malva Liu-González, and Joaquín Borrás. 2007. "A Dinuclear copper(II) Complex with Adeninate Bridge Ligands and Prominent DNA Cleavage Activity. Structural and Spectroscopic Characterization and Magnetic Properties." *Inorganic Chemistry* 46 (17): 7178–88. doi:10.1021/ic700751j.

Gasser, Gilles, Ingo Ott, and Nils Metzler-Nolte. 2011. "Organometallic Anticancer Compounds." *Journal of Medicinal Chemistry* 54 (1): 3–25. doi:10.1021/jm100020w.

Gennari, Alessandra, Dino Amadori, Mario De Lena, Oriana Nanni, Paolo Bruzzi, Vito Lorusso, Luigi Manzione, and Pier Franco Conte. 2006. "Lack of Benefit of Maintenance Paclitaxel in First-Line Chemotherapy in Metastatic Breast

- Cancer." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (24): 3912–18. doi:10.1200/JCO.2006.06.1812.
- Ghezzi, Pietro. 2005. "Regulation of Protein Function by Glutathionylation." *Free Radical Research* 39 (6): 573–80. doi:10.1080/10715760500072172.
- Gilbertson, Richard J., and Trevor a. Graham. 2012. "Cancer: Resolving the Stem-Cell Debate." *Nature* 488 (7412): 462–63. doi:10.1038/nature11480.
- Graf, Nora, and Stephen J. Lippard. 2012. "Redox Activation of Metal-Based Prodrugs as a Strategy for Drug Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (11). Elsevier B.V.: 993–1004. doi:10.1016/j.addr.2012.01.007.
- Guo, Maolin, Carlos Perez, Yibin Wei, Elise Rapoza, Gregory Su, Fadi Bou-Abdallah, and N D Chasteen. 2007. "Iron-Binding Properties of Plant Phenolics and Cranberry's Bio-Effects." *Dalton Transactions (Cambridge, England : 2003)*, no. 43: 4951–61. doi:10.1039/b705136k.
- Gupta, Piyush B., Tamer T. Onder, Guozhi Jiang, Kai Tao, Charlotte Kuperwasser, Robert a. Weinberg, and Eric S. Lander. 2009. "Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening." *Cell* 138 (4). Elsevier Ltd: 645–59. doi:10.1016/j.cell.2009.06.034.
- Haber, Fritz, and Joseph Weiss. 1934. "The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts." *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, ...* 147: 332–51. <http://www.jstor.org/stable/10.2307/96281>.
- Halliwell, Barry. 2006. "Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life." *Plant Physiology* 141 (2): 312–22. doi:10.1104/pp.106.077073.
- Hanahan, Douglas, and Robert a. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5). Elsevier Inc.: 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Haraguchi, Naotsugu, Tohru Utsunomiya, Hiroshi Inoue, Fumiaki Tanaka, Koshi Mimori, Graham F Barnard, and Masaki Mori. 2006. "Characterization of a Side Population of Cancer Cells from Human Gastrointestinal System." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (3): 506–13. doi:10.1634/stemcells.2005-0282.
- Haynes, Cole M., Eric a. Titus, and Antony a. Cooper. 2004. "Degradation of Misfolded Proteins Prevents ER-Derived Oxidative Stress and Cell Death." *Molecular Cell* 15 (5): 767–76. doi:10.1016/j.molcel.2004.08.025.



- Hecht, Sidney M. 2000. "Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action." *Journal of Natural Products* 63 (1): 158–68. doi:10.1021/np990549f.
- Hemmati, Houman D, Ichiro Nakano, Jorge a Lazareff, Michael Masterman-Smith, Daniel H Geschwind, Marianne Bronner-Fraser, and Harley I Kornblum. 2003. "Cancerous Stem Cells Can Arise from Pediatric Brain Tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (25): 15178–83. doi:10.1073/pnas.2036535100.
- Ho, Maria M, Alvin V Ng, Stephen Lam, and Jaclyn Y Hung. 2007. "Side Population in Human Lung Cancer Cell Lines and Tumors Is Enriched with Stem-like Cancer Cells." *Cancer Research* 67 (10): 4827–33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3557.
- Hoegler, David. 1997. "Radiotherapy for Palliation of Symptoms in Incurable Cancer." *Current Problems in Cancer* 21 (3): 135–83.
- Holmström, Kira M, and Toren Finkel. 2014. "Cellular Mechanisms and Physiological Consequences of Redox-Dependent Signalling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (6). Nature Publishing Group: 411–21. doi:10.1038/nrm3801.
- Hunniford, C Adam, Robert W McCullough, R Jeremy H Davies, and David J Timson. 2009. "DNA Damage by Low-Energy Ions." *Biochemical Society Transactions* 37: 893–96. doi:10.1042/BST0370893.
- Jomova, Klaudia, and Marian Valko. 2011. "Advances in Metal-Induced Oxidative Stress and Human Disease." *Toxicology* 283 (2-3). Elsevier Ireland Ltd: 65–87. doi:10.1016/j.tox.2011.03.001.
- Jones, Russell G, and Craig B Thompson. 2009. "Tumor Suppressors and Cell Metabolism : A Recipe for Cancer Growth Tumor Suppressors and Cell Metabolism : A Recipe for Cancer Growth," no. 514: 537–48. doi:10.1101/gad.1756509.
- Jungwirth, Ute, Christian R Kowol, Bernhard K Keppler, and G Christian. 2011. "Anticancer Activity of Metal Complexes : Involvement of Redox Processes." *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (4): 1085–1127. doi:10.1089/ars.2010.3663.Anticancer.
- Kalinowski, Danuta S, and Des R. Richardson. 2007. "Future of Toxicology - Iron Chelators and Differing Modes of Action and Toxicity: The Changing Face of Iron Chelation Therapy." *Chemical Research in Toxicology* 20 (5): 715–20. doi:10.1021/tx700039c.

- Kalinowski, Ds, and Dr Richardson. 2005. "The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer." *Pharmacological Reviews* 57 (4): 547–83. doi:10.1124/pr.57.4.2.547.
- Kalluri, Raghu, and Robert a Weinberg. 2009. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420–28. doi:10.1172/JCI39104.1420.
- Karlsson, H. Jonas, Maja Eriksson, Erik Perzon, Björn Åkerman, Per Lincoln, and Gunnar Westman. 2003. "Groove-Binding Unsymmetrical Cyanine Dyes for Staining of DNA: Syntheses and Characterization of the DNA-Binding." *Nucleic Acids Research* 31 (21): 6227–34. doi:10.1093/nar/gkg821.
- Kelland, Lloyd. 2007. "The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy." *Nature Reviews. Cancer* 7 (8): 573–84. doi:10.1038/nrc2167.
- Kim, S. K., and B. Norden. 1993. "Methyl Green: A DNA Major-Groove Binding Drug." *FEBS Letters* 315 (1): 61–64. doi:10.1016/0014-5793(93)81133-K.
- Klaunig, James E, Lisa M Kamendulis, and Barbara a Hocevar. 2010. "Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis." *Toxicologic Pathology* 38 (1): 96–109. doi:10.1177/0192623309356453.
- Kohen, Ron, and Abraham Nyska. 2002. "Toxicologic Pathology." *Toxicologic Pathology* 30 (6): 620–50. doi:10.1080/0192623029016672.
- Kondo, Natsuko, Akihisa Takahashi, Koji Ono, and Takeo Ohnishi. 2010. "DNA Damage Induced by Alkylating Agents and Repair Pathways." *Journal of Nucleic Acids* 2010: 1–7. doi:10.4061/2010/543531.
- Kontoghiorghes, George J, Aglaia Efstathiou, Stella Ioannou-Loucaides, and Annita Kolnagou. 2008. "Chelators Controlling Metal Metabolism and Toxicity Pathways: Applications in Cancer Prevention, Diagnosis and Treatment." *Hemoglobin* 32 (1-2): 217–27. doi:10.1080/03630260701727119.
- Koppenol, Willem H, Patricia L Bounds, and Chi V Dang. 2011. "Otto Warburg's Contributions to Current Concepts of Cancer Metabolism." *Nature Reviews. Cancer* 11 (5). Nature Publishing Group: 325–37. doi:10.1038/nrc3108.
- Kraemer, Ute, Sabeeha Merchant, and Los Angeles. 2008. "A Toxic Brew We Cannot Live without." *European Molecular Biology Organization* 9 (1): 15–18. doi:10.1038/sj.embor.7401148.

- Krötz, Florian, Hae Young Sohn, and Ulrich Pohl. 2004. "Reactive Oxygen Species: Players in the Platelet Game." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (11): 1988–96. doi:10.1161/01.ATV.0000145574.90840.7d.
- Kwong, Wai-Lun, Chun-Nam Lok, Chun-Wai Tse, Ella Lai-Ming Wong, and Chi-Ming Che. 2015. "Anti-Cancer Iron(II) Complexes of Pentadentate N-Donor Ligands: Cytotoxicity, Transcriptomics Analyses, and Mechanisms of Action." *Chemistry - A European Journal* 21 (7): 3062–72. doi:10.1002/chem.201404749.
- Lapidot, T, C Sirard, J Vormoor, B Murdoch, T Hoang, J Caceres-Cortes, M Minden, B Paterson, M Caligiuri, and J E Dick. 1994. "A Cell Initiating Human Acute Myeloid Leukaemia after Transplantation into SCID Mice." *Nature* 367 (6464): 645–48. doi:10.1038/367645a0.
- Lassègue, Bernard, and Kathy K. Griendling. 2010. "NADPH Oxidases: Functions and Pathologies in the Vasculature." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (4): 653–61. doi:10.1161/ATVBAHA.108.181610.
- Le, Nghia T V, and Des R Richardson. 2002. "The Role of Iron in Cell Cycle Progression and the Proliferation of Neoplastic Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1603 (1): 31–46. doi:S0304419X02000689 [pii].
- Le, Nghia T V, and Des R. Richardson. 2004. "Iron Chelators with High Antiproliferative Activity up-Regulate the Expression of a Growth Inhibitory and Metastasis Suppressor Gene: A Link between Iron Metabolism and Proliferation." *Blood* 104 (9): 2967–75. doi:10.1182/blood-2004-05-1866.
- Li, Chenwei, David G. Heidt, Piero Dalerba, Charles F. Burant, Lanjing Zhang, Volkan Adsay, Max Wicha, Michael F. Clarke, and Diane M. Simeone. 2007. "Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells." *Cancer Research* 67 (3): 1030–37. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030.
- Li, Qian, Wesley R. Browne, and Gerard Roelfes. 2011. "DNA Cleavage Activity of Fe(II)N4Py under Photo Irradiation in the Presence of 1,8-Naphthalimide and 9-Aminoacridine: Unexpected Effects of Reactive Oxygen Species Scavengers." *Inorganic Chemistry* 50 (17): 8318–25. doi:10.1021/ic2008478.
- Li, Xiang, KaiDi Zhao, WenJie Guo, Xu Liu, Jia Liu, Jing Gao, QiuYun Chen, and YiDong Bai. 2014. "A Novel Manganese Complex LMnAc Selectively Kills Cancer Cells by Induction of ROS-Triggered and Mitochondrial-Mediated Cell Death." *Science China Life Sciences* 57 (10): 998–1010. doi:10.1007/s11427-014-4682-6.

- Liou, Geou-Yarh, and Peter Storz. 2010. "Reactive Oxygen Species in Cancer." *Free Radical Research* 44 (5): 479–96. doi:10.3109/10715761003667554.
- Liu, Jia, Wenjie Guo, Jing Li, Xiang Li, Ji Geng, Qiuyun Chen, and Jing Gao. 2015. "Tumor-Targeting Novel Manganese Complex Induces ROS-Mediated Apoptotic and Autophagic Cancer Cell Death." *International Journal of Molecular Medicine* 35 (3): 607–16. doi:10.3892/ijmm.2015.2073.
- Liu, Zu D, and Robert C Hider. 2002. "Design of Iron Chelators with Therapeutic Application." *Coordination Chemistry Reviews* 232: 151–71.
- Lovejoy, David B., Patric J. Jansson, Ulf T. Brunk, Jacky Wong, Prem Ponka, and Des R. Richardson. 2011. "Antitumor Activity of Metal-Chelating Compound Dp44mT Is Mediated by Formation of a Redox-Active Copper Complex That Accumulates in Lysosomes." *Cancer Research* 71 (17): 5871–80. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1218.
- Luis García-Giménez, José, Marta González-Álvarez, Malva Liu-González, Benigno Macías, Joaquín Borrás, and Gloria Alzuet. 2009. "Toward the Development of Metal-Based Synthetic Nucleases: DNA Binding and Oxidative DNA Cleavage of a Mixed copper(II) Complex with N-(9H-Purin-6-Yl)benzenesulfonamide and 1,10-Phenantroline. Antitumor Activity in Human Caco-2 Cells and Jurkat T Lymphocy." *Journal of Inorganic Biochemistry* 103 (6). Elsevier Inc.: 923–34. doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.04.003.
- Mani, Sendurai a., Wenjun Guo, Mai Jing Liao, Elinor Ng Eaton, Ayyakkannu Ayyanan, Alicia Y. Zhou, Mary Brooks, et al. 2008. "The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells." *Cell* 133 (4): 704–15. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.
- Manoury, Boris, Soazig Nenan, Olivier Leclerc, Isabelle Guenon, Elisabeth Boichot, Jean-Michel Planquois, Claude P Bertrand, and Vincent Lagente. 2005. "The Absence of Reactive Oxygen Species Production Protects Mice against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis." *Respiratory Research* 6: 11. doi:10.1186/1465-9921-6-11.
- Matés, J.M. 2001. "Effects of Antioxidant Enzymes in the Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology." *Toxicology* 163 (2-3): 219. doi:10.1016/S0300-483X(01)00395-X.
- Mathupala, Saroj P., Annette Rempel, and Peter L. Pedersen. 2001. "Glucose Catabolism in Cancer Cells: Identification and Characterization of a Marked Activation Response of the Type II Hexokinase Gene to Hypoxic Conditions."

*Journal of Biological Chemistry* 276 (46): 43407–12.  
doi:10.1074/jbc.M108181200.

Mcleod, David G. 2003. "Hormonal Therapy: Historical Perspective to Future Directions." *Urology* 61 (Suplement 2A): 3–7.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090429502023932>.

Mellman, Ira, George Coukos, and Glenn Dranoff. 2011. "Cancer Immunotherapy Comes of Age." *Nature* 480. Nature Publishing Group: 480–89.  
doi:10.1038/nature10673.

Micalizzi, Douglas S., Susan M. Farabaugh, and Heide L. Ford. 2010. "Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels between Normal Development and Tumor Progression." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15 (2): 117–34. doi:10.1007/s10911-010-9178-9.

Montero, Alberto J, and Jacek Jassem. 2011. "Cellular Redox Pathways as a Therapeutic Target in the Treatment of Cancer" 71 (11): 1385–96.

Morel, Anne-Pierre, Marjory Lièvre, Clémence Thomas, George Hinkal, Stéphane Ansieau, and Alain Puisieux. 2008. "Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition." *PLoS One* 3 (8): e2888.  
doi:10.1371/journal.pone.0002888.

Nirmala, M. Joyce, a. Samundeeswari, and P. Deepa Sankar. 2011. "Natural Plant Resources in Anti-Cancer Therapy-A Review." *Research in Plant Biology* 1 (3).  
<http://resplantbiol.com/article/view/243>.

O'Brien, Catherine a, Aaron Pollett, Steven Gallinger, and John E Dick. 2007. "A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice." *Nature* 445 (7123): 106–10.  
doi:10.1038/nature05372.

Oltra, Ana M., Carbonell Félix, Carmen Tormos, Antonio Iradi, and Guillermo T. Sáez. 2001. "Antioxidant Enzyme Activities and the Production of MDA and 8-Oxo-dG in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Free Radical Biology & Medicine* 30 (11): 1286–92.

Osredkar, Josko, and Natasa Sustar. 2011. "Copper and Zinc , Biological Role and Significance of Copper / Zinc Imbalance." *Journal of Clinical Toxicology* S3:001. doi:10.4172/2161-0494.S3-001.

Osthus, Rebecca C., Hyunsuk Shim, Sunkyu Kim, Qing Li, Rahul Reddy, Mita Mukherjee, Yi Xu, Diane Wonsey, Linda a. Lee, and Chi V. Dang. 2000.

- "Deregulation of Glucose Transporter 1 and Glycolytic Gene Expression by c-Myc." *Journal of Biological Chemistry* 275 (29): 21797–800.  
doi:10.1074/jbc.C000023200.
- Page, Simon. 2012. "Ruthenium Compounds as Anticancer Agents." *Education in Chemistry*, 26–29.
- Parker, William B. 2000. "Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer." *Chemical Reviews* 109 (7): 2880–93.  
doi:10.1021/cr900028p.Enzymology.
- Pelicano, Helene, Dennis Carney, and Peng Huang. 2004. "ROS Stress in Cancer Cells and Therapeutic Implications." *Drug Resistance Updates* 7 (2): 97–110.  
doi:10.1016/j.drug.2004.01.004.
- Pizzimenti, Stefania, Giuseppina Barrera, Mario Umberto Dianzani, and Sabine Brüsselbach. 1999. "Inhibition of D1, D2, and A Cyclin Expression in HL-60 Cells by the Lipid Peroxydation Product 4-Hydroxynonenal." *Free Radical Biology and Medicine* 26 (11-12): 1578–86. doi:10.1016/S0891-5849(99)00022-2.
- Podhorecka, Monika, Andrzej Skladanowski, and Przemyslaw Bozko. 2010. "H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy." *Journal of Nucleic Acids* 2010. doi:10.4061/2010/920161.
- Ponti, Dario, Aurora Costa, Nadia Zaffaroni, Graziella Pratesi, Giovanna Petrangolini, Danila Coradini, Silvana Pilotti, Marco A Pierotti, and Maria Grazia Daidone. 2005. "Isolation and In Vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem / Progenitor Cell Properties," no. 13: 5506–11.
- Quiñonero, David, Keiji Morokuma, Djamaladdin G. Musaev, Rubén Mas-Ballesté, and Lawrence Que. 2005. "Metal-Peroxo versus Metal-Oxo Oxidants in Non-Heme Iron-Catalyzed Olefin Oxidations: Computational and Experimental Studies on the Effect of Water." *Journal of the American Chemical Society* 127 (18): 6548–49. doi:10.1021/ja051062y.
- Raaijmakers, Marc H G P, Elke P L M De Grouw, Leonie H H Heuver, Bert A Van Der Reijden, Joop H Jansen, Rik J Scheper, George L Scheffer, Theo J M De Witte, and Reinier A P Raymakers. 2005. "Breast Cancer Resistance Protein in Drug Resistance of Primitive CD34 + 38 À Cells in Acute Myeloid Leukemia" 11: 2436–44.
- Raez, Luis E., Steven Fein, and Eckhard R. Podack. 2005. "Lung Cancer Immunotherapy." *Clinical Medicine & Research* 3 (4): 221–28.

- Rajski, Scott R., and Robert M. Williams. 1998. "DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs." *Chemical Reviews* 98 (8): 2723–96.  
doi:10.1021/cr9800199.
- Reedijk, Jan. 2003. "New Clues for Platinum Antitumor Chemistry: Kinetically Controlled Metal Binding to DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 3611–16.  
doi:10.1073/pnas.0737293100.
- Rengifo, Gustavo F Gonzales, Cynthia Gonzales Castañeda, and Diego Espinosa Guerinoni. 2007. "Overexpression of Genes of Glycolytic Pathway Enzymes in Cancer Cells" 24 (3): 187–97.
- Reuter, Simone, Subash C. Gupta, Madan M. Chaturvedi, and Bharat B. Aggarwal. 2010. "Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked?" *Free Radical Biology and Medicine* 49 (11). Elsevier Inc.: 1603–16.  
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
- Reya, Tannishtha, Sean J Morrison, Michael F Clarke, and Irving L Weissman. 2001. "Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells." *Nature* 414 (November): 105–12.
- Ribes, J., L. Esteban, R. Clèries, J. Galceran, R. Marcos-Gragera, R. Gispert, a. Ameijide, et al. 2014. "Cancer Incidence and Mortality Projections up to 2020 in Catalonia by Means of Bayesian Models." *Clinical and Translational Oncology* 16 (8): 714–24. doi:10.1007/s12094-013-1140-z.
- Richardson, D R, and K Milnes. 1997. "The Potential of Iron Chelators of the Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone Class as Effective Antiproliferative Agents II: The Mechanism of Action of Ligands Derived from Salicylaldehyde Benzoyl Hydrazone and 2-Hydroxy-1-Naphthylaldehyde Benzoyl Hydrazone." *Blood* 89 (8): 3025–38.
- Richardson, D. R., D. S. Kalinowski, S. Lau, P. J. Jansson, and D. B. Lovejoy. 2009. "Cancer Cell Iron Metabolism and the Development of Potent Iron Chelators as Anti-Tumour Agents." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1790 (7). Elsevier B.V.: 702–17. doi:10.1016/j.bbagen.2008.04.003.
- Rogakou, E.P., D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, and W.M. Bonner. 1998. "DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139\*." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5858–68.  
doi:10.1074/jbc.273.10.5858.

- Rosenberg, B, L VanCamp, J E Trosko, and V H Mansour. 1969. "Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents." *Nature* 222: 385–86. doi:10.1038/222385a0.
- Sadler, Peter J. 1991. "Inorganic Chemistry and Drug Design." *Advances in Inorganic Chemistry* 36: 1–48.
- Said, Nur Akmarina B M, and Elizabeth D. Williams. 2010. "Growth Factors in Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis." *Cells Tissues Organs* 193 (1-2): 85–97. doi:10.1159/000320360.
- Sainty, Danielle, Christine Arnoulet, Jean-albert Gastaut, and Daniel Olive. 2000. "Human Acute Myeloid Leukemia CD34<sup>+</sup> / CD38<sup>-</sup> Progenitor Cells Have Decreased Sensitivity to Chemotherapy and Fas-Induced Apoptosis, Reduced Immunogenicity, and Impaired Dendritic Cell Re," 4403–11.
- Saxena, M, M a Stephens, H Pathak, and a Rangarajan. 2011. "Transcription Factors That Mediate Epithelial-Mesenchymal Transition Lead to Multidrug Resistance by Upregulating ABC Transporters." *Cell Death & Disease* 2 (7). Nature Publishing Group: e179. doi:10.1038/cddis.2011.61.
- Seddon, Annela M, Duncan Casey, Robert V Law, Antony Gee, Richard H Templer, and Oscar Ces. 2009. "Drug Interactions with Lipid Membranes." *Chemical Society Reviews* 38 (9): 2509–19. doi:10.1039/b813853m.
- Semenza, Gregg L. 2003. "Targeting HIF-1 for Cancer Therapy." *Nature Reviews. Cancer* 3 (10): 721–32. doi:10.1038/nrc1187.
- Siddik, Zahid H. 2002. "Mechanisms of Actions of Cancer Chemotherapeutic Agents: DNA-Interactive Alkylating Agents and Antitumour Platinum-Based Drugs." *The Cancer Handbook*, 1–16. doi:10.1002/0470025077.
- Siegel, Rebecca L, Kimberly D Miller, and Ahmedin Jemal. 2015. "Cancer Statistics, 2015." *CA Cancer J Clin* 65 (1): 5–29. doi:10.3322/caac.21254.
- Siegel, Rebecca, Jiemin Ma, Zhaohui Zou, and Ahmedin Jemal. 2014. "Cancer Statistics, 2014" 64 (1): 9–29. doi:10.3322/caac.21208.
- Singer, E a, D J Golijanin, H Miyamoto, and E M Messing. 2008. "Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer." *Expert Opin Pharmacother* 9 (2): 211–28.  
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L351233730> \n <http://dx.doi.org/10.1517/14656566.9.2.211> \n <http://>



sfx.libis.be/sfxlcl3?sid=EMBASE&issn=14656566&id=doi:10.1517/14656566.6.9.2.211&atitle=Androgen+deprivation+therapy+for+p.

Singh, a, and J Settleman. 2010. "EMT, Cancer Stem Cells and Drug Resistance: An Emerging Axis of Evil in the War on Cancer." *Oncogene* 29 (34). Nature Publishing Group: 4741–51. doi:10.1038/onc.2010.215.

Singh, Sheila K., Ian D. Clarke, Mizuhiko Terasaki, Victoria E. Bonn, Cynthia Hawkins, Jeremy Squire, and Peter B. Dirks. 2003. "Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors." *Cancer Research* 63 (18): 5821–28. doi:10.1038/nature03128.

Snyder, Eric L, and Steven F Dowdy. 2004. "Cell Penetrating Peptides in Drug Delivery." *Pharmaceutical Research* 21 (3): 289–393.

Soler, Marta, Eduard Figueras, Joan Serrano-Plana, Marta González-Bártulos, Anna Massaguer, Anna Company, Ma Ángeles Martínez, et al. 2015. "Design, Preparation, and Characterization of Zn and Cu Metallopeptides Based On Tetradentate Aminopyridine Ligands Showing Enhanced DNA Cleavage Activity." *Inorganic Chemistry* 54 (22): 10542–58. doi:10.1021/acs.inorgchem.5b01680.

Soler, Marta, Marta González-Bártulos, Eduard Figueras, Anna Massaguer, Lidia Feliu, Marta Planas, Xavi Ribas, and Miquel Costas. 2016. "Delivering Aminopyridine Ligands into Cancer Cells through Conjugation to the Cell-Penetrating Peptide BP16." *Org. Biomol. Chem.* 14 (17). Royal Society of Chemistry: 4061–70. doi:10.1039/C6OB00470A.

Soler, Marta, Marta González-Bártulos, Eduard Figueras, Xavi Ribas, Miquel Costas, Anna Massaguer, Marta Planas, and Lidia Feliu. 2015. "Enzyme-Triggered Delivery of Chlorambucil from Conjugates Based on the Cell-Penetrating Peptide BP16." *Organic & Biomolecular Chemistry* 13 (5). Royal Society of Chemistry: 1470–80. doi:10.1039/c4ob01875c.

Soler, Marta, Marta González-Bártulos, David Soriano-Castell, Xavi Ribas, Miquel Costas, Francesc Tebar, Anna Massaguer, Lidia Feliu, and Marta Planas. 2014. "Identification of BP16 as a Non-Toxic Cell-Penetrating Peptide with Highly Efficient Drug Delivery Properties." *Organic & Biomolecular Chemistry* 12 (10): 1652–63. doi:10.1039/c3ob42422g.

Stephenson, Erin, Nabeela Nathoo, Yasamin Mahjoub, Jeff F Dunn, and V Wee Yong. 2014. "Iron in Multiple Sclerosis: Roles in Neurodegeneration and Repair." *Nat Rev Neurol* 10 (8). Nature Publishing Group, a division of Macmillan

- Publishers Limited. All Rights Reserved.: 459–68.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.118>.
- Stuelten, Christina H., Susan D. Mertins, Johanna I. Busch, Meghan Gowens, Dominic a. Scudiero, Mark W. Burkett, Karen M. Hite, et al. 2010. “Complex Display of Putative Tumor Stem Cell Markers in the NCI60 Tumor Cell Line Panel.” *Stem Cells* 28 (4): 649–60. doi:10.1002/stem.324.
- Sun, Raymond Wai-Yin, Dik-Lung Ma, Ella Lai-Ming Wong, and Chi-Ming Che. 2007. “Some Uses of Transition Metal Complexes as Anti-Cancer and Anti-HIV Agents.” *Dalton Transactions (Cambridge, England : 2003)*, no. 43: 4884–92. doi:10.1039/b705079h.
- Svensen, Nina, Jeffrey G a Walton, and Mark Bradley. 2012. “Peptides for Cell-Selective Drug Delivery.” *Trends in Pharmacological Sciences* 33 (4). Elsevier Ltd: 186–92. doi:10.1016/j.tips.2012.02.002.
- Szotek, Paul P, Rafael Pieretti-vanmarcke, Peter T Masiakos, Daniela M Dinulescu, Denise Connolly, Rosemary Foster, David Dombkowski, Frederic Preffer, David T Maclaughlin, and Patricia K Donahoe. 2006. “Ovarian Cancer Side Population Defines Cells with Stem Cell-like Characteristics and Mullerian Inhibiting Substance Responsiveness” 103 (30).
- Tam, Wai Leong, and Robert a Weinberg. 2013. “The Epigenetics of Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer.” *Nature Medicine* 19 (11): 1438–49. doi:10.1038/nm.3336.
- Tiwari, Manjul. 2012. “Antimetabolites: Established Cancer Therapy.” *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 8 (4): 510–19. doi:10.4103/0973-1482.106526.
- Torti, S V, F M Torti, S P Whitman, M W Brechbiel, G Park, and R P Planalp. 1998. “Tumor Cell Cytotoxicity of a Novel Metal Chelator.” *Blood* 92 (4): 1384–89.
- Torti, Suzy V, and Frank M Torti. 2013. “Iron and Cancer: More Ore to Be Mined.” *Nature Reviews. Cancer* 13 (5). Nature Publishing Group: 342–55. doi:10.1038/nrc3495.
- Toyokuni, Shinya. 2014. “Iron and Thiols as Two Major Players in Carcinogenesis: Friends or Foes?” *Frontiers in Pharmacology* 5 (August): 5–8. doi:10.3389/fphar.2014.00200.
- Trachootham, Dunyaporn, Jerome Alexandre, and Peng Huang. 2009. “Targeting Cancer Cells by ROS-Mediated Mechanisms: A Radical Therapeutic

- Approach?" *Nature Reviews. Drug Discovery* 8 (7). Nature Publishing Group: 579–91. doi:10.1038/nrd2803.
- Urruticoechea, A, R Alemany, J Balart, A Villanueva, F Viñals, and G Capellá. 2010. "Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview." *Current Pharmaceutical Design* 16 (1): 3–10. doi:10.2174/138161210789941847.
- Valabrega, Giorgio, F. Montemurro, and M. Aglietta. 2007. "Trastuzumab: Mechanism of Action, Resistance and Future Perspectives in HER2-Overexpressing Breast Cancer." *Annals of Oncology* 18 (6): 977–84. doi:10.1093/annonc/mdl475.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur. 2006. "Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer." *Chemico-Biological Interactions* 160 (1): 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- Vander Heiden, Matthew G, Lewis C Cantley, and Craig B Thompson. 2009. "Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation." *Science (New York, N.Y.)* 324 (5930): 1029–33. doi:10.1126/science.1160809.
- Vardhaman, Anil Kumar, Chivukula V. Sastri, Devesh Kumar, and Sam P. de Visser. 2011. "Nonheme Ferric Hydroperoxo Intermediates Are Efficient Oxidants of Bromide Oxidation." *Chemical Communications* 47 (39): 11044. doi:10.1039/c1cc13775a.
- Verbon, Eline Hendrike, Jan Andries Post, and Johannes Boonstra. 2012. "The Influence of Reactive Oxygen Species on Cell Cycle Progression in Mammalian Cells." *Gene* 511 (1). Elsevier B.V.: 1–6. doi:10.1016/j.gene.2012.08.038.
- Vertuani, Silvia, Angela Angusti, and Stefano Manfredini. 2004. "The Antioxidants and pro-Antioxidants Network: An Overview." *Current Pharmaceutical Design* 10 (14): 1677–94. doi:10.2174/1381612043384655.
- Vousden, Karen H, and Kevin M Ryan. 2009. "P53 and Metabolism." *Nature Reviews. Cancer* 9 (10): 691–700. doi:10.1038/nrc2715.
- Wang, Chunxia, Jingping Xie, Jiasong Guo, H. Charles Manning, John C. Gore, and Ning Guo. 2012. "Evaluation of CD44 and CD133 as Cancer Stem Cell Markers for Colorectal Cancer." *Oncology Reports* 28 (4): 1301–8. doi:10.3892/or.2012.1951.
- Wang, Jing, Li-Ping Guo, Li-Zhen Chen, Yi-Xin Zeng, and Shih Hsin Lu. 2007. "Identification of Cancer Stem Cell-like Side Population Cells in Human

- Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line." *Cancer Research* 67 (8): 3716–24. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4343.
- Waris, Gulam, and Haseeb Ahsan. 2006. "Reactive Oxygen Species: Role in the Development of Cancer and Various Chronic Conditions." *Journal of Carcinogenesis* 5: 14. doi:10.1186/1477-3163-5-14.
- Whitnall, Megan, Jonathan Howard, Prem Ponka, and Des R Richardson. 2006. "A Class of Iron Chelators with a Wide Spectrum of Potent Antitumor Activity That Overcomes Resistance to Chemotherapeutics." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (40): 14901–6. doi:10.1073/pnas.0604979103.
- Wicha, Max S., Suling Liu, and Gabriela Dontu. 2006. "Cancer Stem Cells: An Old Idea - A Paradigm Shift." *Cancer Research* 66 (4): 1883–90. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3153.
- Wondrak, Georg T. 2009. "Redox-Directed Cancer Therapeutics: Molecular Mechanisms and Opportunities." *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (12): 3013–69. doi:10.1089/ars.2009.2541.
- Wong, E, and C M Giandomenico. 1999. "Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs." *Chemical Reviews* 99 (9): 2451–66. doi:10.1021/cr980420v.
- Yuan, Jun, David B. Lovejoy, and Des R. Richardson. 2004. "Novel Di-2-Pyridyl-Derived Iron Chelators with Marked and Selective Antitumor Activity: In Vitro and in Vivo Assessment." *Blood* 104 (5): 1450–58. doi:10.1182/blood-2004-03-0868.
- Yun, Jihye, Carlo Rago, Ian Cheong, Ray Pagliarini, Philipp Angenendt, Kerstin Schmidt, James K V Wilson, et al. 2009. "Pathway Mutations in Tumor Cells." *Science* 325 (5947): 1555–59. doi:10.1126/science.1174229.Glucose.
- Zeisberg, Michael, and Eric G Neilson. 2009. "Biomarkers for Epithelial-Mesenchymal Transitions" 119 (6): 1429–37. doi:10.1172/JCI36183.protected.
- Zhang, Xueshu, Barry S. Rosenstein, Yan Wang, Mark Lebwohl, and Huachen Wei. 1997. "Identification of Possible Reactive Oxygen Species Involved in Ultraviolet Radiation-Induced Oxidative DNA Damage." *Free Radical Biology and Medicine* 23 (7): 980–85. doi:10.1016/S0891-5849(97)00126-3.

- Zhang, Z, L Miao, C Lv, H Sun, S Wei, B Wang, C Huang, and B Jiao. 2013. "Wentilactone B Induces G2/M Phase Arrest and Apoptosis via the Ras/Raf/MAPK Signaling Pathway in Human Hepatoma SMMC-7721 Cells." *Cell Death & Disease* 4 (January): e657. doi:10.1038/cddis.2013.182.
- Zhou, Jiangbing, Julia Wulfschlegel, Hao Zhang, Peihua Gu, Yanqin Yang, Jianghong Deng, Joseph B Margolick, Lance A Liotta, Emanuel Petricoin Iii, and Ying Zhang. 2007. "Activation of the PTEN/mTOR /STAT3 Pathway in Breast Cancer Stem-like Cells Is Required for Viability and Maintenance."
- Zhou, Shaoyu, Carlos M. Palmeira, and Kendall B. Wallace. 2001. "Doxorubicin-Induced Persistent Oxidative Stress to Cardiac Myocytes." *Toxicology Letters* 121 (3): 151–57. doi:10.1016/S0378-4274(01)00329-0.





Reproduced with permission from:

Identification of BP16 as a non-toxic cell-penetrating peptide with highly efficient drug delivery properties. Soler M, González-Bártulos M, Soriano-Castell D, Ribas X, Costas M, Tebar F, Massaguer A, Feliu L, Planas M. *Org Biomol Chem*. 2014 Mar 14;12(10):1652-63. DOI: 10.1039/C3OB42422G

Copyright © 2015 Royal Society of Chemistry







Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 1652

## Identification of BP16 as a non-toxic cell-penetrating peptide with highly efficient drug delivery properties†

Marta Soler,<sup>‡,a,b</sup> Marta González-Bártulos,<sup>‡,a,c</sup> David Soriano-Castell,<sup>d</sup> Xavi Ribas,<sup>a</sup> Miquel Costas,<sup>a</sup> Francesc Tebar,<sup>d</sup> Anna Massagué,<sup>\*c</sup> Lidia Feliu<sup>\*b</sup> and Marta Planas<sup>\*b</sup>

Antimicrobial peptides are an interesting source of non-cytotoxic drug delivery vectors. Herein, we report on the identification of a new cell-penetrating peptide (KKLFKILKKL-NH<sub>2</sub>, **BP16**) from a set of antimicrobial peptides selected from a library of cecropin-melittin hybrids (CECMEL11) previously designed to be used in plant protection. This set of peptides was screened for their cytotoxicity against breast adenocarcinoma MCF-7, pancreas adenocarcinoma CAPAN-1 and mouse embryonic fibroblast 3T3 cell lines. **BP16** resulted to be non-toxic against both malignant and non-malignant cells at concentrations up to 200 μM. We demonstrated by flow cytometry and confocal microscopy that **BP16** is mainly internalized in the cells through a clathrin dependent endocytosis and that it efficiently accumulates in the cell cytoplasm. We confirmed that the cell-penetrating properties of **BP16** are retained after conjugating it to the breast tumor homing peptide CREKA. Furthermore, we assessed the potential of **BP16** as a drug delivery vector by conjugating the anticancer drug chlorambucil to **BP16** and to a CREKA-BP16 conjugate. The efficacy of the drug increased between 6 and 9 times when conjugated to **BP16** and between 2 and 4.5 times when attached to the CREKA-BP16 derivative. The low toxicity and the excellent cell-penetrating properties clearly suggest that **BP16** is a suitable vector for the delivery of therapeutic agents into cells.

Received 4th December 2013,  
Accepted 10th January 2014

DOI: 10.1039/c3ob42422g

www.rsc.org/obc

## Introduction

The efficacy of anticancer treatments remains a key challenge in medicine. Current therapies are hindered by the appearance of toxic side effects and the development of multi-drug resistance by cancer cells.<sup>1,2</sup> Moreover, the use of therapeutic agents is limited by their low permeability through biological membranes. Therefore, there is an actual interest in developing new approaches to cancer treatment.<sup>3</sup> A promising strategy in this area is the use of cell-penetrating peptides (CPPs) as drug delivery systems.<sup>4–9</sup> CPPs are usually short cationic sequences

and may be derived from long peptides or proteins present in nature (*i.e.*, Tat peptide or penetratin) or *de novo* designed peptides (*i.e.*, transportan, polyarginine peptides, β-peptides, peptides, oligocarbamates or polyproline helices).<sup>9–12</sup> The mechanism of action of CPPs initially involves their binding to the negatively charged head groups of lipids or proteins in the plasma membrane which is then followed by their internalization. The exact mode of internalization is still poorly understood but it has been shown to depend on several factors such as the structure and concentration of the CPP as well as the cargo to be transported and the specific cell line.<sup>7,8,12–14</sup> It is believed that endocytosis is the major mode of uptake for CPPs; however, direct translocation can also occur. Due to their ability to cross biomembranes in a non-disruptive way, CPPs offer an opportunity to increase the bioavailability of drugs, enhancing their activity and reducing their dosage. In this sense, CPPs have been described as efficient carriers of nucleic acids, proteins, small molecule drugs and imaging agents.<sup>6–8,10,11,15–18</sup>

Focusing on the idea of obtaining new CPPs with very low toxicity, cationic antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as good candidates.<sup>12,19–23</sup> Like CPPs, AMPs are short sequences, containing between 9 and 30 amino acids, and most of them are cationic and amphipathic. These peptides show a broad spectrum of activity against bacteria, fungi, enveloped viruses, parasites, and tumor cells, while exhibiting

<sup>a</sup>QBIS-CAT Research Group, Institut de Química Computacional i Catàlisi (IQCC) and Departament de Química, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Catalonia, Spain

<sup>b</sup>LIPPSO, Departament de Química, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Catalonia, Spain. E-mail: marta.planas@udg.edu, lidia.feliu@udg.edu; Fax: +34 972418150; Tel: +34 972418274

<sup>c</sup>Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Catalonia, Spain. E-mail: anna.massagué@udg.edu; Fax: +34 972418150; Tel: +34 972418370

<sup>d</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Universitat de Barcelona, E-08036 Barcelona, Catalonia, Spain

†Electronic supplementary information (ESI) available: HPLC, ESI-MS and HRMS of peptides. See DOI: 10.1039/c3ob42422g

‡These authors contributed equally to this work.

low eukaryotic cytotoxicity.<sup>24–31</sup> Several AMPs are being studied for the treatment of human diseases, and some of them have already entered pre-clinical and clinical trials.<sup>26,27</sup> The mechanism of action of AMPs also includes their electrostatic interaction with the negatively charged phospholipid membranes causing morphological changes such as pore formation or cell lysis; however, their translocation into the cytoplasm is not uncommon.<sup>32–35</sup> Due to the latter property, the use of AMPs as CPPs is a field of interest to develop non-cytotoxic delivery vectors. In fact, AMPs, such as LL-37, SynB, melittin and bLFcin<sub>6</sub>, are able to translocate across human plasma membranes and to act as drug transporters.<sup>36–39</sup>

Binding of a low-molecular-weight drug to a CPP results in an improved uptake, which is associated with a decrease of the dose required to achieve a significant therapeutic effect.<sup>7</sup> In particular, several efforts have been made to conjugate the cytotoxic agent chlorambucil (CLB) to CPPs in order to improve its efficacy.<sup>40–43</sup> Chlorambucil (CLB) is a well-known nitrogen mustard typically used to treat leukemia, but also some breast, lung and ovarian cancers. It is believed that CLB is taken up by passive diffusion and alkylates DNA bringing about its cross-linking.<sup>44</sup> Although this nitrogen mustard is highly effective against certain cancers, its use is limited by the lack of selectivity and the low permeability through cell membranes. To overcome these limitations, CLB has been conjugated to CPPs such as pVEC or sC18.<sup>40,41,43</sup>

Despite the high efficiency of CPPs in mediating cellular uptake of pharmacologically active molecules, their use for targeted therapy is limited by their low level of selectivity. Several approaches aimed at improving the specificity of CPPs towards tumor cells have been developed.<sup>45</sup> One of these strategies relies on the conjugation of a CPP with a homing peptide. These peptides bind selectively to overexpressed receptors in human tumor cells providing a means of targeting CPPs towards desired cells or tissues.<sup>46–49</sup> However, most homing peptides have no internalization properties and only can deliver cargos to the cell surface. Thus, homing peptide-CPP conjugates may act as efficient vectors for drug delivery into a specific cell target, improving drug bioavailability, and decreasing side effects and toxicity in healthy cells. An example of a homing peptide is CREKA (Cys-Arg-Glu-Lys-Ala) which was identified by *in vivo* screening of phage-displayed peptide libraries in breast tumors of MMTV-PyMT transgenic mice. CREKA specifically homes to tumors by binding to fibrin and fibrin-associated clotted plasma proteins present in the vessels and the interstitial stroma of tumors.<sup>47,50–52</sup> Since CREKA is not able to internalize cancer cells, it is a good candidate to design peptide-mediated systems for targeted cell delivery of drugs.<sup>41,42</sup>

This study is focused on the search for new CPP candidates and was based on a library of linear undecapeptides (CECMEL11) previously described by Badosa and co-workers to be used for plant protection.<sup>53</sup> This library included sequences highly active against phytopathogenic bacteria and fungi, and low hemolytic activity. Similarly to CPPs, these peptides are cationic and are able to adopt an amphipathic structure. In

fact, one member of this library, **BP100**, has been described as an efficient CPP in plant tobacco cells.<sup>54</sup> This background prompted us to study the suitability of peptides from the CECMEL11 library as drug delivery vectors in cancer cells. We first selected several members of this library displaying different antimicrobial and hemolytic activity profiles. Some analogues containing arginine residues were also synthesized and included in the study. The cytotoxicity of these peptides was evaluated in cancer and healthy cell lines. The cellular uptake properties of the peptide with the optimal cytotoxic profile as CPP were then evaluated. We also examined the potential of this CPP candidate as a drug carrier by conjugating it to CLB. In addition, this candidate was conjugated to the homing peptide CREKA to obtain a selective delivery vector for CLB in cancer cells and to confirm that the cell penetrating properties were retained after the incorporation of CREKA and CLB. Thus, we evaluated the cytotoxicity of the CLB-CREKA-CPP conjugate against cancer and healthy cells and its cellular uptake properties.

## Results and discussion

### Peptide design and synthesis

AMPs represent a source of CPPs because both families share similar structural characteristics. With the aim of identifying new CPPs, we focused our attention on a 125-member library of AMPs (CECMEL11) previously described by Badosa and co-workers.<sup>53</sup> The general structure of this library is R-X<sup>1</sup>KLFKKILKX<sup>10</sup>L-NH<sub>2</sub>, where X<sup>1</sup> and X<sup>10</sup> correspond to amino acids with various degrees of hydrophobicity and hydrophilicity (Leu, Lys, Phe, Trp, Tyr, Val) and R includes different N-terminal derivatizations (H, Ac, Ts, Bz, Bn). Thus, peptides of this library are highly cationic and their amphipathic character becomes evident when they are represented by means of an Edmunson wheel plot. These structural features have been described as crucial for their antimicrobial activity and also may confer on them cell-penetrating properties.<sup>32–35</sup> In fact, **BP100**, a member of the CECMEL11 library, has been reported as an efficient agent to transport cargoes into plant cells.<sup>54</sup>

In the present study, we examined the ability of sequences of this CECMEL11 library to internalize cancer cells and to transport a drug. Two sets of peptides were considered: (i) undecapeptides **BP16**, **BP76**, **BP81**, **BP100** and **BP105**, and the Arg-containing peptides **BP307** and **BP308**; and (ii) peptide conjugates containing in their structure: the undecapeptide **BP16** and the DNA alkylating agent CLB (**BP325**), **BP16** and the homing peptide CREKA (**BP327**), and **BP16**, CLB and CREKA (**BP329**). To analyze the cellular internalization, **BP16**, **BP325**, **BP327**, and **BP329** were labeled with 5(6)-carboxyfluorescein (CF).

The five peptides of the first set (**BP16**, **BP76**, **BP81**, **BP100** and **BP105**) (Table 1) were selected based on their distinct antibacterial activity against the plant pathogens *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas vesicatoria*, and their different hemolysis percentage at 150 μM.<sup>53</sup> **BP100** and

Table 1 Peptide sequences, retention times and purities on HPLC and HRMS data

Peptide	Sequence <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> <sup>b</sup> (min)	Purity <sup>c</sup> (%)	HRMS
BP16	KKLFKKILKKL	5.98	87	347.2575 [M + 4H] <sup>4+</sup> , 462.6733 [M + 3H] <sup>3+</sup>
BP76	KKLFKKILKFL	6.40	93	352.0004 [M + 4H] <sup>4+</sup> , 468.9983 [M + 3H] <sup>3+</sup>
BP81	LKLFKKILKFL	6.80	92	348.2477 [M + 4H] <sup>4+</sup> , 463.9946 [M + 3H] <sup>3+</sup>
BP100	KKLFKKILKYL	7.40	100	355.9977 [M + 4H] <sup>4+</sup> , 474.3282 [M + 3H] <sup>3+</sup>
BP105	LKLFKKILKYL	6.65	90	352.2490 [M + 4H] <sup>4+</sup> , 469.3289 [M + 3H] <sup>3+</sup>
BP307	RRLFRILRYL	7.83	100	391.0091 [M + 4H] <sup>4+</sup> , 521.0091 [M + 3H] <sup>3+</sup>
BP308	RRLFRILRRL	6.08	99	311.6168 [M + 5H] <sup>5+</sup> , 389.2674 [M + 4H] <sup>4+</sup>
	CREKA	6.63	98	303.1636 [M + 2H] <sup>2+</sup> , 605.3194 [M + H] <sup>+</sup>
BP327	CREKA-KKLFKKILKKL	6.99	95	395.4636 [M + 5H] <sup>5+</sup> , 494.0771 [M + 4H] <sup>4+</sup>
BP325	CLB-KKLFKKILKKL	7.71	91	418.5260 [M + 4H] <sup>4+</sup> , 558.3644 [M + 3H] <sup>3+</sup>
	CLB-CREKA	6.90	90	445.6966 [M + 2H] <sup>2+</sup> , 890.3832 [M + H] <sup>+</sup>
BP329	CLB-CREKA-KKLFKKILKKL	6.92	92	452.4770 [M + 5H] <sup>5+</sup> , 565.3442 [M + 4H] <sup>4+</sup>
CF-BP16	CF-KKLFKKILKKL	6.76, 6.80 <sup>d</sup>	93	437.0217 [M + 4H] <sup>4+</sup> , 582.3589 [M + 3H] <sup>3+</sup>
	CF-CREKA	6.25	95	482.1862 [M + 2H] <sup>2+</sup> , 963.3620 [M + H] <sup>+</sup>
BP328	CF-CREKA-KKLFKKILKKL	7.89	97	583.5907 [M + 4H] <sup>4+</sup> , 777.7843 [M + 3H] <sup>3+</sup>
BP326	CLB-KKLFKKIL(CF)KL	7.56	81	677.0473 [M + 3H] <sup>3+</sup> , 1015.0638 [M + 2H] <sup>2+</sup>
BP330	CLB-CREKA-KKLFKKIL(CF)KL	7.53	91	654.8565 [M + 4H] <sup>4+</sup> , 872.8045 [M + 3H] <sup>3+</sup>

<sup>a</sup> All peptides are C-terminal amides. <sup>b</sup> HPLC retention time. <sup>c</sup> Percentage determined by HPLC at 220 nm from the crude reaction mixture. <sup>d</sup> Retention time corresponding to the two isomers of the 5(6)-carboxyfluorescein (CF) labeled peptide.

BP76 are highly active against these phytopathogens (MIC of 2.5 to 7.5  $\mu$ M) and low hemolytic (22–34%), BP81 is highly active (MIC of <2.5 to 5  $\mu$ M) and moderately hemolytic (65%), BP105 is highly active (MIC of 2.5 to 7.5  $\mu$ M) and highly hemolytic (91%), and BP16 is poorly active (MIC > 7.5  $\mu$ M) and non-hemolytic (0%).

The Arg-containing peptides BP307 and BP308 were derived from BP100 and BP16, respectively (Table 1). They were included in this study because most common CPPs, such as Tat or penetratin, are Arg-rich peptides.<sup>55</sup> This residue has been shown to play a key role in peptide internalization due to the hydrogen-bond formation of the guanidino moiety with phosphates, sulfates and carboxylates on cellular components. BP307 and BP308 were tested for their antibacterial activity against the above pathogens and for their hemolysis. The replacement of Lys for Arg in BP16 and BP100 significantly influenced the antibacterial activity. While BP307 resulted to be less active (MIC of 6.2 to 12.5  $\mu$ M) than BP100, BP308 displayed higher antibacterial activity (MIC of 3.1 to 12.5  $\mu$ M) than BP16. In contrast, the hemolysis was not affected and BP307 and BP308 exhibited a similar hemolytic activity (28% and 1%, respectively) as the corresponding parent peptide.

Peptide conjugates included in the second set were designed based on BP16 (Table 1), which showed the best profile as a drug delivery vector among all the above tested undecapeptides (see below). Peptide BP325 was prepared by coupling CLB to the N-terminus of BP16 via an amide bond. The use of CLB is hampered by its low stability in aqueous environments and its low permeability through biomembranes, limitations that have been overcome by its conjugation to a CPP.<sup>41–44</sup> Moreover, since the use of homing peptides has been described to increase the cell-type specificity of CPPs, BP327 was designed by conjugating the homing peptide CREKA to the N-terminus of BP16. CREKA was selected for its excellent targeting ability to breast tumors and because its linear structure avoids the additional cyclization step required

for most other homing peptides. In addition, with the aim of improving the specificity of the cytotoxic agent CLB, BP329 was synthesized by attaching CLB to CREKA-BP16. Control peptides CREKA and CLB-CREKA were also prepared (Table 1).

These peptides were manually synthesized on a Fmoc-Rink-MBHA resin or on an aminomethyl ChemMatrix resin following a standard Fmoc/tBu strategy and were obtained as C-terminal amides. Couplings of the conveniently protected Fmoc-amino acids and of CLB were mediated by ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate (Oxyma) and *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) in *N,N*-dimethylformamide (DMF) or *N*-methyl-2-pyrrolidinone (NMP), depending on the length of the sequence. Peptides were cleaved from the resin by acidolytic treatment and were obtained in excellent purities (87–100%, Table 1), as determined by analytical HPLC. Their identity was confirmed by ESI-MS and HRMS.

On the other hand, BP16 and BP327 (CREKA-BP16) were labeled with 5(6)-carboxyfluorescein by coupling this fluorescent label to their N-terminus leading to CF-BP16 and BP328, respectively (Table 1). 5(6)-Carboxyfluorescein labeled CREKA was also prepared (CF-CREKA). Moreover, BP325 (CLB-BP16) and BP329 (CLB-CREKA-BP16), incorporating CLB at the N-terminus, were labeled at the side-chain of Lys<sup>9</sup> of the BP16 fragment, affording BP326 and BP330, respectively. 5(6)-Carboxyfluorescein was introduced using DIPCDI and Oxyma, followed by piperidine washes before cleavage of the peptide from the resin. These washes served to remove overincorporated carboxyfluorescein moieties.<sup>56</sup> For the synthesis of peptides BP326 (CLB-BP16(CF)) and BP330 (CLB-CREKA-BP16(CF)), the lysine residue to be labeled was incorporated as Fmoc-Lys(Dde)-OH. The *N*-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl] (Dde) group was selectively removed by treatment with hydrazine prior to the coupling of the fluorescent label. Acidolytic cleavage afforded the labeled peptides in excellent purities (81–97%), and they were characterized by ESI-MS and HRMS.

### Cell cytotoxicity of the CPP candidates

A good CPP to be used as a delivery vector of an anticancer drug must display no toxicity against cancer as well as healthy cells. Hence, the cytotoxicity of undecapeptides **BP16**, **BP76**, **BP81**, **BP100**, **BP105**, **BP307** and **BP308** was screened in breast adenocarcinoma MCF-7 and pancreas adenocarcinoma CAPAN-1 cell lines. The  $IC_{50}$  was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay after 48 h of peptide exposure. As shown in Table 2, except for **BP100**, the undecapeptides were more active against CAPAN-1 than against MCF-7 cells. The cytotoxic activity of **BP76** and **BP105** was significant against these two cell lines, displaying  $IC_{50}$  values of 23.5 and 22.7  $\mu\text{M}$  against CAPAN-1, respectively, and of 26.3 and 29.2  $\mu\text{M}$  against MCF-7 cells, respectively. **BP81**, **BP100** and its Arg-containing analogue **BP307** were considerably active against one cell line with  $IC_{50}$  values ranging from 24.2 to 35.7  $\mu\text{M}$ . **BP16** and **BP308** were the least cytotoxic undecapeptides. **BP308** showed an  $IC_{50}$  of 148.2 and 97.0  $\mu\text{M}$  against MCF-7 and CAPAN-1 cells, respectively, and **BP16** displayed no cytotoxic effects against any of the cancer cell lines tested ( $IC_{50} > 200 \mu\text{M}$ ).

These results indicate that these undecapeptides exhibit lower cytotoxicity against cancer cells in comparison with their antibacterial activity. However, the structural features that govern the anticancer activity of the CECMEL11 library sequences, **BP16**, **BP76**, **BP81**, **BP100** and **BP105**, correlate with the general trend for the antibacterial activity of this library.<sup>53</sup> Thus, peptides with a net charge of +5 or +6 displayed high cytotoxic activity, whereas **BP16** that has a net charge of +7 was inactive. Moreover, **BP16**, **BP76**, and **BP100** that only differ in the amino acid at position 10 displayed a very distinct cytotoxic activity. The same effect was observed for **BP307** and **BP308**. This result confirms previous data on how subtle changes in a peptide sequence influence the biological activity.<sup>57–59</sup> On the other hand, the replacement of Lys with Arg in **BP16** and **BP100** caused a different effect on the cytotoxicity. While this replacement slightly influenced the cytotoxicity of **BP100**, the Arg-containing sequence **BP308** showed an increased antiproliferative activity compared to **BP16**.

One of the major drawbacks of drug delivery applications of CPPs is their toxicity to normal cells. In this sense, AMPs are interesting CPP candidates because it has been reported that some AMPs with anticancer activity do not show significant cytotoxicity against normal cells at peptide concentrations that are able to kill cancer cells.<sup>19,24,26,28</sup> Parameters that would

account for the selective binding of AMPs to cancer cells involves the higher net negative charge and membrane fluidity of cancer cells as compared to normal cells. Therefore, due to their cationic nature, the undecapeptides of this study may preferentially bind to cancer cell membranes by electrostatic interaction and subsequently enter cells.

The analysis of the activity of undecapeptides on non-malignant mouse embryonic fibroblasts 3T3 revealed that the antiproliferative activity of **BP76** and **BP81** was high, with  $IC_{50}$  values of 13.5 and 15.5  $\mu\text{M}$ , respectively (Table 2). **BP100**, **BP105**, **BP307** and **BP308** were moderately active ( $IC_{50}$  of 39.0 to 68.0  $\mu\text{M}$ ). Notably, **BP16** was non-toxic against this cell line exhibiting an  $IC_{50} > 200 \mu\text{M}$ . Furthermore, we also used the hemolysis assay to assess the toxicity of these peptides.<sup>53</sup> As mentioned above, except for **BP105** and **BP81**, undecapeptides displayed low hemolysis at 150  $\mu\text{M}$  (0–34%). Interestingly, **BP16** and its Arg analogue **BP308** were nonhemolytic even at 375  $\mu\text{M}$  (data not shown). Even though these undecapeptides did not show selectivity between the malignant and non-malignant cell lines tested, some sequences (**BP76**, **BP100**, and **BP307**) did not show significant hemolytic activity at concentrations much higher than the  $IC_{50}$  values against the cancer cell lines tested.

Moreover, the stability in fetal bovine serum of **BP16** was also evaluated and compared to that of Tat<sub>49</sub>. After exposure to 10% serum at different time intervals, the presence of peptide was analyzed by HPLC. Results showed that both peptides exhibited a similar stability, with 70% degradation after 45 min of incubation.

Taken together, these results allowed the identification of **BP16**, a short and highly cationic peptide with a suitable activity profile to be considered as an excellent CPP candidate. In particular, in contrast to most common CPPs that exhibited cytotoxicity even at low concentrations,<sup>60–63</sup> **BP16** was non-toxic to both malignant and non-malignant cell lines at concentrations up to 200  $\mu\text{M}$  and, therefore, was selected for further studies.

### Cellular uptake of BP16

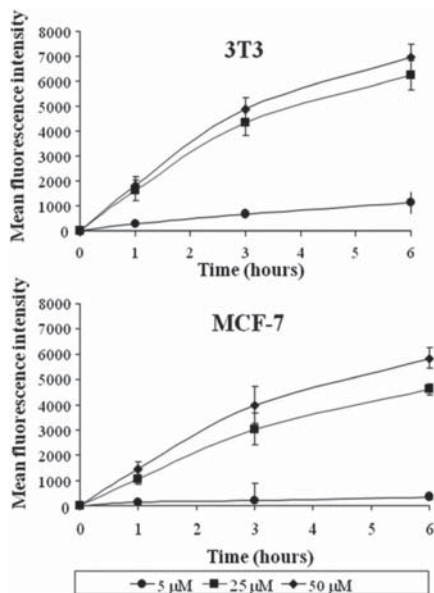
To characterize the capacity of internalization of **BP16** into cancer and non-malignant cells, MCF-7 and 3T3 cells were incubated at 37 °C with 5(6)-carboxyfluorescein labeled **BP16** (**CF-BP16**) at different concentrations (0, 5, 25 and 50  $\mu\text{M}$ ) for different times (1, 3 and 6 h) (Fig. 1). The mean fluorescence of the cells, corresponding to the peptide uptake, was

**Table 2** Cytotoxicity of the set of undecapeptides in 3T3, MCF-7 and CAPAN-1 cells and their hemolytic activity

	Cell line	<b>BP16</b>	<b>BP76</b>	<b>BP81</b>	<b>BP100</b>	<b>BP105</b>	<b>BP307</b>	<b>BP308</b>
$IC_{50}$ <sup>a</sup> ( $\mu\text{M}$ )	3T3	>200	13.5 $\pm$ 0.7	15.5 $\pm$ 0.7	62.5 $\pm$ 6.4	39.0 $\pm$ 8.5	40.0 $\pm$ 7.1	68.0 $\pm$ 7.6
	MCF-7	>200	26.3 $\pm$ 7.5	40.0 $\pm$ 3.4	34.3 $\pm$ 4.0	29.2 $\pm$ 4.2	64.7 $\pm$ 12.5	148.2 $\pm$ 8.8
	CAPAN-1	>200	23.5 $\pm$ 7.0	24.2 $\pm$ 7.2	57.7 $\pm$ 13.3	22.7 $\pm$ 1.5	35.7 $\pm$ 1.5	97.0 $\pm$ 15.4
Hemolysis <sup>b</sup> (%)		0	34 $\pm$ 2.1	65 $\pm$ 1.5	22 $\pm$ 2.8	91 $\pm$ 6.2	28 $\pm$ 3.2	1 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup> The  $IC_{50}$  values were determined by the MTT assay after 48 h of peptide exposure. Data represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments performed in triplicate. <sup>b</sup> Percent hemolysis at 150  $\mu\text{M}$ . The confidence interval for the mean is included.

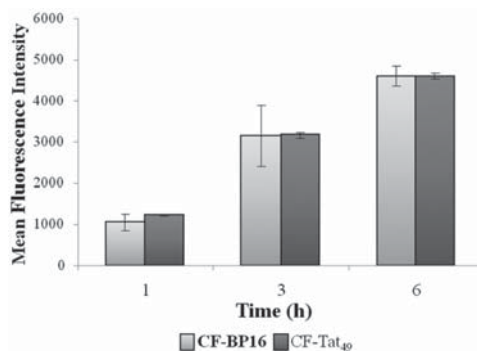




**Fig. 1** Kinetics of the cellular uptake of **BP16**. 3T3 and MCF-7 cells were exposed to different concentrations of 5(6)-carboxyfluorescein-labeled **BP16** (**CF-BP16**) (0, 5, 25 and 50  $\mu\text{M}$ ) at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 1, 3 and 6 h. The fluorescence intensity of the cells, corresponding to the intracellular uptake of the peptide, was determined by flow cytometry. Each point in the graphs represents the mean intracellular fluorescence intensity of three independent experiments  $\pm$  SE.

quantified by flow cytometry. Cells were harvested by trypsinization, which also prevented non-specific plasma membrane binding of the peptide. As represented in Fig. 1, **CF-BP16** was efficiently internalized by the cells in a time and concentration-dependent manner. The mean fluorescence of the cells increased over time with parallel internalization kinetics in both cell lines. The cellular uptake of **CF-BP16** was intense during the first 3 h of incubation, particularly when the cells were treated with the peptide at 25 and 50  $\mu\text{M}$ . After treatment with 50  $\mu\text{M}$  **CF-BP16**, the mean fluorescence of 3T3 cells increased from  $5 \pm 2$  (0 h) to  $1829 \pm 335$  (1 h),  $4895 \pm 464$  (3 h) and  $6953 \pm 536$  (6 h), while the mean fluorescence of MCF-7 cells rose from  $4 \pm 1$  (0 h) to  $1431 \pm 307$  (1 h),  $3997 \pm 720$  (3 h) and  $5830 \pm 410$  (6 h). These results point out that the internalization of **CF-BP16** is more elevated in the non-malignant 3T3 cells than in MCF-7 cells, indicating the lack of selectivity of **BP16** for cancer cells.

A good correlation between peptide concentration and its uptake by cells was observed, especially when they were treated with 5 and 25  $\mu\text{M}$  **CF-BP16**. At the different incubation times, when **CF-BP16** concentration was increased from 5 to 25  $\mu\text{M}$ , the mean cellular fluorescence increased by 5 to 6-fold in 3T3 cells and by 8- to 13-fold in MCF-7 cells. In contrast, slight differences in the mean cellular fluorescence (less than 1.7-fold increase) were determined when both cell lines were incubated with **CF-BP16** at 25 or 50  $\mu\text{M}$ , revealing a saturation of

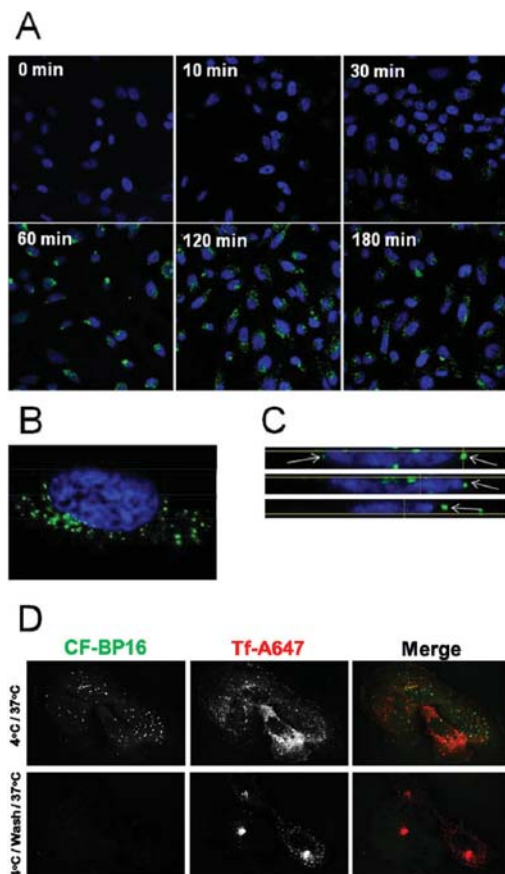


**Fig. 2** Uptake of 5(6)-carboxyfluorescein labeled peptides **CF-BP16** and **CF-Tat<sub>49</sub>** into MCF-7 cells. Cells were exposed to the peptide at 25  $\mu\text{M}$  at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 1, 3 and 6 h. Each column in the graph represents the mean fluorescence intensity of the cells determined in three independent experiments  $\pm$  SD.

the peptide uptake by the cells at concentrations higher than 25  $\mu\text{M}$ .

We compared the capacity of internalization of **BP16** with that of the well-known CPP **Tat<sub>49</sub>**.<sup>10</sup> With this aim, MCF-7 cells were incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  with **CF-BP16** and **CF-Tat<sub>49</sub>** at 25  $\mu\text{M}$  for 1, 3 and 6 h (Fig. 2). Interestingly, **CF-BP16** and **CF-Tat<sub>49</sub>** showed the same mean fluorescence intensity values indicating that **BP16** exhibits an excellent cellular uptake.

To gain more insight into the internalization and intracellular distribution of **BP16**, the cellular uptake of **CF-BP16** was further analyzed by confocal microscopy. For this purpose, MCF-7 cells were incubated with 25  $\mu\text{M}$  **CF-BP16** at 4  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min and at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 10, 30, 60, 120 and 180 min (Fig. 3A). No fluorescence was observed after 30 min of incubation at 4  $^{\circ}\text{C}$ . However, when the cells were treated at 37  $^{\circ}\text{C}$ , a very faint punctuate fluorescent staining was observed inside the cells after 10 min, revealing an incipient cellular uptake of the peptide. The number of fluorescent particles gradually increased over time and, after 180 min of incubation, there was a prominent fluorescent staining inside the cells, demonstrating intense internalization of the peptide during this period of time. Higher magnification (1000 $\times$ ) images from cells exposed to **CF-BP16** for 180 min (Fig. 3B) revealed that the fluorescent particles were located throughout the whole cytoplasm, with significant clustering at the periphery of the cell nucleus. An optical sectioning indicated that no fluorescence particles were placed inside the cell nucleus (Fig. 3C). In addition, to find out whether **CF-BP16** cellular entry was dependent on specific interaction with the plasma membrane, MCF-7 cells were pre-incubated with 25  $\mu\text{M}$  **CF-BP16** at 4  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min and, after extensive washing with saline phosphate buffer, were incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 25 min. **CF-BP16** internalization was also compared with the Alexa647-conjugated transferrin (**Tf-A647**) which is a well-known model of receptor dependent internalized ligands. Confocal images revealed that while transferrin-A647 labelled endocytic structures inside the cell as expected, no intracellular **CF-BP16** was observed



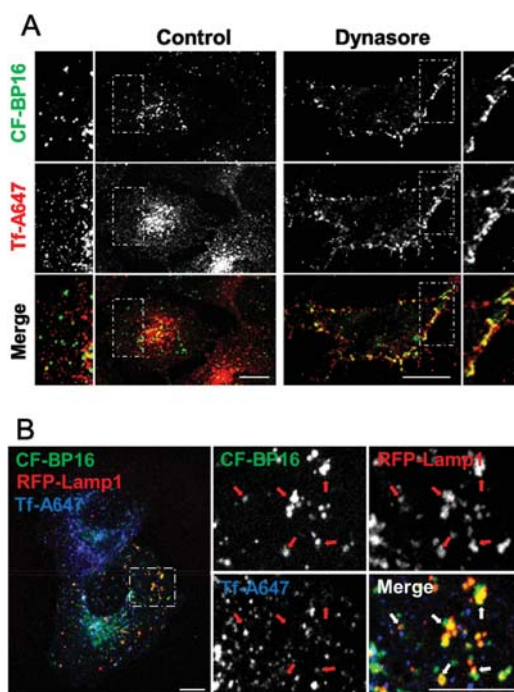
**Fig. 3** Confocal microscopic imaging of the internalization of 5(6)-carboxyfluorescein-labeled BP16 (CF-BP16) into MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were exposed for 30 min at 4 °C to 25  $\mu\text{M}$  CF-BP16 and then incubated for the indicated times at 37 °C. The localization of CF-BP16 is indicated by the green fluorescence. The cell nuclei were stained with Hoeschst (blue). (B) Higher-magnification (1000 $\times$ ) image of a MCF-7 cell after 180 min of treatment. (C) Three slices of a merged *xz* reconstruction of the image stack (slices at 0.3 microns on the *z*-axis) are represented. Arrows indicate the perinuclear localization of CF-BP16. (D) MCF-7 cells were pre-incubated for 30 min at 4 °C with 25  $\mu\text{M}$  CF-BP16 and transferrin-A647 (Tf-A647, 60  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and then incubated for 25 min at 37 °C with or without a previous saline phosphate buffer wash as indicated. Confocal images were acquired through the Alexa647 (red) and CF (green) channels.

(Fig. 3D). This result may indicate the possibility that CF-BP16 is weakly membrane associated and removed after washes or that CF-BP16 could be receptor independent and preferentially fluid phase internalized.

These findings highlight a plausible mechanism for the internalization of BP16. The mechanism of CPP uptake is controversial and still under debate. Two main pathways have been suggested: endocytosis and direct translocation across the membrane bilayer.<sup>7,8,12–14</sup> These cell uptake phenomena can be related to the hydrophobicity of the CPP. Translocation

has been associated with hydrophobic peptides while hydrophilic and amphipathic sequences can be internalized by both mechanisms.<sup>64</sup> In addition, the endocytosis process is energy-dependent and is assumed to be inhibited by peptide incubation at low temperature. Altogether, the results observed for the incubation of CF-BP16 in MCF-7 cells at 4 and 37 °C suggest that the endocytic pathway may play a major role in BP16 internalization.

To further characterize the BP16 endocytosis, the role of dynamin, which is involved in vesicle scission from plasma membrane, was analysed by means of dynamin inhibition using the specific inhibitor dynasore (Fig. 4).<sup>65</sup> The BP16 endocytosis was also compared with the transferrin protein as a specific marker of a dynamin dependent endocytosis. MCF-7 cells were pre-incubated with 100  $\mu\text{M}$  of dynasore for 15 min at 37 °C and then CF-BP16 and Tf-A647 were added and further incubated for 60 min. Confocal microscopy images showed an accumulation of Tf-A647 and CF-BP16 in the same structures at the plasma membrane after dynasore treatment, likely unscissored clathrin coated pits (CCPs) (Fig. 4A). On the other hand, in control cells, CF-BP16 and



**Fig. 4** CF-BP16 is dynamin dependent internalized, and follows the endocytic degradation pathway. (A) MCF-7 cells were pre-incubated for 15 min at 37 °C with or without 100  $\mu\text{M}$  dynasore and then CF-BP16 (25  $\mu\text{M}$ ) and Alexa647-labelled transferrin (Tf-A647, 60  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) were added and further incubated for 60 min. Confocal images were acquired through the Alexa647 (red) and CF (green) channels. (B) MCF-7 cells expressing RFP-Lamp1 (red) were incubated with CF-BP16 (green) and Tf-A647 (blue) for 60 min at 37 °C. Insets show magnified images and arrows indicate CF-BP16/RFP-Lamp1 positive vesicles (bars are 10  $\mu\text{m}$ ).

Tf-A647 were found mostly in different endocytic structures inside the cell (Fig. 4A). Indeed, a high degree of co-localization between CF-BP16 and the ectopically expressed RFP-Lamp1,<sup>66</sup> a marker of late endosomes and lysosomes, was clearly detected (Fig. 4B). These results suggest that CCPs are an important port of entry for BP16. However, BP16 and transferrin follow different endocytic pathways inside the cell, a known recycling pathway for transferrin and a degradation route for BP16.

Next, in order to ascertain the importance of clathrin dependent endocytosis (CDE), the role of this dynamin dependent pathway in CF-BP16 uptake was examined in cells overexpressing the Cherry-DPF fragment of Eps15 protein, which by sequestering AP-2 inhibits CDE (Fig. 5).<sup>67</sup> The CF-BP16 endocytosis was also compared with the related CF-Tat<sub>49</sub> peptide and the Tf-A647, which is specifically internalized *via* CDE. Confocal images in Fig. 5 (panels A and B) showed that

Tf-A647, CF-BP16 and CF-Tat<sub>49</sub> entry was strongly inhibited in those Cherry-DPF overexpressing cells compared to non-expressing cells. In order to quantify such inhibition, internalization of Tf-A647 and CF-BP16 or CF-Tat<sub>49</sub> was measured by flow cytometry and compared to dextran-FITC, which enters cells by fluid phase and therefore *via* clathrin dependent and independent pathways. Flow cytometry analysis revealed that transferrin uptake was ~55% inhibited in highly cherry-DPF expressing cells compared to non-transfected cells, while BP16 and dextran were inhibited by ~47% and ~33%, respectively (Fig. 5C).

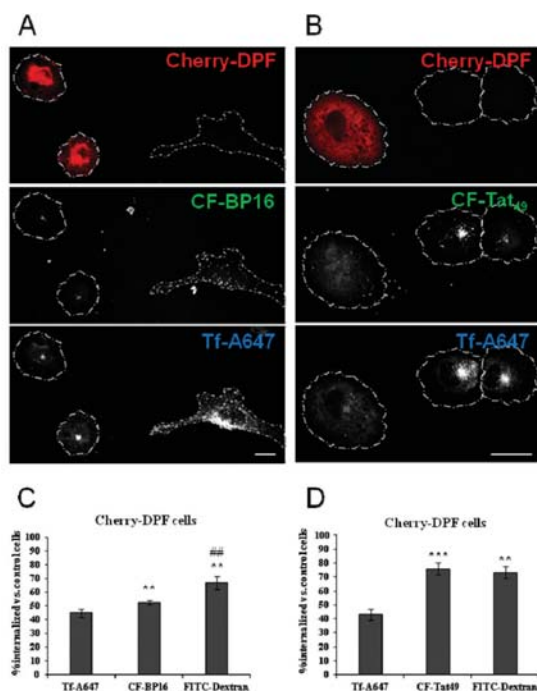
Given that transferrin endocytosis, which is totally dependent on CDE, was ~55% inhibited and that inhibition of BP16 was close to transferrin and higher than dextran (~47% *vs.* ~33%), it can be reasoned that CDE is playing a major role in BP16 internalization. Moreover, flow cytometry inhibition data obtained from Tat<sub>49</sub> uptake (~19%) compared to dextran (Fig. 5D) suggests that CDE is less important for Tat<sub>49</sub> internalization than for BP16. These results indicate that both peptides, BP16 and Tat<sub>49</sub>, are differentially internalized.

In summary, BP16 internalization is dynamin dependent and it is mainly internalised *via* clathrin dependent endocytosis possibly through a weak plasma membrane interaction or by fluid phase, which is also in agreement with the BP16 localization in late endosomes after 60 min of endocytosis in MCF-7 cells.

#### Cell cytotoxicity of peptide conjugates

The potential use of BP16 as a vector for the delivery of the DNA alkylating agent CLB was assessed by exposing MCF-7, CAPAN-1 and 3T3 cells to CLB and the CLB-BP16 conjugate (BP325). The IC<sub>50</sub> was determined by the MTT assay after 48 h of peptide exposure. As shown in Table 3, CLB alone exhibited low cytotoxicity against the three cell lines (IC<sub>50</sub> of 73.7 to 152.5 μM). In contrast, BP325 displayed high activity, with IC<sub>50</sub> values of 12.0, 13.7 and 20.6 μM against MCF-7, CAPAN-1 and 3T3 cells, respectively. Thus, the conjugation of CLB to BP16 increased the cell cytotoxicity of this nitrogen mustard by 6-fold in MCF-7 cells, by 7-fold in 3T3 cells and by 9-fold in CAPAN-1 cells. Since BP16 is non-toxic at these concentrations (IC<sub>50</sub> > 200 μM), this toxicity must be attributed to the CLB moiety. This increase of activity clearly demonstrates that BP16 contributes to the internalization of CLB through the cell membrane, enhancing its efficacy. Therefore, in agreement with earlier reports, the mechanism of action of the CLB-BP16 conjugate seems to be much more efficient than the passive diffusion mechanism suggested for CLB alone.<sup>41–44</sup>

Homing peptides are employed to enhance the selectivity of CPPs towards malignant cells.<sup>46–49</sup> Thus, we next investigated whether the cell-penetrating properties of BP16 were retained after conjugation with the breast tumor homing peptide CREKA and also whether this homing peptide-CPP conjugate could provide selective internalization of CLB into cancer cells. With this aim, the cytotoxicity of the conjugate CLB-CREKA-BP16 (BP329) was evaluated in MCF-7, CAPAN-1 and 3T3 cells. CREKA, CLB-CREKA and the conjugate CREKA-BP16



**Fig. 5** Clathrin dependent endocytosis is playing a key role in CF-BP16 uptake. (A, B) Confocal images of MCF-7 cells expressing Cherry-DPF and incubated with Tf-A647 (60 μg ml<sup>-1</sup>) and CF-BP16 (25 μM) (A) or CF-Tat<sub>49</sub> (25 μM) (B) for 60 min at 37 °C (bars are 20 μm). (C, D) Internalization of FITC-dextran (2 mg ml<sup>-1</sup>), Tf-A647 and CF-BP16 (C) or CF-Tat<sub>49</sub> (D) after 60 min at 37 °C was quantified by flow cytometry in Cherry-DPF expressing cells as described in the Experimental section. Histograms show the percentage of the indicated molecules internalized in highly Cherry-DPF expressing cells *versus* non-expressing cells. Each column represents the mean fluorescence intensity of the cells determined in four independent experiments ± SD. Statistical significances between different molecules were determined using the Student's *t*-test, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 *vs.* Tf-A647; ##*p* < 0.01 *vs.* CF-BP16.



**Table 3** Cytotoxicity of **BP16**, CREKA, chlorambucil (CLB), CLB-CREKA, and peptide conjugates in 3T3, MCF-7 and CAPAN-1 cells

	Cell line	<b>BP16</b>	CREKA	<b>BP327</b>	CLB	CLB-CREKA	<b>BP325</b>	<b>BP329</b>
IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	3T3	>200	>200	74.5 ± 4.1	152.5 ± 5.6	>200	20.6 ± 3.3	33.7 ± 1.9
	MCF-7	>200	>200	74.7 ± 8.8	73.7 ± 4.5	>200	12.0 ± 2.7	35.2 ± 1.8
	CAPAN-1	>200	>200	76.2 ± 0.8	129.0 ± 35.5	>200	13.7 ± 2.4	33.0 ± 1.0

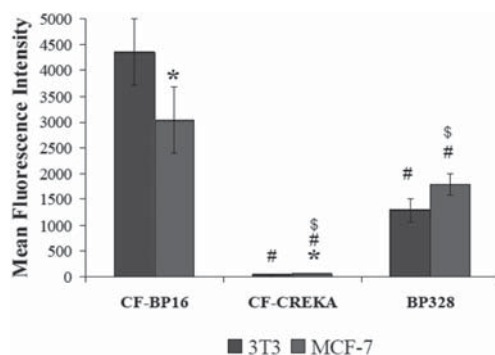
<sup>a</sup>The IC<sub>50</sub> values were determined by the MTT assay after 48 h of peptide exposure. Data represent the mean ± SD of at least three independent experiments performed in triplicates.

(**BP327**) were also assayed for comparison purposes. CREKA and CLB-CREKA were non-toxic (IC<sub>50</sub> > 200 μM) and **BP327** displayed low cytotoxicity (IC<sub>50</sub> of 74.5 to 76.2 μM). In contrast, the conjugate CLB-CREKA-BP16 (**BP329**) was significantly active, with IC<sub>50</sub> values ranging from 33.0 to 35.2 μM. These results showed that the incorporation of CREKA decreased the activity of the CLB-BP16 conjugate **BP325**; however, they confirmed that **BP16** was able to internalize both CREKA and CLB since the cytotoxicity of **BP329** (CLB-CREKA-BP16) increased 2- to 4.5-fold the one of CLB alone. Furthermore, the lack of selectivity observed for **BP329** could be attributed to the fact that CREKA was originally identified by *in vivo* phage display and recognized fibrin-associated clotted plasma proteins in the tumor stroma.<sup>47,50–52</sup> On this basis, the behavior of CREKA *in vitro* could differ from the one previously described *in vivo*. However, these results show that **BP329** displayed a higher activity than CLB alone proving the validity of **BP16** as CPP for cell delivery of therapeutically useful molecules.

### Cellular uptake of CLB peptide conjugates

In order to determine whether the differences in cytotoxic activity of the CLB peptide conjugates **BP325** (CLB-BP16) and **BP329** (CLB-CREKA-BP16) were related to their internalization properties, these conjugates were labeled with 5(6)-carboxy-fluorescein (CF) affording **BP326** and **BP330**, respectively, and analyzed by flow cytometry. In addition, the homing peptide CREKA and the CREKA-BP16 conjugate (**BP327**) were also labeled (CF-CREKA and **BP328**, respectively) and included in the study.

The cellular uptake of CF-CREKA and **BP328** at 25 μM was determined by flow cytometry after 3 h of incubation in 3T3 and MCF-7 cells at 37 °C. As represented in Fig. 6, very low intracellular fluorescence levels were detected in both cell lines when treated with CF-CREKA, indicating that CREKA alone was unable to internalize into the cells. These results are in accordance with previous studies describing that CREKA displays no cell-penetrating capacity in cultured breast cancer cells.<sup>42</sup> When comparing the fluorescence of **CF-BP16** and **BP328** (CF-CREKA-BP16), it was observed that the cell-penetrating properties of **BP16** were significantly reduced when conjugated to the homing peptide, probably because the coupling of CREKA restricts the interaction of **BP16** with the cell membrane. Notably, as shown by the intracellular fluorescence levels, **BP328** retains significant internalization ability which is required to deliver cytotoxic agents inside the cells.



**Fig. 6** Uptake of 5(6)-carboxyfluorescein labeled peptides **CF-BP16**, **CF-CREKA** and **BP328** (CF-CREKA-BP16) into 3T3 and MCF-7 cells. Cells were exposed to the peptides at 25 μM for 3 h at 37 °C. Each column in the graph represents the mean fluorescence intensity of the cells determined in three independent experiments ± SD. \**p* < 0.05 vs. 3T3 cells; #*p* < 0.05 vs. **CF-BP16** treated cells; \$*p* < 0.05 vs. **CF-CREKA**.

The internalization ability of the CLB peptide conjugates **BP326** (CLB-BP16(CF)) and **BP330** (CLB-CREKA-BP16(CF)) at 25 μM was evaluated by flow cytometry in MCF-7 cells after 3 h of incubation at 37 °C. To our surprise, while the fluorescence of **BP326** (4272 ± 453) was not significantly different from that of **CF-BP16** (3035 ± 643), **BP330** showed a considerably higher intracellular fluorescence (3966 ± 217) than **BP328** (CF-CREKA-BP16) (1789 ± 221). These results are noteworthy since they prove that **BP16** is able to efficiently internalize both CLB and CREKA.

These findings also reveal that the incorporation of either CREKA and/or CLB has a strong influence on the cellular uptake of **BP16**, reflecting that any modification in the molecular structure of this peptide can lead to relevant changes in its cell penetrating properties. In fact, it has been reported that the cargo plays an important role in the internalization mechanism of CPPs.<sup>8,11</sup> Interestingly, despite these modifications, **BP16** remains an efficient drug delivery vector.

## Conclusions

In the present study, we have identified **BP16** as a new CPP with high cellular uptake *in vitro*. In contrast to other CPPs previously reported, **BP16** displays no cytotoxicity against malignant and non-malignant cells and, moreover, shows no

hemolytic activity. We have demonstrated that **BP16** exhibits highly efficient penetration through endocytic mechanisms, accumulating in the cell cytoplasm at short time periods. In addition, the conjugation of the DNA alkylating agent CLB to **BP16** dramatically increases the cytotoxicity of this drug between 6- and 9-fold. We have also shown that, in conjugation with the homing peptide CREKA, **BP16** is able to improve the cytotoxic activity of CLB from 2- to 4.5-fold. Taken together, these results confirm that **BP16** is an excellent non-toxic delivery vector suitable for the effective transport of drugs. Further studies on applications of this CPP are underway in our laboratory.

## Experimental section

### Materials and methods

Unless otherwise stated, common chemicals and solvents (HPLC-grade or reagent-grade quality) were purchased from commercial sources and used without further purification. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) derivatives and Fmoc-Rink-4-methylbenzhydrylamine (MBHA) resin ( $0.56 \text{ mmol g}^{-1}$ ) were obtained from Senn Chemicals International (Gentilly, France), NovaBiochem (Schwalbach, Germany) or from IRIS Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany). Aminomethyl ChemMatrix resin ( $0.66 \text{ mmol g}^{-1}$ ) was obtained from Matrix Innovation Inc (St-Hubert, Canada). Ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate (Oxyrna) was purchased from Novabiochem (Nottingham, UK). Trifluoroacetic acid (TFA), triisopropylsilane (TIS), dimethyl sulfoxide (DMSO), D,L-dithiothreitol (DTT), *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI), chlorambucil (CLB), 5(6)-carboxyfluorescein (CF), fluorescein isothiocyanate dextran mol. wt 10 000 (FITC-dextran) and dynasore hydrate were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Transferrin Alexa Fluor® 647 conjugate was from Molecular Probes (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA). Piperidine was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). *N*-Methyl-2-pyrrolidinone (NMP), *N,N*-dimethylformamide (DMF),  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , diethyl ether and solvents for high performance liquid chromatography (HPLC) were obtained from Scharlau (Sentmenat, Spain).

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), paraformaldehyde, and bisbenzimidazole trihydrochloroacetic acid (Hoechst 33258) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin and trypsin were obtained from GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA). The RFP-Lamp1 plasmid was kindly provided by Walther Mothes (Addgene plasmid 1817).<sup>66</sup>

Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analyses were performed with an Esquire 6000 ESI ion trap LC/MS (Bruker Daltonics) instrument equipped with an electrospray ion source. The instrument was operated in the positive ESI(+) ion mode (University of Girona). Samples ( $5 \mu\text{L}$ ) were introduced into the mass spectrometer ion source directly through an HPLC autosampler. The mobile phase ( $80:20 \text{ CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$

at a flow rate of  $100 \mu\text{L min}^{-1}$ ) was delivered by a 1100 Series HPLC pump (Agilent). Nitrogen was employed as both the drying and nebulizing gas.

High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded under conditions of ESI with a Bruker MicroTOF-Q IITM instrument using a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (University of Girona). Samples were introduced into the mass spectrometer ion source by direct infusion through a syringe pump and were externally calibrated using sodium formate. The instrument was operated in the positive ESI(+) ion mode.

### Cell lines

The human breast cancer cell line MCF-7, the human pancreas cancer cell line CAPAN-1 and the mouse fibroblast cell line 3T3 were obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and  $100 \text{ U ml}^{-1}$  penicillin-streptomycin at  $37^\circ\text{C}$  under a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . Cells were passaged two times per week.

### Peptide synthesis

**General method for solid-phase peptide synthesis.** Peptides from Table 1, Tat<sub>49</sub> and CF-Tat<sub>49</sub>, were synthesized manually by the solid-phase method using Fmoc-type chemistry and the following side-chain protecting groups: *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) for Lys, *t*Bu for Tyr and Glu, trityl (Tr) for Cys, and 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl (Pmc) for Arg. A Fmoc-Rink-MBHA resin ( $0.56 \text{ mmol g}^{-1}$ ) or an aminomethyl ChemMatrix resin ( $0.66 \text{ mmol g}^{-1}$ ) were used as a solid support to obtain peptide amides. Coupling of Fmoc-Rink (4 equiv.) onto the aminomethyl ChemMatrix resin was mediated by DIPCDI (4 equiv.) and Oxyrna (4 equiv.) in DMF at room temperature overnight. Couplings of the Fmoc-amino acids (4 equiv.) were performed using DIPCDI (4 equiv.) and Oxyrna (4 equiv.) in DMF under stirring at room temperature for 2 h, and monitored by the Kaiser test.<sup>68</sup> For sequences containing up to eleven residues, the Fmoc group was removed by treating the resin with a mixture of piperidine-DMF (3 : 7,  $1 \times 2 \text{ min} + 1 \times 10 \text{ min}$ ). For longer sequences, Fmoc group removal was carried out with piperidine-DMF (3 : 7,  $1 \times 3 \text{ min} + 3 \times 10 \text{ min}$ ). After each coupling and deprotection step, the resin was washed with DMF ( $6 \times 1 \text{ min}$ ) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $6 \times 1 \text{ min}$ ), and air-dried. After the coupling of the eleventh residue, NMP was used instead of DMF. Peptide elongation was performed by repeated cycles of Fmoc group removal, coupling and washings.

Once the synthesis was completed, peptidyl resins were subjected to the N-terminal Fmoc group removal. Then, peptides were cleaved or the peptidyl resins were derivatized with CLB and/or with 5(6)-carboxyfluorescein. Cleavage of peptides from the resin was performed by treatment with TFA-TIS- $\text{H}_2\text{O}$  (95 : 2.5 : 2.5) for 3 h at room temperature. Peptides containing a cysteine residue were cleaved with TFA-TIS- $\text{H}_2\text{O}$ -DTT (92.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5) for 3 h at room temperature. Both procedures were followed by TFA evaporation by bubbling  $\text{N}_2$  into the solution. Crude peptides were precipitated by adding cold

diethyl ether (−20 °C) and collected by centrifugation. This procedure was repeated twice. Finally, peptides were dissolved in H<sub>2</sub>O–CH<sub>3</sub>CN (50 : 50 v/v containing 0.1% TFA), lyophilized and tested for purity by HPLC. Analysis was carried out with a Kromasil C18 reverse-phase column (4.6 × 40 mm; 3.5 μm particle size) with a 2–100% B linear gradient over 7 min at a flow rate of 1.0 ml min<sup>−1</sup>. Solvent A was 0.1% aqueous TFA and solvent B was 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN. Detection was performed at 220 nm. ESI-MS and HRMS (ESI) were used to confirm peptide identity. Peptides from Table 1, Tat<sub>49</sub> and CF-Tat<sub>49</sub>, were obtained in purities ranging from 81 to 100%.

**Synthesis of CLB-peptide conjugates.** Derivatization with CLB was performed by treating the corresponding peptidyl resin with CLB (5 equiv.), DPCDI (5 equiv.) and Oxyma (5 equiv.) in DMF or NMP under stirring at room temperature for 5 h. The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.<sup>68</sup> The resin was then washed with NMP (6 × 1 min), CH<sub>3</sub>OH (6 × 1 min), and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min), and air dried.

**Synthesis of N-terminal 5(6)-carboxyfluorescein-labeled peptides.** For the N-terminal derivatization with 5(6)-carboxyfluorescein, this fluorophore (2.5 equiv.) was first pre-activated with Oxyma (2.5 equiv.) and DPCDI (2.5 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–NMP (1 : 9) for 10 min. The mixture was added to the corresponding N-terminal deprotected peptidyl resin and reacted overnight at room temperature protected from light by covering it with aluminum foil due to the light sensitivity of 5(6)-carboxyfluorescein. Completeness of the coupling was confirmed using the Kaiser test.<sup>68</sup> The resin was then washed with NMP (1 × 5 min), piperidine–NMP (1 : 5, 1 × 15 min), NMP (6 × 1 min), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min), CH<sub>3</sub>OH (6 × 1 min), and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min) and air dried.<sup>56</sup>

**Synthesis of 5(6)-carboxyfluorescein-labeled CLB-peptide conjugates.** These conjugates were prepared from a peptidyl resin incorporating the lysine residue to be labeled protected with N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl] (Dde) at the N<sup>ε</sup>-amino group. After CLB coupling, the Dde group was removed by treatment with hydrazine–NMP (2 : 98, 5 × 20 min) under stirring at room temperature and the deprotection progress was monitored by the Kaiser test.<sup>68</sup> Then, the resin was washed with NMP (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min) and air dried. Next, fluorophore labeling with 5(6)-carboxyfluorescein was carried out as described for the N-terminal carboxyfluorescein labeled peptides.

### Cytotoxicity assays

Cytotoxicity of peptides **BP16**, **BP76**, **BP81**, **BP100**, **BP105**, **BP307**, **BP308**, **CREKA** and **BP327**, CLB-peptide conjugates **CLB-CREKA**, **BP325** and **BP329**, and CLB in 3T3, MCF-7 and CAPAN-1 cells was determined by the MTT assay. Peptides and CLB-peptide conjugates were diluted in Milli-Q water to obtain 2 mM stock solutions. CLB was dissolved in DMSO to provide a 75 mM stock solution.<sup>69</sup> Appropriate aliquots of these solutions were diluted in the cell culture medium to obtain the final working concentrations. Aliquots of 4000 3T3 cells, 6000 MCF-7 cells or 10 000 CAPAN-1 cells were seeded on 96-well

plates 24 h prior to the treatments. Then, cells were treated for 48 h with the corresponding compound at concentrations ranging from 0 to 200 μM. After removal of the treatment, cells were washed with PBS and incubated for an additional 2 h in the dark with fresh culture medium (100 μL) with MTT (10 μL). The medium was discarded and DMSO (100 μL) was added to each well to dissolve the purple formazan crystals. Plates were agitated at room temperature for 10 min and the absorbance of each well was determined with an absorbance microplate reader (ELx800, BioTek, Winooski, USA) at a wavelength of 570 nm. Three replicates for each compound were used, and all treatments were tested at least in three independent experiments. For each treatment, the cell viability was determined as a percentage of the control untreated cells by dividing the mean absorbance of each treatment by the mean absorbance of the untreated cells. The concentration that reduces by 50% the cell viability (IC<sub>50</sub>) was established for each compound.

### Hemolysis

The data corresponding to the hemolytic activity of peptides were previously reported by Badosa *et al.*<sup>53</sup> It was evaluated at 150 μM by determining the hemoglobin release from erythrocyte suspensions of fresh human blood (5% v/v) using absorbance at 540 nm.

### Stability of BP16 and Tat<sub>49</sub> in serum

The stability of **BP16** and Tat<sub>49</sub> was evaluated in fetal bovine serum. Each peptide (1 mg) was exposed to 10% aqueous filtered fetal bovine serum (2 ml) at 37 °C. After 5, 10, 15, 30 and 45 min exposure, aliquots (200 μL) were removed and proteins were precipitated with CH<sub>3</sub>CN (200 μL). Samples were cooled to 0 °C for 15 min and centrifuged (11 000 rpm, 5 min). The supernatant was analyzed by HPLC. The digestion was estimated as the percentage of degraded peptide calculated from the decrease of the HPLC peak area of the native peptide.

### Flow cytometry

The uptake efficiency of **CF-BP16**, **CF-CREKA**, and **BP328** by 3T3 and MCF-7 cells and of **CF-Tat<sub>49</sub>**, **BP326**, and **BP330** by MCF-7 cells was quantified by flow cytometry. Aliquots of 50 000 cells were seeded in 24 well plates and allowed to attach for 24 h. Next, the cells were incubated with **CF-BP16** at 5, 25 and 50 μM for 1, 3 and 6 h, with **CF-CREKA**, **BP328**, **BP326** and **BP330** at 25 μM for 3 h or with **CF-BP16** and **CF-Tat<sub>49</sub>** at 25 μM for 1, 3 and 6 h at 37 °C. The cells were harvested by trypsinization and gently washed with 2% FBS in cold PBS. The fluorescence of the cells, corresponding to the cellular uptake of the carboxyfluorescein labeled peptides, was analyzed using a FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) equipped with the CellQuest™ software (Becton Dickinson). The mean fluorescence intensity was represented on a four orders of magnitude log scale (1–10 000). The effect of Cherry-DPF expression on **CF-BP16**, **CF-Tat<sub>49</sub>**, transferrin-A647 and FITC-Dextran uptake in MCF-7 cells was also analysed by flow cytometry. MCF-7 cells seeded in 6 well plates

were transfected with Cherry-DPF plasmid using Effectene (Qiagen, Hiden, Germany) according to the manufacturer's specifications. To generate the Cherry-DPF plasmid, the DPF fragment (aa: 501–874) from human Eps15 was obtained by polymerase chain reaction and cloned into pEGFP-C1 vector (Clontech) using XhoI and PstI restriction sites and after that GFP was replaced with the mCherry fluorescent protein. After 24 h of protein expression, cells were incubated with transferin-A647 (60  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) combined with CF-BP16 (25  $\mu\text{M}$ ), CF-Tat<sub>49</sub> (25  $\mu\text{M}$ ) or FITC-Dextran (2 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) for 60 min at 37 °C and washed two times with cold PBS. The remaining fluorescence at the cell surface was removed by a 3 min cold acid wash (0.2 M sodium acetate, 0.5 M sodium chloride, pH 4.5) and the intracellular fluorescence was quantified using a LSRFortessa (Becton Dickinson) equipped with the CellQuest™ software (Becton Dickinson). Ten thousand cells were analyzed in each experiment.

### Confocal microscopy

MCF-7 cells grown on coverslips and incubated with different fluorescent-labeled molecules were washed with cold PBS and fixed with freshly prepared 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at 4 °C. After washing twice with PBS, the coverslips were mounted in Mowiol (Calbiochem, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) or using a fluorescence mounting medium (Dako, Carpinteria, CA, USA). The images were acquired using a Leica TCS SP5 laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) equipped with a DMI6000 inverted microscope, blue diode (405 nm), argon (458/476/488/514), diode pumped solid state (561 nm) and HeNe (633) lasers. Final imaging was performed using ImageJ software.

### Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the SPSS statistical software for Windows (version 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Quantitative variables were expressed as mean and standard deviation (SD). The normality of the data was tested using the Shapiro–Wilk test. The differences between data with normal distribution and homogeneous variances were analyzed using the parametric Student's *t* test. A value of *p* < 0.05 was considered significant.

## Acknowledgements

This work was supported by Consolider Ingenio CSD/CSD2010-00065 from MICINN of Spain and by grant BFU2012-38259 from Ministerio de Economía y Competitividad of Spain to F.T. We also thank the Catalan DIUE of the Generalitat de Catalunya (2009SGR637). X.R. thanks financial support from INNPLANTA project INP-2011-0059-PCT-420000-ACT1. M.C. and X.R. thank ICREA Academia Awards. D.S.-C. is a recipient of FI fellowship (Generalitat de Catalunya). We also acknowledge the Serveis Tècnics de Recerca of the University of Girona for technical support.

## Notes and references

- 1 D. Hanahan and R. A. Weinberg, *Cell*, 2011, **144**, 646–674.
- 2 C. H. Takimoto and E. Calvo, in *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*, ed. R. Pazdur, L. D. Wagman, K. A. Camphausen, W. J. Hoskins, UBM Medica, London, 2008, pp. 42–58.
- 3 E. Raschi, V. Vasina, M. G. Ursino, G. Boriani, A. Martoni and F. De Ponti, *Pharmacol. Ther.*, 2010, **125**, 196–218.
- 4 E. L. Snyder and S. F. Dowdy, *Pharm. Res.*, 2004, **21**, 389–393.
- 5 E. Vivès, J. Schmidt and A. Pèlegri, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1786**, 126–138.
- 6 K. M. Stewart, K. L. Horton and S. O. Kelly, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 2242–2255.
- 7 S. B. Fonseca, M. P. Pereira and S. O. Kelley, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2009, **61**, 953–964.
- 8 E. Koren and V. P. Torchilin, *Trends Mol. Med.*, 2012, **18**, 385–393.
- 9 F. Milleti, *Drug Discovery Today*, 2012, **17**, 850–860.
- 10 J. S. Wadia and S. F. Dowdy, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2005, **57**, 579–596.
- 11 V. Kersemans, K. Kersemans and B. Cornelissen, *Curr. Pharm. Des.*, 2008, **14**, 2415–2427.
- 12 R. Fischer, M. Fotin-Mleczek, H. Hufnagel and R. Brock, *ChemBioChem*, 2005, **6**, 2126–2142.
- 13 S. Pujals, J. Fernández-Carneado, C. López-Iglesias, M. J. Kogan and E. Giralt, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 264–279.
- 14 P. Lundberg and U. Langel, *J. Mol. Recognit.*, 2003, **16**, 227–233.
- 15 M. Gooding, L. P. Browne, F. M. Quinteiro and D. L. Selwood, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2012, **80**, 787–809.
- 16 S. A. Nasrollahi, C. Taghibiglou, E. Azizi and E. S. Farboud, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2012, **80**, 639–646.
- 17 T. Lehto, K. Kurrikoff and U. Langel, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2012, **9**, 823–836.
- 18 I. Nakase, H. Akita, K. Kogure, A. Gräslund, U. Langel, H. Harashima and S. Futaki, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 1132–1139.
- 19 F. Schweizer, *Eur. J. Pharmacol.*, 2009, **625**, 190–194.
- 20 Y. Li, Q. Xiang, Q. Zhang, Y. Huang and Z. Su, *Peptides*, 2012, **37**, 207–215.
- 21 K. Takeshima, A. Chikushi, K.-K. Lee, S. Yonehara and K. Matsuzako, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 1310–1315.
- 22 S. T. Henriques, M. N. Melo and M. A. R. B. Castanho, *Biochem. J.*, 2006, **399**, 1–7.
- 23 J. Fernández-Carneado, M. J. Kogan, S. Pujals and E. Giralt, *Biopolymers*, 2004, **76**, 196–203.
- 24 C. Leuschner and W. Hansel, *Curr. Pharm. Des.*, 2004, **10**, 2299–2310.
- 25 C. D. Fjell, J. A. Hiss, R. E. W. Hancock and G. Schneider, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2012, **11**, 37–51.
- 26 D. W. Hoskin and A. Ramanoorthy, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1778**, 357–375.
- 27 E. Randal, *Future Microbiol.*, 2011, **6**, 635–666.



- 28 J. S. Mader and D. W. Hoskin, *Expert Opin. Invest. Drugs*, 2006, **15**, 933–946.
- 29 P. Bulet, R. Stöcklin and L. Menin, *Immunol. Rev.*, 2004, **198**, 169–184.
- 30 H. Jenssen, P. Hamill and R. E. W. Hancock, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006, **19**, 491–511.
- 31 M. Zasloff, *Nature*, 2002, **415**, 389–395.
- 32 B. Bechinger and K. Lohner, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 1529–1539.
- 33 R. E. W. Hancock and H. G. Sahl, *Nat. Biotechnol.*, 2006, **24**, 1551–1557.
- 34 J. F. Marcos and M. Gandía, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2009, **4**, 659–671.
- 35 H. W. Huang, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 1292–1302.
- 36 B. Fang, H. Y. Guo, M. Zhang, L. Jiang and F. Z. Ren, *FEBS J.*, 2013, **280**, 1007–1017.
- 37 G. Drin, S. Cottin, E. Blanc, A. R. Rees and J. Tamsamani, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 31192–31201.
- 38 K. K. Hou, H. Pan, G. M. Lanza and S. A. Wickline, *Biomaterials*, 2013, **34**, 3110–3119.
- 39 S. Sandgren, A. Wittrup, F. Cheng, M. Jönsson, E. Eklund, S. Busch and M. Belting, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 17951–17956.
- 40 H. Myrberg, L. Zhang, M. Mäe and U. Langel, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 70–75.
- 41 M. Mäe, H. Myrberg, S. El-Andaloussi and U. Langel, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2009, **15**, 11–15.
- 42 S. B. Fonseca and S. O. Kelley, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2011, **2**, 419–423.
- 43 J. Hoyer, U. Schatzschneider, M. Schulz-Siegmund and I. Neundorff, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2012, **8**, 1788–1797.
- 44 S. R. Rajski and R. M. Williams, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 2723–2795.
- 45 I. Martín, M. Teixidó and E. Giralt, *Pharmaceuticals*, 2010, **3**, 1456–1490.
- 46 S. Majumdar and T. J. Siahaan, *Med. Res. Rev.*, 2012, **32**, 637–658.
- 47 N. Svendsen, J. G. A. Walton and M. Bradley, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2012, **33**, 186–192.
- 48 P. Laakkonen and K. Vuorinen, *Integr. Biol.*, 2010, **2**, 326–337.
- 49 O. H. Aina, R. Liu, J. L. Sutcliffe, J. Marik, C.-X. Pan and K. S. Lam, *Mol. Pharmaceutics*, 2007, **4**, 631–651.
- 50 D. Simberg, T. Duza, J. H. Park, M. Essler, J. Pilch, L. Zhang, A. M. Derfus, M. Yang, R. M. Hoffman, S. Bhatia, M. J. Sailor and E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 932–936.
- 51 E. H. M. Lempens, M. Merckx, M. Tirrel and E. W. Meijer, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 397–405.
- 52 W. Qu, W. H. Chen, Y. Kuang, X. Zeng, S. X. Cheng, X. Zhou, R. X. Zhuo and X. Z. Zhang, *Mol. Pharmaceutics*, 2013, **10**, 261–269.
- 53 E. Badosa, R. Ferre, M. Planas, L. Feliu, E. Besalú, J. Cabrefiga, E. Bardaji and E. Montesinos, *Peptides*, 2007, **28**, 2276–2285.
- 54 K. Eggenberger, C. Mink, P. Wadhvani, A. S. Ulrich and P. Nick, *ChemBioChem*, 2011, **12**, 132–137.
- 55 K. Melikov and L. V. Chernomordik, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, **62**, 2739–2749.
- 56 R. Fischer, O. Mader, G. Jung and R. Brock, *Bioconjugate Chem.*, 2003, **14**, 653–660.
- 57 I. Güell, J. Cabrefiga, E. Badosa, R. Ferre, M. Talleda, E. Bardaji, M. Planas, L. Feliu and E. Montesinos, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, **77**, 2667–2675.
- 58 S. Monroc, E. Badosa, E. Besalú, M. Planas, E. Bardaji, E. Montesinos and L. Feliu, *Peptides*, 2006, **27**, 2575–2584.
- 59 E. Badosa, R. Ferre, J. Francés, E. Bardaji, L. Feliu, M. Planas and E. Montesinos, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, **75**, 5563–5569.
- 60 S. Aroui, S. Brahim, M. De Waard and A. Kenani, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, **391**, 419–425.
- 61 H. Yang, S. Liu, H. Cai, L. Wan, S. Li, Y. Li, J. Cheng and X. Lu, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 25666–25676.
- 62 J. Song, M. Kai, W. Zhang, J. Zhang, L. Liu, B. Zhang, X. Liu and R. Wang, *Peptides*, 2011, **32**, 1934–1941.
- 63 S. Jones and J. Howl, *Bioconjugate Chem.*, 2012, **23**, 47–56.
- 64 J. Farrera-Sinfreu, E. Giralt, S. Castel, A. Albericio and M. Royo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 9459–9468.
- 65 E. Macia, M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner and T. Kirchhausen, *Dev. Cell.*, 2006, **10**, 839–850.
- 66 N. M. Sherer, M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Soto, A. Ingmundson, S. M. Horner, G. Cicchetti, P. G. Allen, M. Pypaert, J. M. Cunningham and W. Mothes, *Traffic*, 2003, **4**, 785–801.
- 67 A. Benmerah, C. Lamaze, B. Bègue, S. L. Schmid, A. Dautry-Varsat and N. Cerf-Bensussan, *J. Cell Biol.*, 1998, **140**, 1055–1062.
- 68 E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger and P. Cook, *Anal. Biochem.*, 1970, **34**, 595–598.
- 69 A. Guaragna, A. Chiaviello, C. Paoletta, D. D'Alonzo, G. Palumbo and G. Palumbo, *Bioconjugate Chem.*, 2012, **23**, 84–96.





Reproduced with permission from:

Enzyme-triggered delivery of chlorambucil from conjugates based on the cell-penetrating peptide BP16. Soler M, González-Bártulos M, Figueras E, Ribas X, Costas M, Massaguer A, Planas M, Feliu L. *Org Biomol Chem.* 2015 Feb 7;13(5):1470-80. DOI: 10.1039/C4OB01875C

Copyright © 2015 Royal Society of Chemistry







Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 1470

## Enzyme-triggered delivery of chlorambucil from conjugates based on the cell-penetrating peptide BP16†

Marta Soler,<sup>a,b</sup> Marta González-Bártulos,<sup>a,c</sup> Eduard Figueras,<sup>b</sup> Xavi Ribas,<sup>a</sup> Miquel Costas,<sup>a</sup> Anna Massaguer,<sup>c</sup> Marta Planas<sup>\*b</sup> and Lidia Feliu<sup>\*b</sup>

The undecapeptide KKLFFKKLKL-NH<sub>2</sub> (**BP16**) is a non-toxic cell-penetrating peptide (CPP) that is mainly internalized into cancer cells through a clathrin dependent endocytic mechanism and localizes in late endosomes. Moreover, this CPP is able to enhance the cellular uptake of chlorambucil (CLB) improving its cytotoxicity. In this work, we further explored the cell-penetrating properties of **BP16** and those of its arginine analogue **BP308**. We investigated the influence on the cytotoxicity and on the cellular uptake of conjugating CLB at the N- or the C-terminal end of these undecapeptides. The effect of incorporating the cathepsin B-cleavable sequence Gly-Phe-Leu-Gly in CLB-BP16 and CLB-BP308 conjugates was also evaluated. The activity of CLB was significantly improved when conjugated at the N- or the C-terminus of **BP16**, or at the N-terminus of **BP308**. While CLB alone was not active (IC<sub>50</sub> of 73.7 to >100 μM), the resulting conjugates displayed cytotoxic activity against CAPAN-1, MCF-7, PC-3, 1BR3G and SKMEL-28 cell lines with IC<sub>50</sub> values ranging from 8.7 to 25.5 μM. These results were consistent with the internalization properties observed for the corresponding 5(6)-carboxyfluorescein-labeled conjugates. The presence of the tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly at either the N- or the C-terminus of CLB-BP16 conjugates further increased the efficacy of CLB (IC<sub>50</sub> of 3.6 to 16.2 μM), which could be attributed to its selective release in the lysosomal compartment. Enzymatic assays with cathepsin B showed the release of CLB-Gly-OH from these sequences within a short time. Therefore, the combination of **BP16** with an enzymatic cleavable sequence can be used as a drug delivery system for the effective uptake and release of drugs in cancer cells.

Received 2nd September 2014,  
Accepted 26th November 2014

DOI: 10.1039/c4ob01875c

www.rsc.org/obc

## Introduction

In recent years, drug delivery systems have been extensively studied in an effort to improve cancer treatments.<sup>1,2</sup> The use of well-known anticancer drugs is usually hindered by their poor bioavailability and their low capacity to cross cell membranes.<sup>3</sup> One strategy to overcome these limitations is their conjugation to a convenient carrier able to promote an efficient cell uptake of the drug. Cell-penetrating peptides (CPPs) have been estab-

lished as peptide-based delivery systems to transport a wide range of cell-membrane impermeable cargoes into the cells.<sup>4-11</sup> CPPs have been shown to increase the bioavailability of anti-cancer drugs, improving their cytotoxic activity while dramatically reducing their dosage and side-effects.<sup>12-16</sup>

The exact internalization pathway of CPPs is still under debate. However, it is widely assumed that their high positive charge facilitates their interaction with the negatively charged plasma membrane and that they are mainly internalized by endocytosis.<sup>17,18</sup> Since following this endocytic pathway CPPs generally end up in the lysosomal compartment of cells, enzyme-triggered strategies are recently being used in smart drug delivery systems to improve intracellular drug release.<sup>19,20</sup> Lysosomal proteases are expected to selectively cleave and release active drug moieties within the cell.<sup>21</sup> This proteolytic activity depends on the pH gradients occurring at the subcellular level and allows an intracellular-specific delivery.<sup>22-27</sup> The tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly is a well-known cleavable sequence, which is selectively hydrolyzed by cathepsin B cysteine protease, overexpressed in lysosomes.<sup>21,28-30</sup> Indeed,

<sup>a</sup>QBIS-CAT Research Group, Institut de Química Computacional i Catàlisi (IQCC) and Departament de Química, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Catalonia, Spain

<sup>b</sup>LIPPSO, Departament de Química, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Catalonia, Spain. E-mail: lidia.feliu@udg.edu, marta.planas@udg.edu; Fax: +34 972418150; Tel: +34 972418274

<sup>c</sup>Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Catalonia, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available: Materials and methods, cell lines, and additional HPLC and HRMS data of peptides. See DOI: 10.1039/c4ob01875c

this sequence has been employed in several drug-peptide conjugation strategies, leading to a selective intracellular drug release and enhancement of its cytotoxic activity.<sup>31–34</sup>

Recently, we identified the undecapeptide KKLFFKKILKLL-NH<sub>2</sub> (**BP16**) as a non-cytotoxic CPP with high cellular uptake *in vitro*.<sup>35</sup> We demonstrated that **BP16** is mainly internalized in MCF-7 cells through clathrin dependent endocytosis and that it efficiently accumulates in the cell endosomes. **BP16** displayed highly efficient drug delivery properties since it was able to enhance the uptake of the DNA alkylating drug chlorambucil (CLB), improving its cytotoxicity against cancer cells from 6 to 9-fold. In conjugation with the homing peptide CREKA, **BP16** was also able to internalize CLB increasing its cytotoxic effect from 2- to 4.5-fold.

These findings prompted us to further explore the CPP properties of **BP16**. With this aim, we investigated the influence of conjugating CLB at the N- or at the C-terminus of **BP16** on the cellular uptake and on the cytotoxic activity against cancer cells. Moreover, taking into account the clathrin dependent endocytic mechanism of **BP16**, we envisaged that the introduction of the cleavable sequence Gly-Phe-Leu-Gly in CLB-BP16 conjugates could result in an efficient release of the drug. Thus, we evaluated the effect on the cytotoxicity of incorporating this tetrapeptide at the N- or at the C-terminal end of **BP16**. A similar study was planned with the BP16-arginine analogue **BP308** (RRLFRRLRRL-NH<sub>2</sub>).<sup>35</sup> This undecapeptide was previously identified and it also displayed no cytotoxicity against both malignant and non-malignant cells and, therefore, **BP308** showed a suitable activity profile to be considered as a CPP candidate.<sup>36</sup> Moreover, it has been recently reported that the replacement of Lys by Arg in the *KLA* antimicrobial peptide led to an enhancement of the peptide accumulation in mitochondria.<sup>37</sup> Thus, **BP308** could favor the selective delivery of CLB into the mitochondria. The internalization of **BP16** and **BP308** was examined by flow cytometry and confocal microscopy studies were performed in order to determine their final localization at the subcellular level. The cytotoxicity of the **BP16** and **BP308** CLB conjugates was evaluated against cancer and healthy cell lines and the correlation with their cellular uptake was analyzed. In addition, the CLB release from **BP16** conjugates incorporating the tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly was evaluated by cathepsin B enzymatic digestion.

## Results and discussion

### Peptide design and synthesis

During previous studies, **BP16** and **BP308** were identified from a library of antimicrobial undecapeptides as potential CPP candidates.<sup>35</sup> Both peptides were neither cytotoxic nor hemolytic. **BP16** was highly internalized in cancer cells and was able to transport CLB into these cells enhancing its efficacy.

Based on this, we decided to gain further insight into the cell-penetrating properties of **BP16** and **BP308**. In particular, in this study we investigated (i) the influence of the position of CLB in the peptide sequence on the cytotoxicity and on the

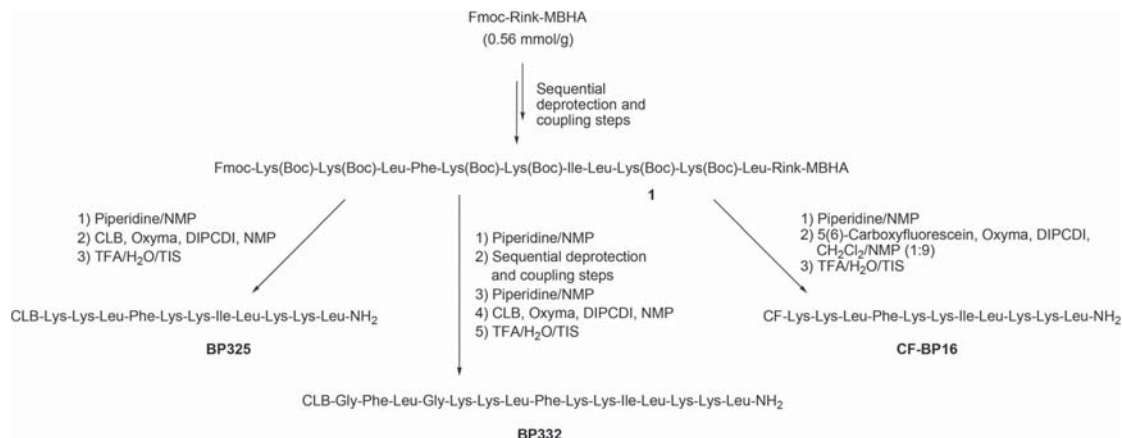
**Table 1** Peptide sequences and notation

Peptide	Sequence <sup>a</sup>	Notation
<b>BP16</b>	KKLFFKKILKLL	
<b>BP308</b>	RRLFRRLRRL	
<b>BP325</b>	CLB-KKLFFKKILKLL	CLB-BP16
<b>BP331</b>	Ac-KKLFFKKILKLLK(CLB)	BP16-CLB
<b>BP332</b>	CLB-GFLG-KKLFFKKILKLL	CLB-GFLG-BP16
<b>BP333</b>	Ac-KKLFFKKILKLLK(GLFG-CLB)	BP16-GLFG-CLB
<b>BP334</b>	CLB-RRLFRRLRRL	CLB-BP308
<b>BP335</b>	Ac-RRLFRRLRRLK(CLB)	BP308-CLB
<b>BP336</b>	CLB-GFLG-RRLFRRLRRL	CLB-GFLG-BP308
<b>BP337</b>	Ac-RRLFRRLRRLK(GLFG-CLB)	BP308-GLFG-CLB
<b>CF-BP16</b>	CF-KKLFFKKILKLL	CF-BP16
<b>CF-BP308</b>	CF-RRLFRRLRRL	CF-BP308
<b>BP326</b>	CLB-KKLFFKKILK(CF)KL	CLB-BP16-CF
<b>BP338</b>	CF-KKLFFKKILKLLK(CLB)	CF-BP16-CLB
<b>BP339</b>	CLB-RRLFRRLRRLK(CF)	CLB-BP308-CF
<b>BP340</b>	CF-RRLFRRLRRLK(CLB)	CF-BP308-CLB

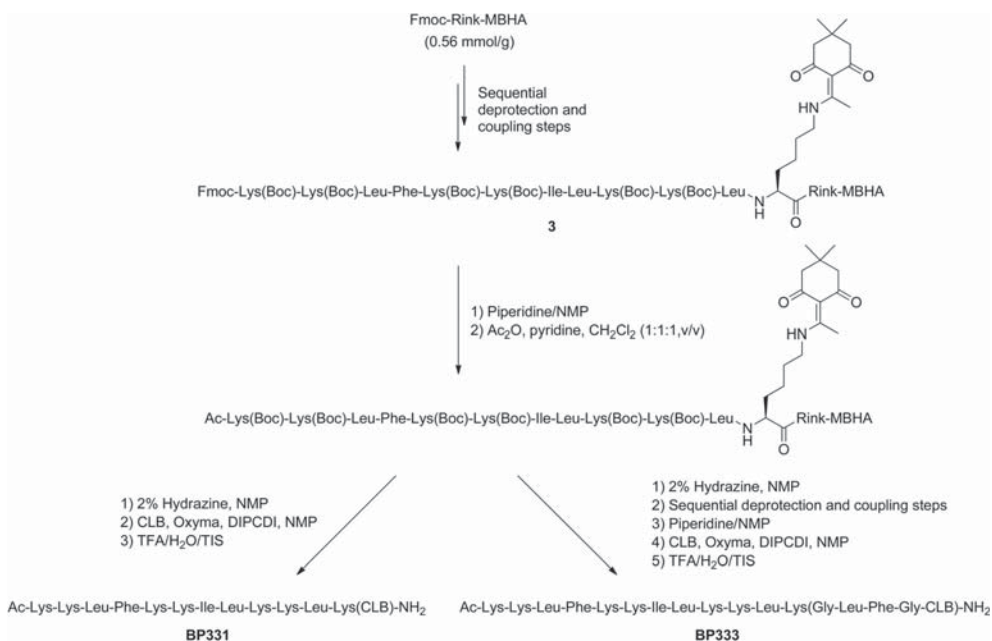
<sup>a</sup> All peptides are C-terminal amides.

cellular uptake, and (ii) whether the incorporation of the cathepsin B-cleavable sequence Gly-Phe-Leu-Gly in CLB-peptide conjugates could lead to the intracellular release of the drug. Towards these aims, we designed two sets of peptide conjugates. For a list of the full set of peptides prepared in this work see Table 1. The first set incorporated CLB at the N- or at the C-terminus of **BP16** and **BP308**. The conjugates derived from **BP16** were CLB-BP16 (**BP325**) and BP16-CLB (**BP331**), and those derived from **BP308** were CLB-BP308 (**BP334**) and BP308-CLB (**BP335**). To analyze the cellular internalization of these peptides, they were labeled with 5(6)-carboxyfluorescein leading to **CF-BP16**, CLB-BP16-CF (**BP326**), CF-BP16-CLB (**BP338**), **CF-BP308**, CLB-BP308-CF (**BP339**), and CF-BP308-CLB (**BP340**). The second set of peptides was designed by incorporating CLB-Gly-Phe-Leu-Gly at the N- or at the C-terminus of **BP16** and **BP308**. Thus, this set included CLB-GFLG-BP16 (**BP332**), BP16-GLFG-CLB (**BP333**), CLB-GFLG-BP308 (**BP336**) and BP308-GLFG-CLB (**BP337**). For the conjugates that contain CLB or GLFG-CLB at the C-terminus, these moieties were incorporated at the side chain of an additional Lys residue. This amino acid was included to allow the introduction of these moieties without affecting the cationic charges of the corresponding parent sequence.

Peptide conjugates were manually prepared on solid-phase following a standard Fmoc/*t*Bu strategy and were obtained as C-terminal amides. The synthesis of the N-terminal CLB-peptide conjugates **BP325** (CLB-BP16) and **BP334** (CLB-BP308) involved the preparation of the peptidyl resins Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA (**1**) and Fmoc-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Leu-Phe-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ile-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Leu-Rink-MBHA (**2**), respectively (depicted in Scheme 1 for the **BP16** derivative). They were obtained from an Fmoc-Rink-MBHA resin through sequential Fmoc removal and amino acid coupling steps. The Fmoc group was removed by treatment with a piperidine-DMF (3:7) solution. Couplings of the conveniently protected Fmoc amino acids were mediated by



Scheme 1 Synthesis of the conjugates **BP325** and **BP332** and of the fluorescently labeled peptide **CF-BP16**.



Scheme 2 Synthesis of peptide conjugates **BP331** and **BP333**.

*N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) and ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate (Oxyma) in *N,N*-dimethylformamide (DMF). Once the synthesis was complete, peptidyl resins **1** and **2** were treated with piperidine–NMP (3 : 7) and CLB was coupled using DIPCDI and Oxyma in NMP. Acidolytic cleavage with trifluoroacetic acid (TFA)–triisopropylsilane (TIS)–H<sub>2</sub>O (95 : 2.5 : 2.5) afforded peptide conjugates **BP325** and **BP334** in 91 and >99% purity, respectively. Peptide conjugates **BP332** (CLB–GFLG–BP16) and **BP336** (CLB–GFLG–BP308), incorporating CLB–GFLG at the N-terminus of **BP16** or **BP308**, were

prepared from peptidyl resins **1** and **2**, respectively. After removal of the N-terminal Fmoc group, the corresponding Fmoc-protected amino acids of the GFLG moiety and CLB were sequentially incorporated. Acidolytic treatment of the resulting resins yielded **BP332** and **BP336** in 92 and >99% purity, respectively. All these peptides were characterized by HRMS.

The synthesis of peptide conjugates **BP331** (BP16–CLB), **BP333** (BP16–GLFG–CLB), **BP335** (BP308–CLB) and **BP337** (BP308–GLFG–CLB), bearing CLB or GLFG–CLB at the C-terminus of **BP16** or **BP308**, is depicted in Scheme 2 for the **BP16**

derivatives. These moieties were incorporated at the side chain of a Lys residue present at the C-terminal end of the peptide. To allow its selective derivatization, this Lys residue was incorporated as Fmoc-Lys(Dde)-OH (Dde = *N*-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl]). Thus, peptidyl resins Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Dde)-Rink-MBHA (**3**) and Fmoc-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Leu-Phe-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ile-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Leu-Lys(Dde)-Rink-MBHA (**4**) were prepared. After deprotection and acetylation of the N-terminus, the Dde group was selectively removed by treatment with hydrazine. In the case of **BP331** and **BP335**, the resulting free amino group was acylated with CLB. For **BP333** and **BP337**, the corresponding amino acids of the GLFG moiety and CLB were sequentially incorporated at this free amino group. Peptide conjugates were cleaved from the resin by acidolytic treatment and were obtained in excellent purities (91–99%), as determined by analytical HPLC. Their identities were further confirmed by HRMS.

The fluorescently labeled peptides **CF-BP16** and **CF-BP308** were obtained from peptidyl resins **1** and **2**, respectively, by Fmoc removal and coupling of 5(6)-carboxyfluorescein (CF) using DIPCDI and Oxyma (depicted in Scheme 1 for the **CF-BP16** derivative). Piperidine washes were performed before cleavage of the peptide from the resin which served to remove the overincorporated carboxyfluorescein moieties.<sup>39</sup> The CF-labeled peptides **BP338** (CF-BP16-CLB) and **BP340** (CF-B308-CLB), bearing the carboxyfluorescein at the N-terminus and the CLB at the C-terminus, were prepared from peptidyl resins **3** and **4**, respectively, as depicted in Scheme 3 for **BP338**. The synthesis consisted of deprotection of the N-terminus, carboxyfluorescein coupling, Dde group removal and acylation with CLB. The preparation of the CF-labeled peptides **BP326** (CLB-BP16-CF) and **BP339** (CLB-BP308-CF), incorporating a CLB moiety at the N-terminus and a carboxyfluorescein group at the C-terminus involved the synthesis of peptidyl resins Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys-

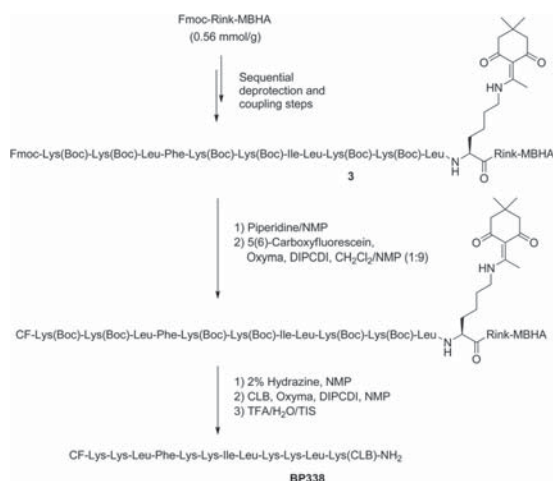
(Dde)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA and **4**, respectively. Fmoc removal and *N*<sup>ε</sup>-amino group acylation with CLB were followed by Dde group removal and derivatization with 5(6)-carboxyfluorescein. Acidolytic cleavage afforded the CF-labeled peptides in excellent purities (81–99%), and they were characterized by HRMS.

### Cellular uptake of CF-BP16 and CF-BP308

In order to evaluate the influence of replacing Lys residues with Arg on the cellular uptake of **CF-BP16**, we first examined the capacity of internalization of **CF-BP308** into MCF-7 cells by flow cytometry and compared it with that of **CF-BP16**. MCF-7 cells were incubated with **CF-BP308** or with **CF-BP16** at 25 μM for different times (1, 3 and 6 h) at 37 °C. Cells were harvested by trypsinization, which also prevented non-specific plasma membrane binding of the peptide. As depicted in Fig. 1, the mean intracellular fluorescence of the cells incubated with either **CF-BP308** or **CF-BP16** increased over time. No significant differences were observed in the mean fluorescence intensity values for both peptides (1065 ± 44 and 981 ± 159 after 6 h, respectively).

Confocal studies were carried out to examine whether the internalization in MCF-7 cells of the arginine analogue **CF-BP308** correlated with that of **CF-BP16**. In a previous study we observed that **CF-BP16** accumulates in vesicles throughout the cytoplasm of these cells, with significant clustering at the periphery of the nucleus.<sup>35</sup> An optical sectioning indicated that no fluorescence particles were placed inside the nucleus. Moreover, it has been described that the replacement of *D*-Lys by *D*-Arg in the *KLA* antimicrobial peptide led to an enhancement of the mitochondrial accumulation in HeLa cells.<sup>37</sup> Thus, further confocal microscopy studies were performed in order to find out whether these peptides colocalize with mitochondrial markers.

To achieve these aims, MCF-7 cells were incubated with the corresponding CF-labeled peptide at 50 μM for 30 min at 4 °C and for 3 h at 37 °C. The cell nuclei and mitochondria were stained with Hoechst and Mitotracker Red, respectively



Scheme 3 Synthesis of the fluorescently labeled conjugate **BP338**.

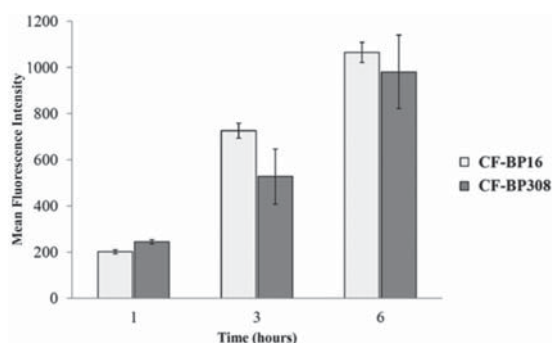
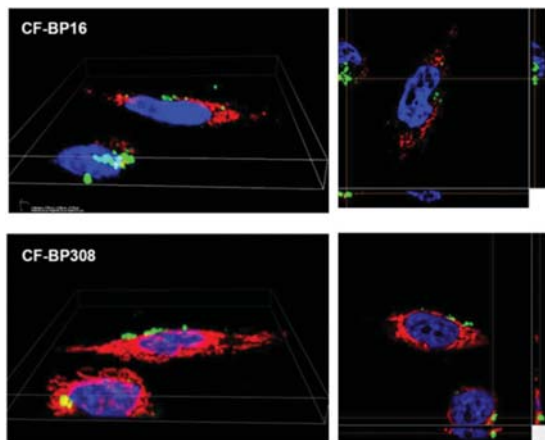


Fig. 1 Comparison of the cellular uptake between **CF-BP16** and **CF-BP308** in MCF-7 cells. Cells were exposed to the peptide at 25 μM for 1, 3 and 6 h at 37 °C. Each column in the graph represents the mean fluorescence intensity of the cells determined in three independent experiments ± SD.



**Fig. 2** Confocal microscopy imaging of the internalization of **CF-BP16** and **CF-BP308** into MCF-7 cells. Cells were incubated with **CF-BP16** and **CF-BP308** at 50  $\mu\text{M}$  for 30 min at 4  $^{\circ}\text{C}$  and for 3 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Cell nuclei were stained with Hoechst (blue) and the mitochondria were stained with Mitotracker Red (red). The localization of peptides is indicated by the green fluorescence. The images show the 3D reconstruction of the confocal Z stack images.

(Fig. 2). As expected, **CF-BP308** showed the same cellular uptake behavior as **CF-BP16** and no fluorescence was observed after 30 min of incubation at 4  $^{\circ}\text{C}$ , demonstrating that both CF-labeled peptides internalize through energy-dependent mechanisms.<sup>35</sup> The number of fluorescent particles gradually increased over time and a dot-like distribution pattern was observed for both peptides after 3 h of incubation. Similar to **CF-BP16**, higher-magnification (1000 $\times$ ) images of MCF-7 cells incubated with **CF-BP308** revealed that the fluorescent particles were located throughout the cytoplasm and that no colocalization was observed in the nucleus (Fig. 2). Moreover, as shown by optical sectioning, neither **CF-BP16** nor **CF-BP308** accumulated inside the mitochondria, indicating that these peptides do not show mitochondria targeting properties.

Although **CF-BP16** and **CF-BP308** did not colocalize with the nucleus or mitochondria, these results indicate that both peptides display potential internalization properties for use in

drug delivery systems. In particular, since previous mechanistic studies on the cellular uptake of **BP16** suggested its localization in late endosomes,<sup>35</sup> these peptides could be useful in site-specific release strategies occurring at the lysosomal compartment.<sup>21</sup>

### Cell cytotoxicity of the CLB-peptide conjugates

The cytotoxic activity profile of the CLB-peptide conjugates was explored to determine the influence of incorporating CLB at the N- or at the C-terminus of the peptide as well as of the presence of the Gly-Phe-Leu-Gly enzymatic cleavable sequence. Thus, MCF-7, CAPAN-1, PC-3, SKMEL-28 and 1BR3G cells were exposed to the CLB-peptide conjugates, and the  $\text{IC}_{50}$  was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay after 48 h of peptide exposure. CLB was included in the study for comparison purposes.

As shown in Table 2, except for **BP335**, **BP336** and **BP337**, peptide conjugates were active against the cancer and healthy cell lines tested. In contrast, CLB was not cytotoxic against the five cell lines ( $\text{IC}_{50}$  of 73.7 to >100  $\mu\text{M}$ ). Notably, conjugation of CLB at the N- or at the C-terminus of **BP16** resulted in peptides **BP325** (CLB-BP16) and **BP331** (BP16-CLB), respectively, with important activity ( $\text{IC}_{50}$  of 8.7 to 25.5  $\mu\text{M}$ ). No significant differences were observed between the cytotoxicity of these two peptide conjugates against CAPAN-1 and PC-3 cells. **BP325** was more active than **BP331** against MCF-7 and 1BR3G cells, but less active against SKMEL-28 cells. A further improvement of the activity of CLB was achieved when the tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly was incorporated between CLB and the N- or the C-terminus of **BP16**. Thus, **BP332** (CLB-GFLG-BP16) exhibited higher cytotoxicity than **BP325** (CLB-BP16), being 2- to 4-fold more active against CAPAN-1, PC-3 and SKMEL-28 cells ( $\text{IC}_{50}$  of 7.2, 3.6 and 3.9  $\mu\text{M}$ , respectively). **BP333** (BP16-GLFG-CLB) was around 1.5-fold more active against all cell lines than **BP331** (BP16-CLB) ( $\text{IC}_{50}$  of 6.2 to 16.2  $\mu\text{M}$  vs. 8.7 to 25.5  $\mu\text{M}$ ). These results revealed that the efficacy of CLB is enhanced when conjugated to either the N- or the C-terminal end of **BP16**. Remarkably, the introduction of the Gly-Phe-Leu-Gly enzymatic cleavable sequence further increased this efficacy irrespective of the peptide end into which it is incorporated. The presence of this tetrapeptide might provide a specific recognition site

**Table 2** Cytotoxicity ( $\text{IC}_{50}$ ) of CLB and CLB-peptide conjugates in CAPAN-1, MCF-7, PC-3, SKMEL-28 and 1BR3G cells<sup>a</sup>

Peptide	Notation	CAPAN-1	MCF-7	PC-3	SKMEL-28	1BR3G
CLB		>100	73.7 $\pm$ 4.5	>100	>100	>100
<b>BP325</b>	CLB-BP16	13.7 $\pm$ 2.4	12.0 $\pm$ 2.7	11.3 $\pm$ 3.2	15.0 $\pm$ 3.0	18.2 $\pm$ 3.5
<b>BP331</b>	BP16-CLB	11.2 $\pm$ 2.5	25.5 $\pm$ 0.7	12.9 $\pm$ 2.0	8.7 $\pm$ 3.4	24.0 $\pm$ 1.3
<b>BP332</b>	CLB-GFLG-BP16	7.2 $\pm$ 0.3	14.0 $\pm$ 1.4	3.6 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 1.5	14.3 $\pm$ 0.6
<b>BP333</b>	BP16-GLFG-CLB	6.2 $\pm$ 0.3	16.2 $\pm$ 1.8	8.2 $\pm$ 0.5	6.4 $\pm$ 2.3	15.7 $\pm$ 0.6
<b>BP334</b>	CLB-BP308	11.2 $\pm$ 1.9	15.0 $\pm$ 5.0	16.4 $\pm$ 3.4	12.8 $\pm$ 2.9	13.8 $\pm$ 3.4
<b>BP335</b>	BP308-CLB	>100	>100	>100	>100	>100
<b>BP336</b>	CLB-GFLG-BP308	>100	>100	>100	>100	>100
<b>BP337</b>	BP308-GLFG-CLB	>100	>100	>100	>100	>100

<sup>a</sup> The  $\text{IC}_{50}$  values were determined by the MTT assay after 48 h of CLB-peptide conjugate exposure. Data represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments performed in triplicate.



for cathepsin B which could induce the release of CLB, enhancing its cytotoxicity. As previously reported, **BP16** is mainly internalized into cancer cells by clathrin dependent endocytosis and might follow a degradation pathway, where the fusion between late endosomes and lysosomes occurs. Therefore, the release of CLB from the sequences containing Gly-Phe-Leu-Gly could take place in the lysosomal compartments, which are the final stage of this endocytic pathway.

A different cytotoxic activity profile was observed for CLB-peptide conjugates derived from **BP308**. The activity of CLB was only increased when it was introduced at the N-terminus of this peptide. **BP334** (CLB-BP308) displayed  $IC_{50}$  values ranging from 11.2 to 16.4  $\mu\text{M}$  against the cell lines tested, whereas **BP335** (BP308-CLB) was not active ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ). Unlike in the case of **BP16**, the attachment of the tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly to the N- or the C-terminal end of **BP308** did not improve the activity of CLB, **BP336** (CLB-GFLG-BP308) and **BP337** (BP308-GFLG-CLB) being surprisingly inactive against all cell lines ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ).

The different behaviour of CLB-conjugates derived from **BP16** and **BP308** revealed the importance of evaluating the influence of the position of the drug in the peptide sequence on the cytotoxicity. Moreover, even though **BP308** displays similar cellular uptake to **BP16**, the fact that the incorporation of Gly-Phe-Leu-Gly in **BP308** does not enhance the cytotoxic activity of CLB suggests that the replacement of Lys by Arg in **BP16** might be associated with a different cellular uptake pattern.

### Cellular uptake of CLB peptide conjugates

In order to determine whether the cytotoxic activity profile exhibited by **BP325** (CLB-BP16), **BP331** (BP16-CLB), **BP334** (CLB-BP308) and **BP335** (BP308-CLB) correlated with their internalization properties, these CLB conjugates were labeled with 5(6)-carboxyfluorescein (CF) and analyzed by flow cytometry. The cellular uptake of the CF-labeled peptide conjugates **BP326** (CLB-BP16-CF), **BP338** (CF-BP16-CLB), **BP339** (CLB-BP308-CF) and **BP340** (CF-BP308-CLB) at 25  $\mu\text{M}$  was determined after 6 h of incubation in MCF-7 cells at 37 °C (Fig. 3).

Results showed that the position of CLB in **BP16** did not influence the internalization properties of this peptide, since **BP326** (CLB-BP16-CF) and **BP338** (CF-BP16-CLB) displayed similar mean intracellular intensity values ( $1151 \pm 50$  vs.  $1100 \pm 20$ ). Notably, the internalization ability of these peptides correlated with the cytotoxic activity exhibited by the corresponding non-labeled sequences **BP325** (CLB-BP16) and **BP331** (BP16-CLB) (Table 2).

Unlike the **BP16** derivatives, the **BP308** conjugates were differentially internalized. While **BP339** (CLB-BP308-CF) exhibited high internalization capacity ( $1116 \pm 25$ ), comparable to that of CLB-BP16-CF (**BP326**), **BP340** bearing the CLB moiety at the C-terminus showed a low intracellular fluorescence ( $348 \pm 20$ ). These results were consistent with the cytotoxic activity profile observed for the corresponding non-labeled peptides **BP334** (CLB-BP308) and **BP335** (BP308-CLB).

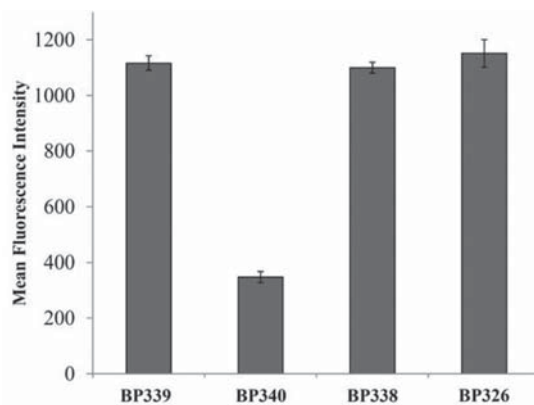


Fig. 3 Comparison of the cellular uptake of 5(6)-carboxyfluorescein labeled peptides **BP326** (CLB-BP16-CF), **BP338** (CF-BP16-CLB), **BP339** (CLB-BP308-CF) and **BP340** (CF-BP308-CLB) in MCF-7 cells. Cells were exposed to the peptide at 25  $\mu\text{M}$  for 6 h at 37 °C. Each column in the graph represents the mean fluorescence intensity of the cells determined in three independent experiments  $\pm$  SD.

The former was active against all cell lines whereas the latter exhibited  $IC_{50}$  values  $> 100 \mu\text{M}$ . Thus, the low cytotoxicity of **BP335** could be attributed to its low ability to cross the cell membrane.

These studies showed that for CPPs with similar cellular uptake properties, it is important to analyse the effect of the position of the cargo in the sequence.<sup>33,41,42</sup> In this case, **BP16** and **BP308** have the same net charge of +6 and display comparable cell-penetrating properties in MCF-7 cells as observed by flow cytometry and confocal microscopy. However, when a cargo is attached to one of the peptide ends, the resulting **BP16** and **BP308** conjugates have a different behaviour. Whereas the uptake properties of N- and C-terminal **BP16** conjugates are similar, **BP308** derivatives display significantly different internalization capacities.

### Cathepsin B enzymatic assays

To prove that the release of CLB from **BP332** (CLB-GFLG-BP16) and **BP333** (BP16-GFLG-CLB) might occur in the lysosomes, the hydrolysis of these sequences by cathepsin B was evaluated. Conditions were chosen to mimic the lysosomal medium and were based on a previously reported method.<sup>32</sup> The peptide conjugate **BP332** was exposed to a solution of cathepsin B in phosphate buffer (pH 5) containing 25 mM L-Cys and 1 mM EDTA. The digestion after 10, 30, 60, 90, 120 and 180 min was monitored by HPLC-MS (Fig. 4A). Just after adding **BP332** to the enzyme solution (digestion time = 0 min), a mixture of this peptide ( $t_R = 6.3$  min) together with low intensity peaks was observed. After 10 min, the peak corresponding to **BP332** significantly decreased and a peak at a retention time of 5.2 min appeared. This peak increased over time becoming the major one after 90 min of digestion. HPLC-MS analysis revealed that this peak corresponds to CLB-Gly-OH ( $m/z = 361.1, 363.1 [M + H]^+$ ;  $383.0, 385.0 [M + Na]^+$ ) (Fig. 4C).

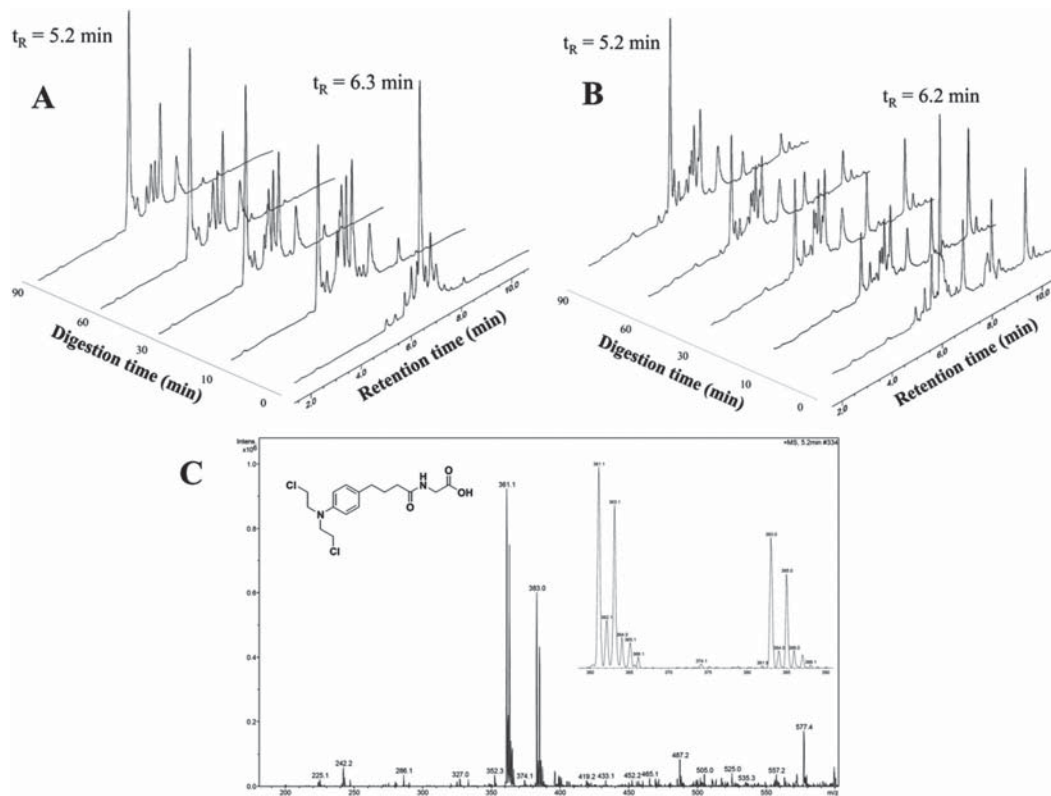


Fig. 4 Enzymatic digestion of **BP332** and **BP333** by cathepsin B monitored by HPLC-MS. (A) HPLC traces of the enzymatic digestion of **BP332** after 0, 10, 30, 60 and 90 min of enzyme exposure; (B) HPLC traces of the enzymatic digestion of **BP333** after 0, 10, 30, 60 and 90 min of enzyme exposure; (C) ESI-MS spectrum of the peak at  $t_R = 5.2$  min after 1 h of enzymatic digestion.

This result indicated that the hydrolytic cleavage occurred between the Gly and Phe residues of the enzymatic cleavable sequence Gly-Phe-Leu-Gly. The cleavage of the C-terminal analogue **BP333** (BP16-GLFG-CLB) by cathepsin B was tested and monitored (Fig. 4B) using the conditions described above for **BP332**. CLB was also released from **BP333** in a time-dependent manner following a pattern similar to that of **BP332**. The peak corresponding to CLB-Gly-OH ( $t_R = 5.2$  min) also increased over time during the digestion. All these data are in agreement with previous studies based on cathepsin B delivery strategies.<sup>33,34</sup> Moreover, they support the hypothesis that CLB might be released from **BP332** and **BP333** in the lysosomes leading to the high activity observed for these peptide conjugates in cancer cells.

## Conclusions

In this work we developed an efficient CLB delivery system based on **BP16**. The design of this system combined CLB and the enzymatic cleavable tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly at either the N- or the C-terminus of **BP16**. The resulting sequences **BP332** and **BP333** exhibited high cytotoxic activity against

cancer cells which could be attributed to the enzymatic release of CLB in the lysosomes. These results reveal that this delivery system could be applied to transport and efficiently release therapeutic agents in cancer treatments.

## Experimental section

### Peptide synthesis

**General method for solid-phase peptide synthesis.** All peptides (Table 1) were synthesized manually by the solid-phase method using Fmoc-type chemistry and the following side-chain protecting groups: *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) for Lys and 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl (Pmc) for Arg. A Fmoc-Rink-MBHA resin ( $0.56 \text{ mmol g}^{-1}$ ) was used as solid support to obtain peptide amides. Couplings of the Fmoc-amino acids (4 equiv.) were performed using DIPCPI (4 equiv.) and Oxyma (4 equiv.) in DMF under stirring at room temperature for 2 h, and monitored by the Kaiser test.<sup>38</sup> For sequences containing up to eleven residues, the Fmoc group was removed by treating the resin with a mixture of piperidine-DMF (3:7, 2 + 10 min). For longer sequences, Fmoc group removal was carried out with piperidine-NMP (3:7, 1 × 3 min + 3 × 10 min).



After each coupling and deprotection step, the resin was washed with DMF (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min), and air dried. After the coupling of the eleventh residue, NMP was used instead of DMF. Peptide elongation was performed by repeated cycles of Fmoc group removal, coupling and washings. Once the synthesis was complete, peptidyl resins were subjected to N-terminal Fmoc group removal. Then, peptides were cleaved or the peptidyl resins were derivatized with CLB, with 5(6)-carboxyfluorescein or with an acetyl group. Cleavage of peptides from the resin was performed by treatment with TFA-TIS-H<sub>2</sub>O (95 : 2.5 : 2.5) for 3 h at room temperature, followed by TFA evaporation by bubbling N<sub>2</sub> into the solution. Crude peptides were precipitated by adding cold diethyl ether (−20 °C) and collected by centrifugation. This procedure was repeated twice. Finally, peptides were dissolved in H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (50 : 50 v/v containing 0.1% TFA), lyophilized and tested for purity by HPLC. Detection was performed at 220 nm. Solvent A was 0.1% aq. TFA and solvent B was 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN. Analysis was carried out with a Kromasil 100 C<sub>18</sub> (4.6 mm × 40 mm, 3.5 μm) column with a 2–100% B linear gradient over 7 min at a flow rate of 1.0 mL min<sup>−1</sup>. ESI-MS and HRMS (ESI) were used to confirm the peptide identity. Peptides were obtained in purities ranging from 81 to >99%.

**Synthesis of the N-terminal CLB-peptide conjugates BP325, BP332, BP334, and BP336.** Peptide conjugates **BP325** and **BP332** were prepared from the peptidyl resin Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA (**1**), and **BP334** and **BP336** were prepared from Fmoc-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Leu-Phe-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ile-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Leu-Rink-MBHA (**2**). For the synthesis of **BP325** and **BP334**, after Fmoc removal and washing, the corresponding peptidyl resin was treated with CLB (5 equiv.), DIPCPI (5 equiv.) and Oxyma (5 equiv.) in DMF or NMP under stirring at room temperature for 5 h. The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.<sup>38</sup> The resin was then washed with NMP (6 × 1 min), CH<sub>3</sub>OH (6 × 1 min), and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min), and air dried. To obtain **BP332** and **BP336**, after Fmoc removal and washing, the amino acids of the Gly-Leu-Phe-Gly moiety and CLB were sequentially incorporated.

**CLB-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH<sub>2</sub> (BP325).** *t<sub>R</sub>* = 7.71 min (91% purity). HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>83</sub>H<sub>150</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>19</sub>O<sub>12</sub> [M + 5H]<sup>5+</sup> 335.4208; found 335.4228; calcd for C<sub>83</sub>H<sub>149</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>19</sub>O<sub>12</sub> [M + 4H]<sup>4+</sup> 418.5247; found 418.5260; calcd for C<sub>83</sub>H<sub>148</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>19</sub>O<sub>12</sub> [M + 3H]<sup>3+</sup> 558.3631; found 558.3644; calcd for C<sub>83</sub>H<sub>147</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>19</sub>O<sub>12</sub> [M + 2H]<sup>2+</sup> 836.0421; found 836.0404.

**CLB-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH<sub>2</sub> (BP332).** *t<sub>R</sub>* = 7.50 min (92% purity). HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>102</sub>H<sub>176</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>23</sub>O<sub>16</sub> [M + 5H]<sup>5+</sup> 409.8603; found 409.8592; calcd for C<sub>102</sub>H<sub>175</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>23</sub>O<sub>16</sub> [M + 4H]<sup>4+</sup> 512.0736; found 512.0709; calcd for C<sub>102</sub>H<sub>174</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>23</sub>O<sub>16</sub> [M + 3H]<sup>3+</sup> 682.4290; found 682.4259.

**CLB-Arg-Arg-Leu-Phe-Arg-Arg-Ile-Leu-Arg-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> (BP334).** *t<sub>R</sub>* = 7.59 min (>99% purity). HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>83</sub>H<sub>151</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>31</sub>O<sub>12</sub> [M + 6H]<sup>6+</sup> 307.5256; found 307.5239; calcd

for C<sub>83</sub>H<sub>150</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>31</sub>O<sub>12</sub> [M + 5H]<sup>5+</sup> 368.6286; found 368.6283; calcd for C<sub>83</sub>H<sub>149</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>31</sub>O<sub>12</sub> [M + 4H]<sup>4+</sup> 460.5339; found 460.5337; calcd for C<sub>83</sub>H<sub>148</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>31</sub>O<sub>12</sub> [M + 3H]<sup>3+</sup> 613.7095; found 613.7079.

**CLB-Gly-Phe-Leu-Gly-Arg-Arg-Leu-Phe-Arg-Arg-Ile-Leu-Arg-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> (BP336).** *t<sub>R</sub>* = 7.82 min (>99% purity). HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>102</sub>H<sub>177</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>35</sub>O<sub>16</sub> [M + 6H]<sup>6+</sup> 369.7243; found 369.7224; calcd for C<sub>102</sub>H<sub>176</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>35</sub>O<sub>16</sub> [M + 5H]<sup>5+</sup> 443.4677; found 443.4666; calcd for C<sub>102</sub>H<sub>175</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>35</sub>O<sub>16</sub> [M + 4H]<sup>4+</sup> 554.0828; found 554.0806; calcd for C<sub>102</sub>H<sub>174</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>35</sub>O<sub>16</sub> [M + 3H]<sup>3+</sup> 738.4413; found 738.4394.

**Synthesis of the C-terminal CLB-peptide conjugates BP331, BP333, BP335 and BP337.** For the synthesis of these peptide conjugates, the Lys residue to be derivatized at the side chain was incorporated as Fmoc-Lys(Dde)-OH (Dde = *N*-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl]). **BP331** and **BP333** were prepared from the peptidyl resin Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Dde)-Rink-MBHA (**3**), and **BP335** and **BP337** were prepared from Fmoc-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Leu-Phe-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Ile-Leu-Arg(Pmc)-Arg(Pmc)-Leu-Lys(Dde)-Rink-MBHA (**4**). After Fmoc removal and washing, the resins were treated with acetic anhydride-pyridine-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 1 : 1, 2 × 30 min) under stirring, and washed with NMP (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min). The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.<sup>38</sup> The resulting peptidyl resins were subjected to Dde group removal by treatment with a mixture of hydrazine-NMP (2 : 98, 5 × 20 min). The resins were then washed with NMP (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 × 1 min). For the synthesis of **BP331** and **BP335**, the free amino group of the resulting resin was acylated with CLB as described above for the N-terminal CLB conjugates. To obtain **BP333** and **BP337**, the amino acids of the Gly-Leu-Phe-Gly moiety and CLB were sequentially incorporated at the free amino group of the corresponding resin following the protocol previously described.

**Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys(CLB)-NH<sub>2</sub> (BP331).** *t<sub>R</sub>* = 7.24 min (>99% purity). HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>91</sub>H<sub>165</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>21</sub>O<sub>14</sub> [M + 6H]<sup>6+</sup> 307.7032; found 307.7014; calcd for C<sub>91</sub>H<sub>164</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>21</sub>O<sub>14</sub> [M + 5H]<sup>5+</sup> 369.0423; found 369.0408; calcd for C<sub>91</sub>H<sub>163</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>21</sub>O<sub>14</sub> [M + 4H]<sup>4+</sup> 461.0511; found 461.0494; calcd for C<sub>91</sub>H<sub>162</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>21</sub>O<sub>14</sub> [M + 3H]<sup>3+</sup> 614.3990; found 614.3963.

**Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys(Gly-Leu-Phe-Gly-CLB)-NH<sub>2</sub> (BP333).** *t<sub>R</sub>* = 7.38 min (91% purity). HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>110</sub>H<sub>190</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>25</sub>O<sub>18</sub> [M + 5H]<sup>5+</sup> 443.8814; found 443.8797; calcd for C<sub>110</sub>H<sub>189</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>25</sub>O<sub>18</sub> [M + 4H]<sup>4+</sup> 554.5999; found 554.5986; calcd for C<sub>110</sub>H<sub>188</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>25</sub>O<sub>18</sub> [M + 3H]<sup>3+</sup> 739.1308; found 739.1295.

**Ac-Arg-Arg-Leu-Phe-Arg-Arg-Ile-Leu-Arg-Arg-Leu-Lys(CLB)-NH<sub>2</sub> (BP335).** *t<sub>R</sub>* = 7.51 min (>99% purity). HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>91</sub>H<sub>165</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>33</sub>O<sub>14</sub> [M + 6H]<sup>6+</sup> 335.7093; found 335.7093; calcd for C<sub>91</sub>H<sub>164</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>33</sub>O<sub>14</sub> [M + 5H]<sup>5+</sup> 402.6497; found 402.6502; calcd for C<sub>91</sub>H<sub>163</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>33</sub>O<sub>14</sub> [M + 4H]<sup>4+</sup> 503.0603; found 503.0609; calcd for C<sub>91</sub>H<sub>162</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>33</sub>O<sub>14</sub> [M + 3H]<sup>3+</sup> 670.4113; found 670.4114; calcd for C<sub>91</sub>H<sub>161</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>33</sub>O<sub>14</sub> [M + 2H]<sup>2+</sup> 1006.1123; found 1006.1246.

*Ac-Arg-Arg-Leu-Phe-Arg-Arg-Ile-Leu-Arg-Arg-Leu-Lys(Gly-Leu-Phe-Gly-CLB)-NH<sub>2</sub> (BP337)*.  $t_R = 7.67$  min (>99% purity). HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{110}H_{191}Cl_2N_{37}O_{18}$  [ $M + 6H$ ]<sup>6+</sup> 398.0752; found 398.0749; calcd for  $C_{110}H_{190}Cl_2N_{37}O_{18}$  [ $M + 5H$ ]<sup>5+</sup> 477.4888; found 477.4890; calcd for  $C_{110}H_{189}Cl_2N_{37}O_{18}$  [ $M + 4H$ ]<sup>4+</sup> 596.6092; found 596.6090; calcd for  $C_{110}H_{188}Cl_2N_{37}O_{18}$  [ $M + 3H$ ]<sup>3+</sup> 795.1431; found 795.1443.

**Synthesis of the N-terminal 5(6)-carboxyfluorescein labeled peptides CF-BP16 and CF-BP308.** The N-terminus labeled peptides **CF-BP16** and **CF-BP308** were prepared from peptidyl resins **1** and **2**, respectively. 5(6)-Carboxyfluorescein (2.5 equiv.) was first pre-activated with Oxyma (2.5 equiv.) and DIPCDI (2.5 equiv.) in  $CH_2Cl_2$ -NMP (1:9) for 10 min. The mixture was added to the corresponding N-terminus deprotected peptidyl resin and reacted overnight at room temperature protected from light by covering it with aluminium foil due to the light sensitivity of the 5(6)-carboxyfluorescein. Completion of the coupling was confirmed using the Kaiser test.<sup>38</sup> The resin was then washed with NMP (1 × 5 min), piperidine-NMP (1:5, 1 × 15 min), NMP (6 × 1 min),  $CH_2Cl_2$  (6 × 1 min),  $CH_3OH$  (6 × 1 min), and  $CH_2Cl_2$  (6 × 1 min), and air dried.<sup>39</sup>

*CF-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH<sub>2</sub> (CF-BP16)*.  $t_R = 6.72$  and 6.80 min, corresponding to the two isomers of the 5(6)-carboxyfluorescein (94% purity). HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{90}H_{143}N_{18}O_{17}$  [ $M + 5H$ ]<sup>5+</sup> 349.6170; found 349.6186; calcd for  $C_{90}H_{142}N_{18}O_{17}$  [ $M + 4H$ ]<sup>4+</sup> 437.0203; found 437.0217; calcd for  $C_{90}H_{141}N_{18}O_{17}$  [ $M + 3H$ ]<sup>3+</sup> 582.3579; found 582.3589.

*CF-Arg-Arg-Leu-Phe-Arg-Arg-Ile-Leu-Arg-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> (CF-BP308)*.  $t_R = 6.72$  and 6.99 min, corresponding to the two isomers of the 5(6)-carboxyfluorescein (>99% purity). HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{90}H_{144}N_{30}O_{17}$  [ $M + 6H$ ]<sup>6+</sup> 319.5215; found 319.5195; calcd for  $C_{90}H_{143}N_{30}O_{17}$  [ $M + 5H$ ]<sup>5+</sup> 383.2244; found 383.2234; calcd for  $C_{90}H_{142}N_{30}O_{17}$  [ $M + 4H$ ]<sup>4+</sup> 478.7787; found 478.7778; calcd for  $C_{90}H_{141}N_{30}O_{17}$  [ $M + 3H$ ]<sup>3+</sup> 638.0358; found 638.0341.

**Synthesis of the 5(6)-carboxyfluorescein labeled CLB-peptide conjugates BP326, BP338, BP339, and BP340.** **BP338** and **BP340**, bearing the 5(6)-carboxyfluorescein at the N-terminus and the CLB at the C-terminus, were prepared from peptidyl resins **3** and **4**, respectively. After Fmoc removal, the resulting resins were acylated with 5(6)-carboxyfluorescein as described above for **CF-BP16** and **CF-BP308**, and treated with hydrazine-NMP (2:98, 5 × 20 min) under stirring at room temperature. Then, the resins were washed with NMP (6 × 1 min) and  $CH_2Cl_2$  (6 × 1 min), and air dried. Next, CLB coupling was carried out as described for N-terminal CLB derivatized peptides.

**BP326** and **BP339**, incorporating a CLB moiety at the N-terminus and a 5(6)-carboxyfluorescein group at the C-terminus, were prepared from peptidyl resins Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Ile-Leu-Lys(Dde)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA and **4**, respectively. After Fmoc removal, the resulting resins were acylated with CLB as described above for the N-terminal CLB conjugates, and treated with hydrazine-NMP (2:98, 5 × 20 min) under stirring at room temperature. Then, the resins were washed with NMP (6 × 1 min) and  $CH_2Cl_2$  (6 ×

1 min), and air dried. Next, labeling with 5(6)-carboxyfluorescein was carried out as described for the N-terminal carboxyfluorescein labeled peptides **CF-BP16** and **CF-BP308**.

*CLB-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys(CF)-Lys-Leu-NH<sub>2</sub> (BP326)*.  $t_R = 7.56$  min (81% purity). HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{104}H_{159}Cl_2N_{19}O_{18}$  [ $M + 4H$ ]<sup>4+</sup> 508.0366; found 508.0384; calcd for  $C_{104}H_{158}Cl_2N_{19}O_{18}$  [ $M + 3H$ ]<sup>3+</sup> 677.0464; found 677.0473; calcd for  $C_{104}H_{157}Cl_2N_{19}O_{18}$  [ $M + 2H$ ]<sup>2+</sup> 1015.0660; found 1015.0638.

*CF-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys(CLB)-NH<sub>2</sub> (BP338)*.  $t_R = 7.68$  and 7.83 min, corresponding to the two isomers of the 5(6)-carboxyfluorescein (97% purity). HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{110}H_{173}Cl_2N_{21}O_{19}$  [ $M + 6H$ ]<sup>6+</sup> 360.3760; 360.3766; calcd for  $C_{110}H_{172}Cl_2N_{21}O_{19}$  [ $M + 5H$ ]<sup>5+</sup> 432.2498; 432.2496; calcd for  $C_{110}H_{171}Cl_2N_{21}O_{19}$  [ $M + 4H$ ]<sup>4+</sup> 540.0604; found 540.0575; calcd for  $C_{110}H_{170}Cl_2N_{21}O_{19}$  [ $M + 3H$ ]<sup>3+</sup> 719.7447; found 719.7458.

*CLB-Arg-Arg-Leu-Phe-Arg-Arg-Ile-Leu-Arg-Arg-Leu-Lys(CF)-NH<sub>2</sub> (BP339)*.  $t_R = 7.86$  min (>99% purity). HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{110}H_{173}Cl_2N_{33}O_{19}$  [ $M + 6H$ ]<sup>6+</sup> 388.3822; found 388.3821; calcd for  $C_{110}H_{172}Cl_2N_{33}O_{19}$  [ $M + 5H$ ]<sup>5+</sup> 465.8571; found 465.8573; calcd for  $C_{110}H_{171}Cl_2N_{33}O_{19}$  [ $M + 4H$ ]<sup>4+</sup> 582.0696; found 582.0687; calcd for  $C_{110}H_{170}Cl_2N_{33}O_{19}$  [ $M + 3H$ ]<sup>3+</sup> 775.7570; found 775.7576.

*CF-Arg-Arg-Leu-Phe-Arg-Arg-Ile-Leu-Arg-Arg-Leu-Lys(CLB)-NH<sub>2</sub> (BP340)*.  $t_R = 7.47$ , 7.61, 7.70 and 7.79 min, corresponding to the isomers of the 5(6)-carboxyfluorescein (>99% purity). HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{110}H_{173}Cl_2N_{33}O_{19}$  [ $M + 6H$ ]<sup>6+</sup> 388.3822; found 388.3820;  $C_{110}H_{172}Cl_2N_{33}O_{19}$  [ $M + 5H$ ]<sup>5+</sup> 465.8571; found 465.8572;  $C_{110}H_{171}Cl_2N_{33}O_{19}$  [ $M + 4H$ ]<sup>4+</sup> 582.0696; found 582.0681;  $C_{110}H_{170}Cl_2N_{33}O_{19}$  [ $M + 3H$ ]<sup>3+</sup> 775.7570; found 775.7565.

### Cytotoxicity assays

The cytotoxicity of CLB and of the CLB-peptide conjugates **BP325**, **BP331**, **BP332**, **BP333**, **BP334**, **BP335**, **BP336**, **BP337** and CLB in CAPAN-1, MCF-7, PC-3 and SKMEL-28 tumor cells and in 1BR3G non-malignant cells was determined by the MTT assay. CLB-peptide conjugates were diluted in Milli-Q water to obtain 2 mM stock solutions. CLB was dissolved in DMSO to provide a 75 mM stock solution.<sup>40</sup> Appropriate aliquots of these solutions were diluted in the cell culture medium to obtain the final working concentrations. Aliquots of 10 000 CAPAN-1, 6000 MCF-7 or PC-3, 4000 SKMEL-28 and 5000 1BR3G cells were seeded on 96-well plates 24 h prior to the treatment. Then, cells were treated for 48 h with the corresponding compound at concentrations ranging from 0 to 100  $\mu$ M. After removal of the treatment, cells were washed with PBS and incubated for additional 2 h in the dark with fresh culture medium (100  $\mu$ L) with MTT (10  $\mu$ L). The medium was discarded and DMSO (100  $\mu$ L) was added to each well to dissolve the purple formazan crystals. Plates were agitated at room temperature for 2 min and the absorbance of each well was determined with an absorbance microplate reader (ELX800, BioTek, Winooski, USA) at a wavelength of 570 nm. Three replicates for each compound were used, and all treat-

ments were tested at least in three independent experiments. For each treatment, the cell viability was determined as a percentage of the control untreated cells by dividing the mean absorbance of each treatment by the mean absorbance of the untreated cells. The concentration that reduces by 50% the cell viability ( $IC_{50}$ ) was established for each compound using a four-parameter curve fit (Gen5 BioTeck Instruments).

### Flow cytometry

The uptake efficiency of **CF-BP16**, **CF-BP308**, **BP326** (CLB-BP16-CF), **BP338** (CF-BP16-CLB), **BP339** (CLB-BP308-CF) and **BP340** (CF-BP308-CLB) by MCF-7 cells was quantified by flow cytometry. Aliquots of 50 000 cells were seeded in 24-well plates and allowed to attach for 24 h. Next, the cells were incubated with **CF-BP16** and **CF-BP308** at 25  $\mu$ M for 1, 3 and 6 h or with **BP326**, **BP338**, **BP339** and **BP340** at 25  $\mu$ M for 6 h at 37 °C. The cells were harvested by trypsinization and washed with 2% FBS in cold PBS. The fluorescence of the cells, corresponding to the cellular uptake of the carboxyfluorescein labelled peptides, was analysed using a FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) equipped with the CellQuest™ software (Becton Dickinson). The mean fluorescence intensity was represented on a four orders of magnitude log scale (1–10 000). Ten thousand cells were analysed in each experiment.

### Confocal microscopy

MCF-7 cells were seeded on coverslips and allowed to attach overnight. Mitochondria were stained with 500 nM Mitotracker Red for 30 min at 37 °C. The cells were incubated with **CF-BP16** and **CF-BP308** at 50  $\mu$ M for 30 min at 4 °C and for 3 h at 37 °C, washed with cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at 4 °C. The cell nuclei were stained with 2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> Hoechst 33258 (excitation/emission: 352 nm/461 nm) over 15 min at room temperature. After washing twice with cold PBS, the coverslips were mounted using a fluorescence mounting medium (Dako, Carpinteria, CA, USA) and examined using a Leica TCS-SP5 multiphoton and high-velocity spectral confocal microscope (Leica Microsystems, Nussloch, Germany).

### Cathepsin B enzymatic assays

The enzymatic digestion of the CLB-peptide conjugates **BP332** (CLB-GFLG-BP16) and **BP333** (BP16-GLFG-CLB) was evaluated using a previously reported method with minor modifications.<sup>32</sup> A cathepsin B stock solution (1  $\times$  10<sup>4</sup> U L<sup>-1</sup>, 60  $\mu$ L) was added to phosphate buffer (pH 5.0, 25 mM L-Cys, 1 mM EDTA; 890  $\mu$ L) and preactivated for 10 min at 37 °C. Next, **BP332** and **BP333** (1.8 mM, 50  $\mu$ L) were added to the mixture. Aliquots of this mixture (110  $\mu$ L) were sampled at 0, 10, 30, 60, 90, 120 and 180 min, flash frozen in liquid nitrogen and analyzed by HPLC-MS. The analytical HPLC conditions used for these analyses were the same as described above in the Peptide synthesis section to test the purity of the peptides.

## Acknowledgements

This work was supported by Consolider Ingenio CSD/CSD2010-00065 from MICINN of Spain. We also thank the Catalan DIUE of the Generalitat de Catalunya (2009SGR637). X. R. acknowledges financial support from INNPLANTA project INP-2011-0059-PCT-420000-ACT1. M. C. and X. R. thank ICREA Academia Awards. We also acknowledge the Serveis Tècnics de Recerca of the University of Girona for technical support.

## Notes and references

- 1 C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 7743–7765.
- 2 L. W. Kleiner, J. C. Wright and Y. Wang, *J. Controlled Release*, 2014, **181**, 1–10.
- 3 K. Thanki, R. P. Gangwal, A. T. Sangamwar and S. Jain, *J. Controlled Release*, 2013, **170**, 15–40.
- 4 C. Foged and H. M. Nielsen, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2008, **5**, 105–118.
- 5 S. B. Fonseca, M. P. Pereira and S. O. Kelley, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2009, **61**, 953–964.
- 6 F. Heitz, M. C. Morris and G. Divita, *Br. J. Pharmacol.*, 2009, **157**, 195–206.
- 7 E. Vivès, J. Schmidt and A. Pèlegri, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1786**, 126–138.
- 8 E.-S. Khafagy and M. Morishita, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2012, **64**, 531–539.
- 9 Y. Huang, Y. Jiang, H. Wang, J. Wang, M. C. Shin, Y. Byun, H. He, Y. Liang and V. C. Yang, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2013, **65**, 1299–1315.
- 10 E. G. Stanzl, B. M. Trantow, J. R. Vargas and P. A. Wender, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 2944–2954.
- 11 G. Gasparini, E.-K. Bang, G. Molinar, D. V. Tulumello, S. Ward, S. O. Kelly, A. Roux, N. Sakai and S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 6069–6074.
- 12 C. Bechara and S. Sagan, *FEBS Lett.*, 2013, **587**, 1693–1702.
- 13 D. M. Copolovici, K. Langel, E. Eriste and Ü. Langel, *ACS Nano*, 2014, **8**, 1972–1994.
- 14 E. Koren and V. P. Torchilin, *Trends Mol. Med.*, 2012, **18**, 385–393.
- 15 S. Majumdar and T. J. Siahaan, *Med. Res. Rev.*, 2010, **32**, 637–658.
- 16 X.-X. Zhang, H. S. Eden and X. Chen, *J. Controlled Release*, 2012, **159**, 2–13.
- 17 M. Fotin-Mleczek, R. Fischer and R. Brock, *Curr. Pharm. Des.*, 2005, **11**, 3613–3628.
- 18 S. Pujals, J. Fernández-Carneado, C. López-Iglesias, M. J. Kogan and E. Giralt, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 264–279.
- 19 T. L. Andresen, D. H. Thompson and T. Kaasgaard, *Mol. Membr. Biol.*, 2010, **27**, 353–363.

- 20 E. Fleige, M. A. Quadir and R. Haag, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2012, **64**, 866–884.
- 21 L. Bildstein, C. Dubernet and P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**, 3–23.
- 22 Y. Bae, N. Nishiyama, N. S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro and K. Kataoka, *Bioconjugate Chem.*, 2005, **16**, 122–130.
- 23 M. Guo, C. Que, C. Wang, X. Liu, H. Yan and K. Liu, *Bio-materials*, 2011, **32**, 185–194.
- 24 F. Qiu, D. Wang, Q. Zhu, L. Zhu, G. Tong, Y. Lu, D. Yan and X. Zhu, *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 1355–1364.
- 25 N. Singh, A. Karambelkar, L. Gu, K. Lin, J. S. Miller, C. S. Chen, M. J. Sailor and S. N. Bhatia, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 19582–19585.
- 26 C. Sun, W.-C. Shen, J. Tu and J. L. Zaro, *Mol. Pharm.*, 2014, **11**, 1583–1590.
- 27 J. Tian, L. Ding, H.-J. Xu, Z. Shen, H. Ju, L. Jia, L. Bao and J.-S. Yu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 18850–18858.
- 28 R. Mahato, W. Tai and K. Cheng, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**, 659–670.
- 29 S. Aluri, S. M. Janib and J. A. Mackay, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2009, **61**, 940–952.
- 30 M. M. Mohamed and B. F. Sloane, *Nat. Rev. Cancer*, 2006, **6**, 764–775.
- 31 R. Shankar, A. Samykutty, C. Riggin, S. Kannan, U. Wenzel and R. Kolhatkar, *Mol. Pharm.*, 2013, **10**, 3776–3788.
- 32 P. Zhang, A. G. Cheetham, L. L. Lock and H. Cui, *Bioconjugate Chem.*, 2013, **24**, 604–613.
- 33 M. Moreno, E. Zurita and E. Giralt, *J. Controlled Release*, 2014, **182**, 13–21.
- 34 K. B. Bai, O. Láng, E. Orbán, R. Szabó, L. Köhidai, F. Hudecz and G. Mezö, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 2260–2269.
- 35 M. Soler, M. González-Bártulos, D. Soriano-Castell, X. Ribas, M. Costas, F. Tebar, A. Massaguer, L. Feliu and M. Planas, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 1652–1663.
- 36 R. Brock, *Bioconjugate Chem.*, 2014, **25**, 863–868.
- 37 I. Nakase, S. Okumura, S. Katayama, H. Hirose, S. Pujals, H. Yamaguchi, S. Arakawa, S. Shimizu and S. Futaki, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 11097–11099.
- 38 E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger and P. Cook, *Anal. Biochem.*, 1970, **34**, 595–598.
- 39 R. Fischer, O. Mader, G. Jung and R. Brock, *Bioconjugate Chem.*, 2003, **14**, 653–660.
- 40 A. Guaragna, A. Chiaviello, C. Paoletta, D. D'Alonzo, G. Palumbo and G. Palumbo, *Bioconjugate Chem.*, 2012, **23**, 84–96.
- 41 A. Brieger, G. Plotz, I. Hinrichsen, S. Passmann, R. Adam and S. Zeuzem, *PLoS One*, 2012, **7**, e31863.
- 42 W. Zhang, J. Song, L. Mu, B. Zhang, L. Liu, Y. Xing, K. Wang, Z. Li and R. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 1452–1455.



Reproduced with permission from:

Design, Preparation, and Characterization of Zn and Cu Metallopeptides Based On Tetradentate Aminopyridine Ligands Showing Enhanced DNA Cleavage Activity. Soler M, Figueras E, Serrano-Plana J, González-Bártulos M, Massaguer A, Company A, Martínez MÁ, Malina J, Brabec V, Feliu L, Planas M, Ribas X, Costas M. *Inorg Chem.* 2015 Nov 16;54(22):10542

Copyright © 2015 American Chemical Society





# Design, Preparation, and Characterization of Zn and Cu Metallopeptides Based On Tetradentate Aminopyridine Ligands Showing Enhanced DNA Cleavage Activity

Marta Soler,<sup>†,‡</sup> Eduard Figueras,<sup>‡</sup> Joan Serrano-Plana,<sup>†</sup> Marta González-Bártulos,<sup>§</sup> Anna Massaguer,<sup>§</sup> Anna Company,<sup>†</sup> M<sup>a</sup> Ángeles Martínez,<sup>§</sup> Jaroslav Malina,<sup>||</sup> Viktor Brabec,<sup>\*,||</sup> Lidia Feliu,<sup>\*,‡</sup> Marta Planas,<sup>\*,‡</sup> Xavi Ribas,<sup>\*,†</sup> and Miquel Costas<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>QBIS-CAT Research Group, Institut de Química Computacional i Catàlisi (IQCC) and Departament de Química, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Catalonia, Spain

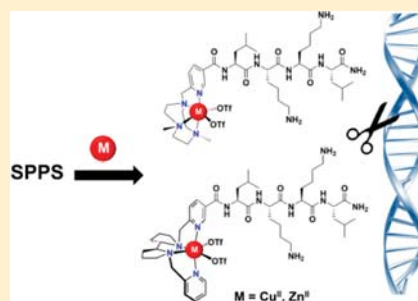
<sup>‡</sup>LIPPSO, Departament de Química, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Catalonia, Spain

<sup>§</sup>Biochemistry of Cancer Group, Biochemistry and Molecular Biology Unit, Departament de Química and Department of Biology, Universitat de Girona, Campus Montilivi, 17071 Girona, Catalunya, Spain

<sup>||</sup>Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** The conjugation of redox-active complexes that can function as chemical nucleases to cationic tetrapeptides is pursued in this work in order to explore the expected synergistic effect between these two elements in DNA oxidative cleavage. Coordination complexes of biologically relevant first row metal ions, such as Zn(II) or Cu(II), containing the tetradentate ligands 1,4-dimethyl-7-(2-pyridylmethyl)-1,4,7-triazacyclononane ( $\text{Me}^2\text{PyTACN}$ ) and (2*S*,2*S'*)-1,1'-bis(pyrid-2-ylmethyl)-2,2'-bipyrridine ((*S,S'*)-BPBP) have been linked to a cationic LKKL tetrapeptide sequence. Solid-phase synthesis of the peptide-tetradentate ligand conjugates has been developed, and the preparation and characterization of the corresponding metallotetrapeptides is described. The DNA cleavage activity of Cu and Zn metallopeptides has been evaluated and compared to their metal binding conjugates as well as to the parent complexes and ligands. Very interestingly, the oxidative Cu metallopeptides  $\mathbf{1}_{\text{Cu}}$  and  $\mathbf{2}_{\text{Cu}}$  show an enhanced activity compared to the parent complexes,  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  and  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$ , respectively. Under optimized conditions,  $\mathbf{1}_{\text{Cu}}$  displays an apparent pseudo first-order rate constant ( $k_{\text{obs}}$ ) of  $\sim 0.16 \text{ min}^{-1}$  with a supercoiled DNA half-life time ( $t_{1/2}$ ) of  $\sim 4.3 \text{ min}$ . On the other hand,  $k_{\text{obs}}$  for  $\mathbf{2}_{\text{Cu}}$  has been found to be  $\sim 0.11 \text{ min}^{-1}$  with  $t_{1/2} \approx 6.4 \text{ min}$ . Hence, these results point out that the DNA cleavage activities promoted by the metallopeptides  $\mathbf{1}_{\text{Cu}}$  and  $\mathbf{2}_{\text{Cu}}$  render  $\sim 4$ -fold and  $\sim 23$  rate accelerations in comparison with their parent Cu complexes. Additional binding assays and mechanistic studies demonstrate that the enhanced cleavage activities are explained by the presence of the cationic LKKL tetrapeptide sequence, which induces an improved binding affinity to the DNA, thus bringing the metal ion, which is responsible for cleavage, in close proximity.



## INTRODUCTION

Metallopeptides have emerged in recent years as versatile tools to explore new features in the bioinorganic discipline.<sup>1–5</sup> Particularly, redox-active metallopeptides are of potential use for different biological purposes, especially those involving DNA and RNA targeting.<sup>6–14</sup> For example, Barton and Cowan groups reported effective strategies in reaching DNA and RNA targets, therefore, constituting promising platforms for molecular probes and therapeutics.<sup>13,15</sup> Despite their interest, contributions of peptide-based transition metal complexes in this area are still relatively limited, usually hampered by their tedious synthetic preparation and characterization.<sup>16–18</sup> In this context, effective designs and straightforward synthetic methodologies must be addressed in order to obtain redox-active

metallopeptides that selectively interact with DNA.<sup>19–21,14,22</sup> Moreover, the same methodologies may provide inspiration for the further design of metallopeptide conjugates that can be endowed with cellular uptake properties for a nuclear-targeted accumulation.<sup>10,13,23,24</sup> This intracellular localization may undergo a redox-induced antiproliferative effect, similar to that mediated by the clinically approved iron chelated bleomycin.<sup>8</sup>

In this regard, peptides could be especially attractive templates to be considered as promising recognition sites in DNA-binding.<sup>12,25–30</sup> Particularly, the recognition specificity of

Received: April 22, 2015

Published: October 27, 2015



positively charged short peptides toward DNA has been demonstrated. Facing the precedent literature, SPKK or KWKK cationic motifs have been reported to preferentially bind to the minor groove of the DNA with a degree of sequence specificity for A/T-rich sites.<sup>31–33</sup> This selective binding opens new perspectives for controlling the DNA interaction by molecules with useful properties.

On the basis of these precedents, in this work we have targeted the conjugation of cationic tetrapeptides to redox-active complexes that can function as chemical nucleases in order to explore the expected synergistic effect. As a model design, we focused our attention on the conjugation of complexes of biologically relevant first row metal ions, such as Zn(II) or Cu(II), containing the tetradentate ligands 1,4-dimethyl-7-(2-pyridylmethyl)-1,4,7-triazacyclononane (<sup>Me2</sup>PyTACN) and (2*S*,2*S'*)-1,1'-bis(pyrid-2-ylmethyl)-2,2'-bipyridine ((*S,S'*)-BPBP) to the cationic tetrapeptide LKKL. This sequence contains two consecutive lysine residues, which is analogous to the cationic motifs previously reported. Aminopyridine transition metal complexes with these ligands exhibit rich redox chemistry. Their high reactivity can be traced in the first place to the presence of labile sites in the metal ion coordination sphere that enable fast reaction with external molecules. For example, it has been shown that these sites enable fast reactivity of the iron and manganese complexes with peroxides, forming metal based reactive species.<sup>34–38</sup> Furthermore, metal complexes containing the former tetradentate ligands have been described as powerful and selective catalysts that operate under mild experimental conditions, and at the basis of this activity is the ability of these ligands to enable the metal ion to reach highly electrophilic high oxidation states.<sup>34–42</sup> This chemical behavior should be regarded as a significant difference from most common approaches in this topic that rely on chemically more stable complexes to form metallopeptides.

Aiming at taking advantage of the high reactivity of this class of complexes in a biological frame, herein, we report the solid-phase synthesis and the characterization of novel metal-tetrapeptides based on <sup>Me2</sup>PyTACN and (*S,S'*)-BPBP ligands. Furthermore, the DNA cleavage activity of Cu(II) and Zn(II) metallopeptides as a model for redox and hydrolytic DNA cleavage, respectively, have been studied and compared to their metal binding conjugates as well as to the parent complexes and ligands. Kinetic and binding assays as well as additional mechanistic studies have also been examined.

## ■ EXPERIMENTAL SECTION

**Materials and Methods.** Unless otherwise stated, common chemicals and solvents (HPLC-grade or reagent-grade quality) were purchased from commercial sources and used without further purification. Solvents were dried by passing through an activated alumina purification system (MBraun SPS-800). The 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) derivatives and 4-methylbenzhydrylamine (MBHA) resin (0.56 mmol/g) were obtained from Senn Chemicals International (Gentilly, France), NovaBiochem (Schwalbach, Germany), or IRIS Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany). Aminomethyl ChemMatrix resin (0.66 mmol/g) was obtained from Matrix Innovation Inc. (St-Hubert, Canada). Ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate (Oxyma) and 1-[[1-(cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy) dimethylaminomorpholino]] uronium hexafluorophosphate (COMU) were purchased from Novabiochem (Nottingham, UK). Trifluoroacetic acid (TFA), triisopropylsilane (TIS), dimethyl sulfoxide (DMSO), *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIPC-DI), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA), picolinaldehyde, 4-

(dimethylamino)pyridine (DMAP), (*S,S*)-bypirrolidine, dimethylpyridine-2,5-dicarboxylate, *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBSCl), imidazole, 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), CaCl<sub>2</sub>, LiOH, NaBH<sub>4</sub>, (+)-sodium L-ascorbate, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid (Tiron), sodium azide, methyl green zinc chloride, and Hoechst were from Sigma–Aldrich Corporation (Madrid, Spain). Piperidine, tetrabutylammonium fluoride (TBAF), and *p*-toluenesulfonyl chloride (TsCl) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Anhydrous MgSO<sub>4</sub>, NaI, and acetic acid (AcOH) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Aqueous NH<sub>3</sub> was obtained from Merck Millipore (USA). *N*-Methyl-2-pyrrolidinone (NMP), *N,N*-dimethylformamide (DMF), CH<sub>3</sub>OH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN, hexane, diethyl ether, and solvents for high performance liquid chromatography (HPLC) were obtained from Scharlau (Sentmenat, Spain). AcOEt and tetrahydrofuran (THF) were obtained from Carlo Erba (Milan, Italy). The pUC18 DNA was purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Compounds were analyzed under standard analytical HPLC conditions with a Dionex liquid chromatography instrument composed of an UV/vis Dionex UVD170U detector, a P680 Dionex bomb, an ASI-100 Dionex automatic injector, and CHROMELEON 6.60 software. Detection was performed at 220 nm. Solvent A was 0.1% aq. TFA and solvent B was 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN. Method A: Analysis was carried out with a Kromasil 100 C<sub>18</sub> (4.6 mm × 40 mm, 3.5 μm) column with a 2–100% B linear gradient over 7 min at a flow rate of 1 mL/min. Method B: Analysis was carried out with a Kromasil 100 C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with a 2–100% B linear gradient over 30 min at a flow rate of 1 mL/min.

Reverse-phase column chromatography was carried out on a Teledyne ISCO CombiFlash RF-200 automated flash chromatography system using a RediSep Rf Gold reverse-phase C<sub>18</sub> column packed with high performance C<sub>18</sub> derivatized silica (Vertex Technics).

Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on precoated TLC plates, silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). The spots on the TLC plates were visualized with UV/vis light (254 nm) and/or stained with a solution of potassium permanganate (1.5 g/100 mL H<sub>2</sub>O). Flash chromatography purifications and basifications were performed on silica gel 60 (230–400 mesh, Merck).

Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analyses were performed with an Esquire 6000 ESI ion Trap LC/MS (Bruker Daltonics) instrument equipped with an electrospray ion source (University of Girona). The instrument was operated in the positive ESI(+) ion mode. Samples (5 μL) were introduced into the mass spectrometer ion source directly through an HPLC autosampler. The mobile phase (80:20 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O at a flow rate of 100 μL/min) was delivered by a 1100 Series HPLC pump (Agilent). Nitrogen was employed as both the drying and nebulizing gas. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded under conditions of ESI with a Bruker MicrOTOF-Q IITM instrument using a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer (University of Girona). Samples were introduced into the mass spectrometer ion source by direct infusion through a syringe pump and were externally calibrated using sodium formate. The instrument was operated in the positive ESI(+) ion mode.

UV/vis spectroscopy was performed on an Agilent 8452 UV/vis spectrophotometer with 1 cm quartz cell, equipped with a temperature control cryostat from Unisoku Scientific Instruments, Japan.

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were measured with a Bruker 400 MHz NMR spectrometer (University of Girona). Chemical shifts were reported as δ values (ppm) directly referenced to the solvent signal.

Microwave-assisted reactions were performed with a single mode Discover S-Class labstation microwave (CEM) (0–300 W). The time, temperature, and power were controlled with the Synergy software. The temperature was monitored through an infrared sensor in the floor of the cavity.

Ethidium bromide (EB) was purchased from Merck KGaA. Calf thymus (ct) DNA, poly(dG-dC)<sub>2</sub>, and poly(dA-dT)<sub>2</sub> were purchased from Sigma (Prague, Czech Republic) and were used without further purification. The polynucleotides and ct-DNA were dissolved in 10

mM NaCl and kept frozen until the day of the experiment. The DNA concentrations (moles of bases per liter) of all polynucleotides were determined spectroscopically by using the published molar extinction coefficients at the maximum of the long wavelength absorbance.

**Synthesis. Synthesis of Methyl 6-(hydroxymethyl)nicotinate (9).** This compound was prepared following a slightly modified procedure with respect to the previously reported one.<sup>43</sup> A solution of dimethylpyridine-2,5-dicarboxylate (5 g, 0.025 mol) and  $\text{CaCl}_2$  (11.35 g, 0.1 mol) in THF/ $\text{CH}_3\text{OH}$  (1:2, 160 mL) was cooled to 0 °C, and  $\text{NaBH}_4$  (1.45 g, 0.037 mol) was added slowly. The reaction was maintained at 0 °C and monitored by TLC. After consumption of the starting material,  $\text{H}_2\text{O}$  (100 mL) was added slowly. The product was extracted with  $\text{CHCl}_3$  (6 × 40 mL), and the combined organic layers were dried with anhydrous  $\text{MgSO}_4$ . The solvent was evaporated under reduced pressure yielding an off white solid, which was purified by column chromatography. Elution with hexane/AcOEt (1:1) afforded methyl 6-(hydroxymethyl)nicotinate (9) as a white solid (4 g, 80% yield).  $R_f$ : 0.82 hexane/AcOEt (1:7).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3.95 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.83 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 7.36 (dd,  $J$  = 0.6 and 8.2 Hz, 1 H,  $\text{H}_3$ ), 8.29 (dd,  $J$  = 2.0 and 8.2 Hz, 1 H,  $\text{H}_4$ ), 9.15 (dd,  $J$  = 0.6 and 2.0 Hz, 1 H,  $\text{H}_2$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 52.4 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 64.3 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 120.0 ( $\text{C}_5$ ), 124.9 ( $\text{C}_3$ ), 137.8 ( $\text{C}_4$ ), 149.9 ( $\text{C}_2$ ), 163.5 ( $\text{C}_6$ ), 165.6 ( $\text{C}=\text{O}$ ) ppm. MS (ESI):  $m/z$  = 168.0 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>.

**Synthesis of Methyl 6-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]nicotinate.** Methyl 6-(hydroxymethyl)nicotinate (9) (2 g, 0.012 mol), imidazole (2.44 g, 0.036 mol), and DMAP (20 mg, 0.163 mmol) were dissolved in anhydrous  $\text{CH}_3\text{CN}$  (60 mL) and stirred for 10 min at room temperature under nitrogen. After this time, TBSCl was added, and the reaction mixture was maintained for 2 h at room temperature under nitrogen. The reaction was monitored by TLC and, after the consumption of the starting material,  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL) was added. The product was extracted with AcOEt (5 × 60 mL) and the combined organic layers were dried with anhydrous  $\text{MgSO}_4$ . The solvent was evaporated under reduced pressure yielding methyl 6-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]nicotinate as a viscous yellow oil (1.72 g, 86% yield).  $R_f$ : 0.68 (AcOEt/ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3(\text{aq})$ ; 5:1:1).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.13 (s, 6 H, ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>Si), 0.96 (s, 9 H, ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 3.95 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.88 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.61 (dd,  $J$  = 0.4 and 8.0 Hz, 1 H,  $\text{H}_3$ ), 8.31 (dd,  $J$  = 2.0 and 8.0 Hz, 1 H,  $\text{H}_4$ ), 9.10 (dd,  $J$  = 0.4 and 2.0 Hz, 1 H,  $\text{H}_2$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = -5.3 ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>Si, 18.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.0 (( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 52.5 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 66.1 ( $\text{CH}_2$ ), 119.6 ( $\text{C}_5$ ), 124.4 ( $\text{C}_3$ ), 138.0 ( $\text{C}_4$ ), 150.1 ( $\text{C}_2$ ), 166.0 ( $\text{C}_6$ ), 166.2 ( $\text{C}=\text{O}$ ) ppm. MS (ESI):  $m/z$  = 282.1 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>.

**Synthesis of 6-[(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)methyl]nicotinic acid (5).** This compound was prepared following a slightly modified procedure with respect to the previously reported.<sup>44</sup> An aqueous solution of LiOH (1.6 M, 10.65 mmol) was added dropwise to a solution of methyl 6-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]nicotinate (1 g, 3.55 mmol) in THF/ $\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1, 13.5 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min and at room temperature for 1.5 h. After this time, the solvent was evaporated under reduced pressure. Final pH adjustment was not performed to avoid the premature removal of the TBS group. Compound 5 was obtained as a white solid (0.75 g, 75% yield). This compound must be readily used because it was observed a partial TBS group removal after a few days of preparation.  $R_f$ : 0.12 AcOEt/ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3(\text{aq})$  (5:1:1).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ):  $\delta$  = 1.66 (s, 15 H, ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>Si, ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 4.55 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.37 (dd,  $J$  = 1.0 and 10.8 Hz, 1 H,  $\text{H}_3$ ), 8.14 (dd,  $J$  = 2.8 and 10.8 Hz, 1 H,  $\text{H}_4$ ), 8.89 (dd,  $J$  = 1.0 and 2.8 Hz, 1 H,  $\text{H}_2$ ) ppm. MS (ESI):  $m/z$  = 266.1 [ $\text{M} - \text{H}$ ]<sup>-</sup>.

**Synthesis of Methyl 6-(chloromethyl)nicotinate.** Methyl 6-(hydroxymethyl)nicotinate (9) (200 mg, 1.19 mmol) was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.5 mL).  $\text{SOCl}_2$  (200  $\mu\text{L}$ , 2.75 mmol) was cautiously added dropwise, and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed by bubbling nitrogen into the crude reaction mixture (gaseous HCl is formed during this process and extreme caution must be taken) and a greenish solid was obtained. This product was suspended in  $\text{Et}_2\text{O}$  (3.5 mL) and stirred for 1 h to give a fine solid which was then filtered, washed with  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 × 5 mL),

and dried under vacuum. Methyl 6-(chloromethyl)nicotinate was obtained as a white solid (188 mg, 85%).  $R_f$ : 0.62 (AcOEt/ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3(\text{aq})$ ; 5:1:1).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 4.04 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.18 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 8.09 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 8.85 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1 H,  $\text{H}_4$ ), 9.24 (s, 1 H,  $\text{H}_2$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 43.6 ( $\text{CH}_2\text{Cl}$ ), 53.2 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 124.3 ( $\text{C}_5$ ), 126.9 ( $\text{C}_3$ ), 141.5 ( $\text{C}_4$ ), 147.2 ( $\text{C}_2$ ), 158.6 ( $\text{C}_6$ ), 163.8 ( $\text{C}=\text{O}$ ) ppm. MS (ESI):  $m/z$  = 185.9 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>. HRMS (ESI): calcd. for  $\text{C}_8\text{H}_8\text{ClNO}_2$  [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup> 186.0316; found 186.0316; calcd. for  $\text{C}_8\text{H}_8\text{ClNO}_2\text{Na}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup> 208.0136; found 208.0131.

**Synthesis of Methyl 6-[(4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyclonon-1-yl)methyl]nicotinate.** Methyl 6-(chloromethyl)nicotinate (95 mg, 0.51 mmol),  $\text{Me}_2\text{TACN}$ -3HBr (7) (205 mg, 0.51 mmol), and anhydrous  $\text{CH}_3\text{CN}$  (12 mL) were mixed. Then,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (409 mg, 3.85 mmol) and TBABr (8.2 mg, 0.025 mmol) were added, and the mixture was heated at reflux under nitrogen for 20 h. After cooling to room temperature, the resulting yellow mixture was filtered. The filter cake was washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 × 5 mL) and the combined filtrates were evaporated under reduced pressure. An aqueous solution of NaOH (1 M, 12 mL) was added to the resulting residue and the mixture was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 × 15 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and the solvent was removed under reduced pressure. Hexane (12 mL) was added to the resulting residue, and the suspension was stirred overnight. The mixture was filtered and the solvent from the yellow filtrates was removed under reduced pressure to yield methyl 6-[(4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyclonon-1-yl)methyl]nicotinate as a pale yellow oil (72.3 mg, 46% yield).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.36 (s, 6 H, N- $\text{CH}_3$ ), 2.65–2.67 (m, 4 H,  $\text{H}_7$  or  $\text{H}_8$ ), 2.76 (s, 4 H,  $\text{H}_9$ ), 2.82–2.84 (m, 4 H,  $\text{H}_7$  or  $\text{H}_8$ ), 3.91 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3.94 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.61 (dd,  $J$  = 8.0 and 0.8 Hz, 1 H,  $\text{H}_3$ ), 8.26 (dd,  $J$  = 8.0 and 2.0 Hz, 1 H,  $\text{H}_4$ ), 9.12 (dd,  $J$  = 2.0 and 0.8 Hz, 1 H,  $\text{H}_2$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 46.9 (N- $\text{CH}_3$ ), 52.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 56.3 ( $\text{C}_7$  or  $\text{C}_8$ ), 57.2 ( $\text{C}_9$ ), 57.3 ( $\text{C}_7$  or  $\text{C}_8$ ), 64.7 ( $\text{CH}_2$ ), 122.9 ( $\text{C}_5$ ), 124.4 ( $\text{C}_3$ ), 137.5 ( $\text{C}_4$ ), 150.4 ( $\text{C}_2$ ), 165.4 ( $\text{C}_6$ ), 166.1 ( $\text{C}=\text{O}$ ) ppm. MS (ESI):  $m/z$  = 307.2 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>. HRMS (ESI): calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_2$  [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup> 307.2129; found 307.2130.

**Synthesis of 6-[(4,7-Dimethyl-1,4,7-triazacyclonon-1-yl)methyl]nicotinic acid (14).** Under ice cooling, an aqueous solution of LiOH (1.6 M, 0.72 mmol) was added dropwise to a solution of methyl 6-[(4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyclonon-1-yl)methyl]nicotinate (75 mg, 0.24 mmol) in THF/ $\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1, 1 mL). The reaction was stirred under ice cooling for 30 min and at room temperature for 4.5 h. After this time, the solvent was removed under reduced pressure to afford 14 (62 mg, 87% yield).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 2.35 (s, 6 H, N- $\text{CH}_3$ ), 2.65–2.68 (m, 4 H,  $\text{H}_7$  or  $\text{H}_8$ ), 2.77–2.79 (m, 4 H,  $\text{H}_7$  or  $\text{H}_8$ ), 2.92 (s, 4 H,  $\text{H}_9$ ), 3.89 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 7.59 (dd,  $J$  = 8.0 and 0.4 Hz, 1 H,  $\text{H}_3$ ), 8.22 (dd,  $J$  = 8.0 and 2.0 Hz, 1 H,  $\text{H}_4$ ), 8.88 (dd,  $J$  = 2.0 and 0.4 Hz, 1 H,  $\text{H}_2$ ) ppm. MS (ESI):  $m/z$  = 293.1 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>. HRMS (ESI): calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2$  [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup> 293.1972; found 293.1961; calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2\text{Na}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup> 315.1791; found 315.1781.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 44.0 (N- $\text{CH}_3$ ), 52.5 ( $\text{C}_7$  or  $\text{C}_8$ ), 53.3 ( $\text{C}_9$ ), 54.5 ( $\text{C}_7$  or  $\text{C}_8$ ), 61.2 ( $\text{CH}_2$ ), 123.7 ( $\text{C}_5$ ), 133.7 ( $\text{C}_3$ ), 139.2 ( $\text{C}_4$ ), 151.4 ( $\text{C}_2$ ), 161.5 ( $\text{C}_6$ ), 179.7 ( $\text{C}=\text{O}$ ) ppm.

**Synthesis of (9*aS*,9*bS*)-5-(Pyrid-2-yl)octahydro-1*H*-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*e*]imidazole (15).** Picolinialdehyde (0.34 mL, 3.56 mmol) was added to a solution of (2*S*,2'*S*)-2,2'-bipyrrrolidine (0.5 g, 3.56 mmol) in dry  $\text{Et}_2\text{O}$  (21 mL). The mixture was stirred overnight under nitrogen at room temperature. A small brown precipitate was formed. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the animal 15 as yellow oil (0.81 g, 99% yield).  $R_f$ : 0.65 AcOEt/ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3(\text{aq})$  (5:1:1).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.59–1.66 (m, 1 H,  $\text{H}_2$ ), 1.70–1.90 (m, 6 H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2'$ , 2 ×  $\text{H}_3$ , 2 ×  $\text{H}_3'$ ), 2.09–2.18 (m, 1 H,  $\text{H}_2'$ ), 2.29–2.34 (m, 1 H,  $\text{H}_4'$ ), 2.56–2.62 (m, 2 H,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_4'$ ), 2.93–2.99 (m, 1 H,  $\text{H}_4$ ), 3.37 (td,  $J$  = 2.2 and 6.8 Hz, 1 H,  $\text{H}_1'$ ), 3.42 (td,  $J$  = 4.8 and 6.8 Hz, 1 H,  $\text{H}_1$ ), 4.87 (s, 1 H, NCHN), 7.16–7.20 (m, 1 H, pyr-4), 7.61–7.64 (m, 1 H, pyr-2), 7.68 (td,  $J$  = 1.8 and 7.8 Hz, 1 H, pyr-3), 8.61–8.63 (m, 1 H, pyr-5) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 24.9, 25.6 ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_3'$ ), 28.9, 30.6 ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_2'$ ), 47.4, 51.9 ( $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_4'$ ), 70.9, 71.1 ( $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_1'$ ), 88.2 (NCHN), 122.2 (pyr-2), 122.5 (pyr-4), 136.3 (pyr-3), 149.5 (pyr-5),

159.2 (pyr-1) ppm. MS (ESI):  $m/z = 230.1 [M + H]^+$ . HRMS (ESI): calcd. for  $C_{14}H_{20}N_3 [M + H]^+$  230.1652; found 230.1651; calcd. for  $C_{14}H_{19}N_3Na [M + Na]^+$  252.1471; found 252.1466.

**Synthesis of (2S,2'S)-1-(Pyrid-2-ylmethyl)-2,2'-bipyrrolidine (8).** The aminal **15** (0.35 g, 1.52 mmol) was dissolved in dry  $CH_3OH$  (18 mL, dried over 4 Å molecular sieves) and placed under nitrogen atmosphere. To this solution was added a suspension of  $NaBH_3CN$  (0.11 g, 1.82 mmol) in dry  $CH_3OH$  (25 mL), followed by dropwise addition of TFA (0.23 mL, 3.05 mmol). The reaction mixture was maintained under stirring at room temperature and progress was monitored by TLC. When the reaction was complete,  $NaOH$  (1 M, 25 mL) was added, and the mixture was stirred for 6 h at room temperature. After this time, the product was extracted with  $CH_2Cl_2$  (5 × 15 mL), and the combined organic layers were dried with anhydrous  $MgSO_4$ . The solvent was evaporated under reduced pressure yielding **8** as yellow oil (0.30 g, 86% yield).  $R_f$ : 0.56  $AcOEt/CH_3OH/NH_3(aq)$  (5:1:1).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 1.37$ – $1.46$  (m, 1 H,  $H_2'$ ),  $1.50$ – $1.60$  (m, 1 H,  $H_2$ ),  $1.69$ – $1.78$  (m, 5 H,  $H_2'$ ,  $2 \times H_3$ ,  $2 \times H_3'$ ),  $1.89$ – $1.96$  (m, 1 H,  $H_2$ ),  $2.33$ – $2.41$  (m, 1 H,  $H_4$ ),  $2.71$ – $2.78$  (m, 1 H,  $H_1$ ),  $2.81$ – $3.01$  (m, 3 H,  $2 \times H_4'$ ,  $H_4$ ),  $3.07$  (q,  $J = 9.7$  Hz, 1 H,  $H_1'$ ),  $3.63$  (d,  $J = 19.1$  Hz, 1 H,  $NCH_2pyr$ ),  $4.29$  (d,  $J = 19.1$  Hz, 1 H,  $NCH_2pyr$ ),  $7.11$ – $7.15$  (m, 1 H, pyr-4),  $7.39$  (d,  $J = 10.2$  Hz, 1 H, pyr-2),  $7.62$  (td,  $J = 2.4$  and  $10.2$  Hz, 1 H, pyr-3),  $8.50$ – $8.52$  (m, 1 H, pyr-5) ppm.  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 23.9$ ,  $24.8$  ( $C_3$ ,  $C_3'$ ),  $28.2$ ,  $28.3$  ( $C_2$ ,  $C_2'$ ),  $46.4$ ,  $55.1$  ( $C_4$ ,  $C_4'$ ),  $62.5$  ( $NCH_2pyr$ ),  $63.9$ ,  $67.9$  ( $C_1$ ,  $C_1'$ ),  $121.8$  (pyr-4),  $122.8$  (pyr-2),  $136.5$  (pyr-3),  $149.0$  (pyr-5),  $160.4$  (pyr-1) ppm. MS (ESI):  $m/z = 232.1 [M + H]^+$ . HRMS (ESI): calcd. for  $C_{14}H_{22}N_3 [M + H]^+$  232.1808; found 232.1828; calcd. for  $C_{14}H_{21}N_3Na [M + Na]^+$  254.1628; found 254.1625.

**Synthesis of the Peptidyl Resin Fmoc-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA.** This peptidyl resin was synthesized manually by the solid-phase method by using standard Fmoc chemistry starting from an MBHA resin (0.56 mmol/g). The resin was washed before its use with  $CH_3OH$  (2 × 1 min), DMF (2 × 1 min),  $CH_2Cl_2$  (3 × 1 min), TFA/ $CH_2Cl_2$  (1:99, 3 × 1 min), DIPEA/ $CH_2Cl_2$  (1:19, 3 × 1 min),  $CH_2Cl_2$  (3 × 1 min), and DMF (6 × 1 min). Coupling of Fmoc-Rink (4 equiv) was mediated by DIPCDI (4 equiv) and Oxyma (4 equiv) in DMF at room temperature for 5 h. Couplings of Fmoc-amino acids (4 equiv) were performed by using DIPCDI (4 equiv) and Oxyma (4 equiv) in DMF at room temperature for 1 h. Completion of the reactions was monitored by the Kaiser test.<sup>45</sup> Fmoc group removal was achieved with a mixture of piperidine/DMF (3:7, 2 + 10 min). After each coupling and deprotection step, the resin was washed with DMF (6 × 1 min) and  $CH_2Cl_2$  (1 × 1 min). An aliquot of the resulting resin was cleaved with TFA/ $H_2O$ /TIS (95:2.5:2.5) while stirring for 2 h at room temperature. Following TFA evaporation and diethyl ether extraction, the crude peptide was dissolved in  $H_2O$  and lyophilized, affording Fmoc-Leu-Lys-Lys-Leu- $NH_2$  (>99% purity).  $t_R = 7.24$  min (method A). MS (ESI):  $m/z = 361.7 [M + 2H]^{2+}$ ,  $722.5 [M + H]^+$ .

**Synthesis of the Peptidyl Resin 10. Conditions a: Conventional Heating.** Resin Fmoc-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA (50 mg) was subjected to Fmoc removal and washes as described above to afford peptidyl resin **6**. This resin was placed in a 5 mL round-bottomed flask. Freshly prepared nicotinic acid derivative **5** (10 equiv), COMU (10 equiv), Oxyma (10 equiv), and DIPEA (20 equiv) were dissolved in NMP (1 mL) by sonication and allowed to react for 10 min. This solution was then added to the resin, and the mixture was heated at 80 °C for 72 h under stirring. Then, the resulting resin **10** was washed with NMP (6 × 1 min),  $CH_3OH$  (6 × 1 min), and  $CH_2Cl_2$  (1 × 1 min).

**Conditions b: Microwave Irradiation.** Resin Fmoc-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA (50 mg) was subjected to Fmoc removal and washes as described above to afford peptidyl resin **6**. This resin was placed in a 15 mL quartz vial containing a magnetic stir bar. Freshly prepared nicotinic acid derivative **5** (10 equiv), COMU (10 equiv), Oxyma (10 equiv), and DIPEA (20 equiv) were dissolved in NMP (1 mL) by sonication and allowed to react for 10 min. This solution was then added to the reaction vial. The sealed vial was heated at 125 °C under microwave irradiation for 1 h. After the reaction time, upon cooling, the solvent was removed and the resulting

resin **10** was washed with NMP (6 × 1 min),  $CH_3OH$  (6 × 1 min), and  $CH_2Cl_2$  (1 × 1 min).

An aliquot of the resulting resin **10** was cleaved with TFA/ $H_2O$ /TIS (95:2.5:2.5) while stirring for 2 h at room temperature. Following TFA evaporation and diethyl ether extraction, the crude was dissolved in  $H_2O$  and lyophilized, affording peptide derivative **11** (81% purity (conditions a),  $t_R = 5.67$  min (method A); 89% purity (conditions b),  $t_R = 5.75$  min (method A)). MS (ESI):  $m/z = 318.2 [M + 2H]^{2+}$ ,  $635.4 [M + H]^+$ .

**Synthesis of the Peptidyl Resin 12.** Peptidyl resin **10** (50 mg) was placed in a syringe and was treated with TBAF (1 M, 664  $\mu$ L) and AcOH (1 M, 20  $\mu$ L) in THF (500  $\mu$ L) under stirring at room temperature for 6 h. After this time, the resin was washed with THF (3 × 1 min),  $CH_3OH$  (3 × 1 min), NMP (3 × 1 min),  $CH_2Cl_2$  (3 × 1 min), and THF (1 × 1 min). The resulting resin was then treated with a solution of LiCl (10 equiv), TsCl (2 equiv), and DIPEA (3 equiv) in THF (1 mL). The reaction mixture was shaken for 8 h at room temperature. This treatment was performed three times. Between treatments and at the end of the reaction, the resin was washed with THF (3 × 1 min),  $CH_3OH$  (3 × 1 min),  $H_2O$  (6 × 1 min), and  $CH_2Cl_2$  (3 × 1 min). An aliquot of the resulting resin **12** was cleaved with TFA/ $H_2O$ /TIS (95:2.5:2.5) while stirring for 2 h at room temperature. Following TFA evaporation and diethyl ether extraction, the crude was dissolved in  $H_2O$  and lyophilized, affording peptide derivative **13** (74% purity).  $t_R = 17.36$  min (method B). MS (ESI):  $m/z = 327.2 [M + 2H]^{2+}$ ,  $653.4 [M + H]^+$ .

**Synthesis of the Metal Binding Peptide Conjugate 3.** Peptidyl resin **6** (50 mg) was placed in a 5 mL round-bottomed flask. Then, a solution of **14** (42 mg, 5 equiv), Oxyma (20 mg, 5 equiv), COMU (60 mg, 5 equiv), and DIPEA (48  $\mu$ L, 10 equiv) in NMP was added. The mixture was heated at 80 °C for 48 h. After this time, the resin was washed with NMP (6 × 1 min),  $CH_3OH$  (6 × 1 min), and  $CH_2Cl_2$  (1 × 1 min). Acidolytic cleavage and extractions afforded the trifluoroacetate salt of the metal binding peptide **3**<sub>TFA</sub>. Next, **3**<sub>TFA</sub> was purified and basified by flash column chromatography using  $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_3(aq)$  (200:20:2) as mobile phase. The amount of  $NH_3(aq)$  was gradually increased up to  $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_3(aq)$  (200:20:5). Fractions containing the desired compound were combined, and the solvent was removed under reduced pressure providing the free amine metal binding peptide **3** (>99% purity).  $t_R = 6.12$  min (method A).  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD+D_2O$ ):  $\delta = 0.75$ – $0.89$  (m, 12 H,  $4 \times CH_3(\delta)$ -Leu),  $1.29$ – $1.77$  (m, 18 H),  $2.52$  (s, 6 H),  $2.62$ – $2.77$  (m, 12 H),  $2.89$ – $2.92$  (m, 4 H),  $3.94$  (s, 2 H),  $4.18$ – $4.28$  (m, 4 H),  $7.39$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H,  $H_2$ ),  $8.13$  (dd,  $J = 2.2$  and  $8.2$  Hz, 1 H,  $H_4$ ),  $8.93$  (d,  $J = 2.2$  Hz, 1 H,  $H_4$ ) ppm. MS (ESI):  $m/z = 387.8 [M + 2H]^{2+}$ ,  $774.6 [M + H]^+$ . HRMS (ESI): calcd. for  $C_{39}H_{73}N_{11}O_5 [M + 2H]^{2+}$  387.7893; found 387.7884; calcd. for  $C_{39}H_{72}N_{11}O_5 [M + H]^+$  774.5712; found 774.5701.

**Synthesis of the Metal Binding Peptide Conjugate 4.** A 15 mL quartz vial containing a magnetic stir bar was charged with peptidyl resin **12** (50 mg). Then, a solution of **8** (13.5 mg, 2 equiv), NaI (0.2 mg, 0.04 equiv) and DIPEA (120  $\mu$ L, 24 equiv) in NMP was added to the reaction vial. The sealed vial was heated at 125 °C under microwave irradiation for 1 h. After the reaction time, upon cooling, the solvent was removed and the resulting resin was washed with NMP (6 × 1 min),  $CH_3OH$  (6 × 1 min), and  $CH_2Cl_2$  (1 × 1 min). The resulting resin was cleaved with TFA/ $H_2O$ /TIS (95:2.5:2.5) while stirring for 2 h at room temperature. Following TFA evaporation and diethyl ether extraction, the crude was dissolved in  $H_2O$  (5 mL) and extracted with  $CH_2Cl_2$  (6 × 3 mL). The aqueous phase was then lyophilized, affording the metal binding peptide **4**<sub>TFA</sub>. Reverse-phase column chromatography eluting with  $H_2O/CH_3CN$  (89:11) afforded pure **4**<sub>TFA</sub> (>99% purity).  $t_R = 5.77$  min (method A). Next, **4**<sub>TFA</sub> was dissolved in  $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_3(aq)$  (200:20:2). Flash column chromatography was performed using  $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_3(aq)$  (200:20:2) as the mobile phase. The amount of  $NH_3(aq)$  was gradually increased up to  $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_3(aq)$  (200:20:5). Fractions containing the desired compound were combined, and the solvent was removed under reduced pressure providing the free amine metal binding peptide **4**.  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD+D_2O$ ):  $\delta = 0.90$ –



1.02 (m, 12 H, 4 × CH<sub>3</sub>(δ)-Leu), 1.28–1.89 (m, 24 H), 2.24–2.33 (m, 2 H), 2.76 (t, *J* = 7.3 Hz, 4 H, 2 × CH<sub>2</sub>(ε)-Lys), 2.98–3.25 (m, 4 H), 3.54–3.62 (m, 2 H), 4.17–4.40 (m, 8 H), 7.25–7.28 (m, 1 H, H<sub>c</sub>), 7.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H<sub>d</sub>), 7.60 (d, *J* = 8 Hz, 1 H, H<sub>e</sub>), 7.74–7.78 (m, 1 H, H<sub>f</sub>), 8.19 (d, *J* = 8 Hz, 1 H, H<sub>g</sub>), 8.39–8.40 (m, 1 H, H<sub>d</sub>), 8.87 (s, 1 H, H<sub>a</sub>) ppm. MS (ESI): *m/z* = 424.7 [M + 2H]<sup>2+</sup>, 848.6 [M + H]<sup>+</sup>. HRMS (ESI): calcd. for C<sub>45</sub>H<sub>75</sub>N<sub>11</sub>O<sub>5</sub> [M + 2H]<sup>2+</sup> 424.7971; found 424.7974; calcd. for C<sub>45</sub>H<sub>74</sub>N<sub>11</sub>O<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup> 848.5869; found 848.5882.

**Synthesis of Metallotetrapeptide 1<sub>Zn</sub>** [Zn(OTf)<sub>2</sub>(<sup>Me2</sup>PyTACN)-LKLL-NH<sub>2</sub>]. A solution of Zn(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (4.70 mg, 0.012 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (0.5 mL) was added dropwise to a vigorously stirred solution of the metal binding peptide 3 (10 mg, 0.012 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (1 mL). After a few seconds, the cloudy solution became completely brown and clear. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h. After this time, the solution was filtered through Celite, and diethyl ether (25 mL) was added upon which a precipitate was formed. In a few days, the solvent was decanted and the solid was dried in vacuo to give the metalloprotein 1<sub>Zn</sub> as a light brown powder (9.7 mg, 66% yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD+D<sub>2</sub>O): δ = 0.73–0.86 (m, 12 H, 4 × CH<sub>3</sub>(δ)-Leu), 1.32–1.73 (m, 18 H), 2.20–2.30 (m, 2 H), 2.47 (s, 6 H), 2.68–2.80 (m, 12 H), 2.97–3.01 (m, 2 H), 4.16–4.24 (m, 6 H), 7.54 (d, *J* = 8.0, 1 H, H<sub>c</sub>), 8.34 (d, *J* = 2.0 and 8.0 Hz, 1 H, H<sub>d</sub>), 9.04 (bs, 1 H, H<sub>e</sub>) ppm. HRMS (ESI): calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>73</sub>ClN<sub>11</sub>O<sub>5</sub>Zn [M - (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + Cl + 2H]<sup>3+</sup> 292.1577; found 292.1596; calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>73</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>11</sub>O<sub>5</sub>ZnS [M - CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> + Cl + 2H]<sup>2+</sup> 511.7143; found 511.7148.

**Synthesis of Metallotetrapeptide 1<sub>Cu</sub>** [Cu(OTf)<sub>2</sub>(<sup>Me2</sup>PyTACN)-LKLL-NH<sub>2</sub>]. The same protocol described for 1<sub>Zn</sub> was followed but using a solution of Cu(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (4.67 mg, 0.012 mmol). 1<sub>Cu</sub> was obtained as a light blue powder (10.8 mg, 74% yield). HRMS (ESI) calcd for C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>ClCuF<sub>6</sub>N<sub>11</sub>O<sub>5</sub> [M - (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + Cl]<sup>+</sup> 871.4570; found 871.4575; calcd for C<sub>40</sub>H<sub>71</sub>CuF<sub>3</sub>N<sub>11</sub>O<sub>5</sub>S [M - CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 985.4418; found 985.4420; calcd for C<sub>41</sub>H<sub>72</sub>CuF<sub>6</sub>N<sub>11</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub> [(M + H)<sup>+</sup>]: 1135.4013; found 1135.4015.

**Synthesis of Metallotetrapeptide 2<sub>Zn</sub>** [Zn(OTf)<sub>2</sub>(BPBP)-LKLL-NH<sub>2</sub>]. The same protocol described for 1<sub>Zn</sub> was followed, but using the metal binding peptide 4 (10 mg, 0.011 mmol). 2<sub>Zn</sub> was obtained as a light brown powder (9.1 mg, 64% yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD +D<sub>2</sub>O): δ = 0.90–1.04 (m, 12 H, 4 × CH<sub>3</sub>(δ)-Leu), 1.45–2.21 (m, 26 H), 2.45–2.53 (m, 2 H), 2.76–2.83 (m, 2 H), 2.86–2.95 (m, 4 H, 2 × CH<sub>2</sub>(δ)-Lys), 3.11–3.14 (m, 2 H), 4.16–4.42 (m, 6 H), 4.57 (bb), 7.59 (d, *J* = 8 Hz, 1 H, H<sub>c</sub>), 7.62–7.66 (m, 1 H, H<sub>c</sub>), 7.68 (d, *J* = 8.2, 1 H, H<sub>c</sub>), 8.12 (dt, *J* = 1.5 and 7.8 Hz, 1 H, H<sub>d</sub>), 8.49 (dd, *J* = 2.0 and 8.2 Hz, 1 H, H<sub>d</sub>), 8.79 (d, *J* = 4.9 Hz, 1 H, H<sub>d</sub>), 9.20 (bb, 1 H, H<sub>e</sub>) ppm. HRMS (ESI): calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>75</sub>F<sub>3</sub>N<sub>11</sub>O<sub>8</sub>SZn [M - CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> + 2H]<sup>3+</sup> 354.1583; found 354.1580; calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>74</sub>F<sub>3</sub>N<sub>11</sub>O<sub>8</sub>SZn [M - CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> + H]<sup>2+</sup> 530.7338; found 530.7324; calcd. for C<sub>47</sub>H<sub>75</sub>F<sub>6</sub>N<sub>11</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub>Zn [M + 2H]<sup>2+</sup> 605.7137; found 605.7141.

**Synthesis of Metallotetrapeptide 2<sub>Cu</sub>** [Cu(OTf)<sub>2</sub>(BPBP)-LKLL-NH<sub>2</sub>]. The same protocol described for 1<sub>Zn</sub> was followed but using a solution of Cu(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (4.67 mg, 0.011 mmol) and the metal binding peptide 4 (10 mg, 0.011 mmol). 2<sub>Cu</sub> was obtained as a light blue powder (9.3 mg, 65% yield). HRMS (ESI): calcd. for C<sub>45</sub>H<sub>74</sub>CuN<sub>11</sub>O<sub>5</sub> [M - (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + H]<sup>3+</sup> 303.8385; found 303.8403; calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>74</sub>CuF<sub>3</sub>N<sub>11</sub>O<sub>8</sub>S [M - CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> + H]<sup>2+</sup> 530.2340; found 530.2360; calcd. for C<sub>47</sub>H<sub>75</sub>CuF<sub>6</sub>N<sub>11</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub> [M + 2H]<sup>2+</sup> 605.2139; found 605.2161.

**DNA Binding Assays.** The competition assay was undertaken with fixed DNA and competitor (EB) concentrations and variable conjugates. Fluorescence measurements were performed on a Varian Cary Eclipse spectrofluorophotometer using a 1 cm quartz cell at room temperature. The DNA–EB complexes were excited at 546 nm, and the fluorescence was measured at 595 nm. To the solution of EB and DNA (10 mM Tris pH 7.2, 1.3 μM EB, and 3.9 μM DNA) were added aliquots of a 1 mM stock solution of the conjugates and the fluorescence was measured after each addition until the fluorescence was reduced to 50%. The apparent binding constants (*K*<sub>app</sub>) for conjugates were calculated from *K*<sub>EB</sub> × [EB] = *K*<sub>app</sub> × [drug], where [EB] is the concentration of EB (1.3 μM), [drug] is the concentration

of conjugates at a 50% reduction of fluorescence and *K*<sub>EB</sub> is known (*K*<sub>EB</sub> = 1 × 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> for ct-DNA; 9.5 × 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> for poly(dA-dT)<sub>2</sub>, and 9.9 × 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> for poly(dG-dC)<sub>2</sub>).<sup>46</sup>

**DNA Cleavage Experiments.** DNA cleavage studies were monitored by agarose gel electrophoresis. The pUC18 plasmid DNA was used at concentration of 0.5 μg μL<sup>-1</sup> (1512 μM nucleotides; 756 μM bp). Stock solutions were freshly prepared in milli-Q water. Reactions were performed by mixing 0.5 μL of supercoiled pUC18 DNA, appropriate aliquots of ligand, metal binding peptide conjugate or metal salt concentration and 1 μL of solution of sodium L-ascorbate (1.96 mM) in a 1.5 fold excess relative to the compound concentration (when required). Solution of sodium L-ascorbate was freshly prepared prior to each experiment. Then, appropriate amount of Cacodylate buffer (0.1 M, pH 6) or TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) was added to complete 20 μL total volume. The final concentrations of pUC18 DNA was 37.8 μM in nucleotides (18.9 μM bp). The samples were incubated at 37 °C during the appropriate time. Then, the reactions were quenched by adding a buffer solution (6 μL) consisting of bromophenol blue (0.25%), xylene cyanol (0.25%), and glycerol (30%) and loaded on 0.8% agarose gel in 0.5 × TBE buffer (0.045 M Tris, 0.045 M boric acid and 1 mM EDTA) at 125 V for 1.5 h. Afterward, the agarose gel was revealed with an ethidium bromide (10 mg/mL in TBE) for 30 min and the bands were visualized on a capturing system (ProgRes CapturePro 2.7). To test the presence of reactive oxygen species (ROS) and to explore the DNA interaction sites, different scavengers and groove binders were added to the reaction mixtures. The ROS scavengers used were Tiron (10 mM) and DMSO (3 μL). To explore the possible selectivity of DNA cleavage, the major groove binder methyl green (20 μM) and the minor groove binder Hoechst (20 μM) were included in the reaction mixtures. ROS scavengers and groove binders were freshly prepared prior to each experiment. Samples were treated as described above. The proportion of different forms of pUC18 plasmid DNA was analyzed by comparing the relative intensity of each band by the total intensities of all bands in the lane using software ImageJ. All experiments were performed at least twice.

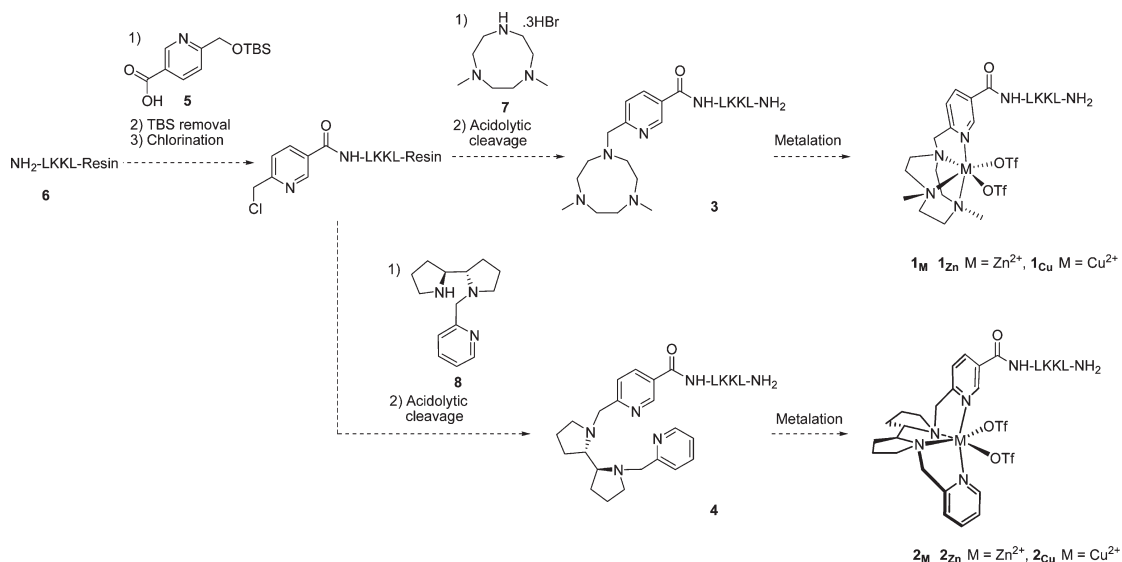
**DNA Kinetics.** The kinetic studies of the DNA cleavage were performed with plasmid pUC18, which was incubated at 37 °C with 1<sub>Cu</sub> 2<sub>Cu</sub> [Cu(PyTACN)]<sup>2+</sup> and [Cu(BPBP)]<sup>2+</sup> (15 μM, 1.5-fold excess of sodium L-ascorbate). Samples were treated as described above, aliquots were taken at specific times, and quenched by placing them on ice and adding a buffer solution (6 μL) consisting of bromophenol blue (0.25%), xylene cyanol (0.25%), and glycerol (30%).<sup>47</sup> Time-dependent concentrations of supercoiled (Form I) and nicked DNA (Form II) were fit to a first-order consecutive model defined by eq 1 where *C* corresponds to the respective % plasmid DNA form at time *t* (min), *C*<sub>0</sub> corresponds to the initial concentration of plasmid DNA and *k*<sub>obs</sub> corresponds to the observed first-order rate constant (expressed as min<sup>-1</sup>). All kinetic experiments were performed at least in triplicate.

$$C = C_0 \exp(-k_{\text{obs}} t) \quad (1)$$

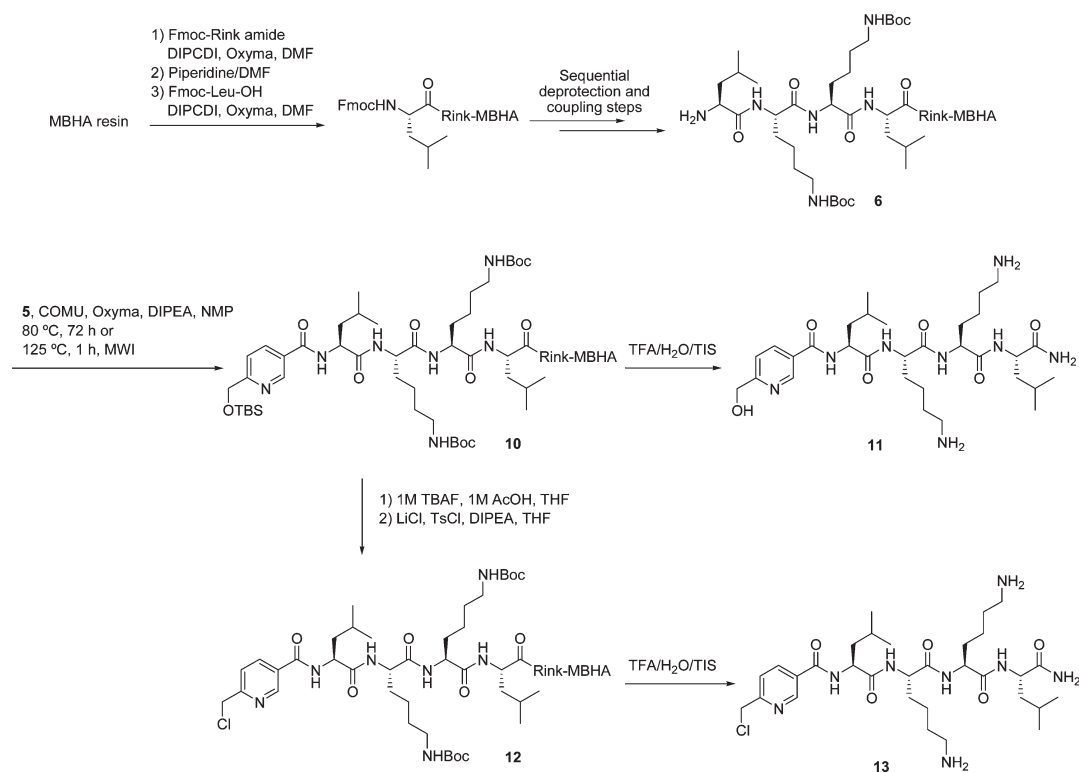
**Cleavage of 158bp Fragment.** Supercoiled pSP73 plasmid was digested with *Nde* I restriction endonuclease and 3'-end-labeled by treatment with Klenow exo<sup>-</sup> and [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-deoxy-ATP. After radioactive labeling, the DNA first cleaved with *Nde* I was still digested with *Hind* III to yield a 158 and 2306 base pair fragments. The 158 bp fragment was purified by 1% agarose gel electrophoresis and isolated from the gel by Promega Wizard SV Gel cleanup system.

A 9 μL solution containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) or 50 mM sodium cacodylate (pH 6), DNA (2.5 × 10<sup>-4</sup> M per base), and desired conjugate was incubated for 15 min at room temperature. Cleavage was initiated by the addition of 1 μL of 1 mM sodium L-ascorbate and allowed to react for 1 h at 37 °C. An aliquot of 1.5 μL of 3 M sodium acetate buffer (pH 5.2) and 0.1 mM EDTA were then added, and samples were precipitated with 150 μL of ethanol. Pellets were rinsed twice with 150 μL of ethanol, lyophilized, and resuspended in a formamide loading buffer. DNA cleavage products were resolved by polyacrylamide (PAA) gel electrophoresis under denaturing conditions (13%/8 M urea PAA gel).

Scheme 1. Synthetic Strategy for the Preparation of the Metallotetrapeptides  $1_M$  and  $2_M$



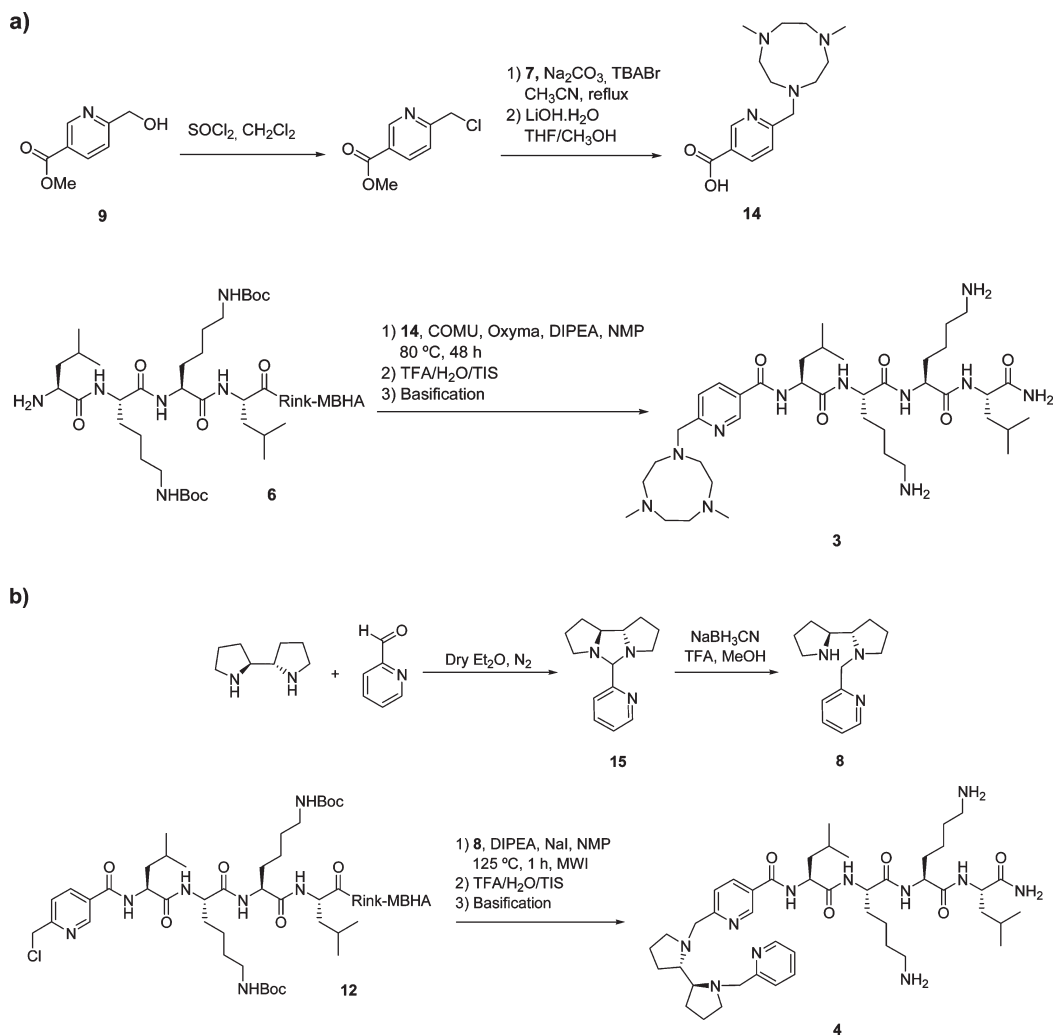
Scheme 2. Synthesis of the Peptidyl Resin **12**



**Cell Lines.** Human MCF-7 breast cancer and CAPAN-1 pancreatic cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). 1BR3G transformed human

skin fibroblasts were from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Porton, UK). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum

Scheme 3. (a) Synthesis of the Metal Binding Peptide Conjugate 3 and (b) Synthesis of the Metal Binding Peptide Conjugate 4



and 100 U/mL penicillin-streptomycin, all from GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA), at 37 °C under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

**Cytotoxicity Assays.** The cytotoxic activity of the compounds in MCF-7, CAPAN-1, and 1BR3G cells was determined by the MTT reduction assay. Aliquots of 5000 1BR3G cells, 6000 MCF-7 cells, or 10 000 CAPAN-1 cells were seeded onto flat-bottomed 96-well plates. 24 h later, the cells were treated for 48 h with the compounds at concentrations ranging from 0 to 100 μM. After removal of the treatment, the cells were washed with PBS and incubated for 2 additional hours with 100 μL of fresh culture medium together with 10 μL of MTT (Sigma-Aldrich). The medium was discarded and DMSO (Sigma-Aldrich) was added to each well to dissolve the purple formazan crystals. Plates were agitated at room temperature for 2 min and the absorbance of each well was determined with an absorbance microplate reader (ELx800, BioTek, Winooski, USA) at a wavelength of 570 nm. Three replicates for each treatment were tested. The cell viability was determined as a percentage of the control untreated cells, by dividing the mean absorbance of each treatment by the mean absorbance of the untreated cells. The concentration that reduces by

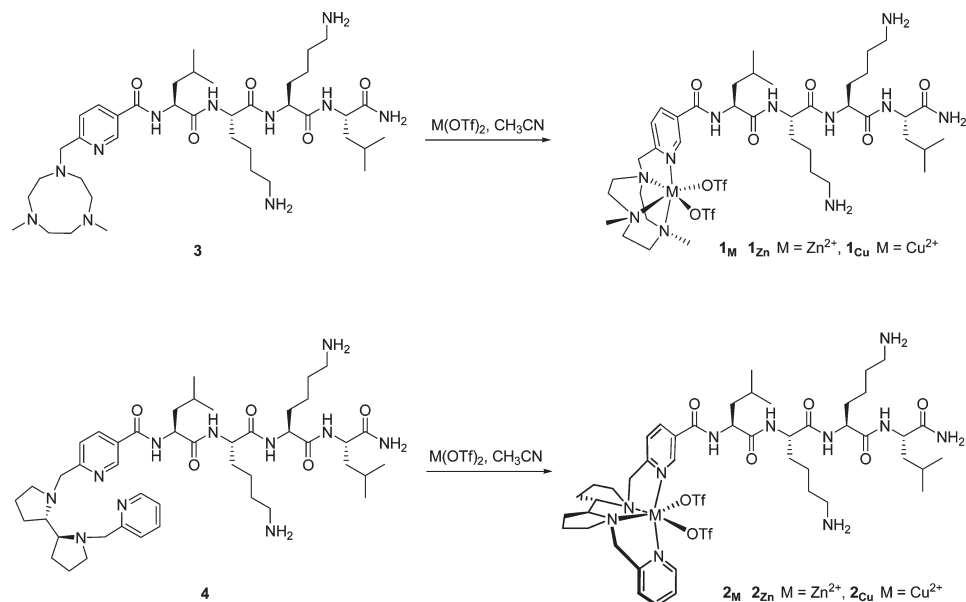
50% the cell viability (IC<sub>50</sub>) was established for each compound using a four-parameter curve fit (Gen5 Data Analysis Software, BioTeck).

**Hemolysis.** The hemolytic activity of the compounds at 25, 100, and 150 μmol/L was evaluated by determining hemoglobin release from erythrocyte suspensions of fresh human blood (5% vol/vol) as previously described.<sup>45</sup>

## RESULTS AND DISCUSSION

The synthesis of the metallotetrapeptides of general structure **1<sub>M</sub>** and **2<sub>M</sub>**, containing the Me<sub>2</sub>PyTACN and (*S,S'*)-BPBP ligands, respectively, was planned through the solid-phase synthesis of the corresponding metal binding peptide conjugate **3** or **4** and subsequent metalation in solution (Scheme 1). These metal binding peptide conjugates were prepared following a synthetic strategy adapted from a previous work<sup>43,44</sup> and involved: (i) attachment of the nicotinoyl derivative **5** to the N-terminus of the tetrapeptidyl resin **6**, (ii) *tert*-butyldimethylsilyl (TBS) group removal, (iii) chlorina-

Scheme 4. Synthesis of the Metallotetrapeptides  $1_M$  and  $2_M$



tion, and (iv) alkylation with the corresponding secondary amine 7 or 8.

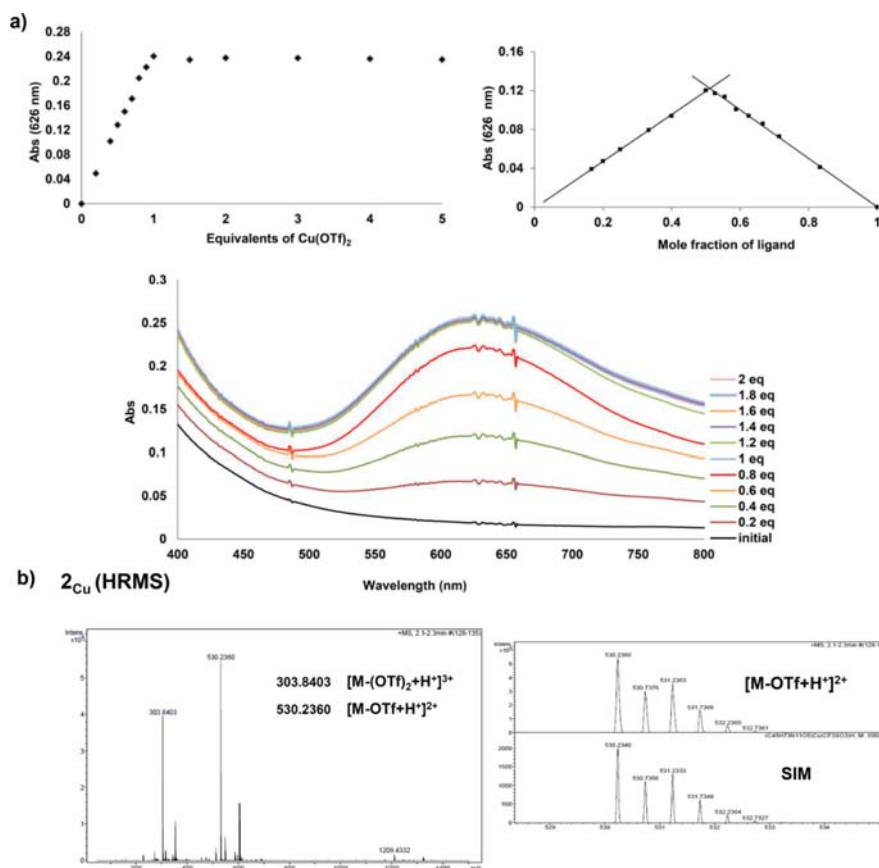
**Solid-Phase Synthesis of the Metal Binding Peptides 3 and 4.** We first studied the synthesis of the metal binding peptide 3. A 4-methylbenzhydrylamine (MBHA) polystyrene resin was used as solid support. After Fmoc-Rink linker coupling with *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) and ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate (Oxyrna) in DMF, the tetrapeptidyl resin 6 was prepared following a 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)/*tert*-butyl (*t*Bu) strategy by sequential deprotection and coupling steps under standard conditions (Scheme 2). Fmoc group was removed by treatment with piperidine/NMP (3:7), and couplings of the conveniently protected Fmoc-amino acids were mediated by DIPCDI and Oxyrna in DMF.

With the peptidyl resin 6 in hand, we set out to examine the conjugation of the nicotinoyl derivative 5 (Scheme 2). This compound was prepared from the commercially available dimethylpyridine-2,5-dicarboxylate through selective reduction of the ester at position 2 affording methyl 6-(hydroxymethyl)nicotinate (9). Subsequent protection of the primary alcohol with a *tert*-butyldimethylsilyl (TBS) group and saponification of the methyl ester provided 5 in 52% overall yield. The conjugation of 5 to the peptidyl resin 6 was optimized under conventional heating and under microwave irradiation. Using the former method, best conditions involved treatment of 6 with the nicotinoyl derivative 5 (10 equiv), 1-[(1-(cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneamino)oxy) dimethylaminomorpholino] uronium hexafluorophosphate (COMU) (10 equiv), Oxyrna (10 equiv), and *N,N'*-diisopropylethylamine (DIPEA) (20 equiv) in NMP at 80 °C for 72 h. Cleavage of an aliquot of the resulting peptidyl resin 10 with trifluoroacetic acid (TFA)/H<sub>2</sub>O/triisopropylsilane (TIS) yielded the expected peptide derivative 11 in 81% purity. The use of the same reaction

conditions under microwave irradiation at 125 °C reduced the reaction time to 1 h, leading to 11 in 89% purity.

After successful incorporation of the nicotinoyl derivative 5, the silyl ether group was converted into chloride in two steps (Scheme 2). Thus, resin 10 was treated with a mixture of 1 M tetrabutylammonium fluoride (TBAF) and 1 M AcOH in THF for 6 h to remove the TBS group. Chlorination of the resulting hydroxyl group was carried out with LiCl (10 equiv), *p*-toluenesulfonyl chloride (TsCl) (2 equiv), and DIPEA (3 equiv) in THF for 8 h. This treatment was performed three times to ensure complete conversion to the chloride. Success of these two steps was confirmed by HPLC and ESI-MS analysis of the crude reaction mixture obtained after acidolytic cleavage of an aliquot of the resulting resin 12. Peptide derivative 13 was obtained in 74% purity.

Next, we attempted the *N*-alkylation of resin 12 with Me<sup>2</sup>TACN (7) under microwave irradiation at 125 °C for 1 h. After acidolytic cleavage, NMR analysis showed that the trifluoroacetate salt of the metal binding peptide 3 (3<sub>TFA</sub>) was obtained together with a byproduct that could not be identified. Thus, an alternative route was assayed in order to obtain 3 in higher purity which was based on the coupling of 6-[(4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyclonon-1-yl)methyl]nicotinic acid (14) to the tetrapeptidyl resin 6 (Scheme 3a). The nicotinic acid derivative 14 was prepared through chlorination of 9, alkylation with the secondary amine 7, and final saponification. Thus, 14 was obtained in 34% overall yield and was characterized by ESI-MS, HRMS and NMR. Next, the coupling of compound 14 (5 equiv) to peptidyl resin 6 was mediated by COMU (5 equiv), Oxyrna (5 equiv) and DIPEA (10 equiv) in NMP at 80 °C for 48 h. After acidolytic cleavage and basification by column chromatography eluting with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>3(aq)</sub>, the metal binding peptide 3 was obtained in >99% purity. The effectiveness of the removal of trifluoroacetate counterions was checked by <sup>19</sup>F-NMR (see Figures S18 and S19 in the



**Figure 1.** (a) UV–vis spectrophotometric titration of the metal binding peptide **4** (2 mM) with  $\text{Cu}(\text{OTf})_2$  (40 mM) in  $\text{CH}_3\text{OH}$  at 25 °C. Job's plot of absorbance at 626 nm verifies the 1:1 stoichiometry between **4** and  $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ . (b) Observed HRMS for  $2\text{Cu}$  with the theoretical isotopic patterns. Full spectra are collected in the Supporting Information.

SI). Compound **3** was fully characterized by ESI-MS, HRMS, and NMR.

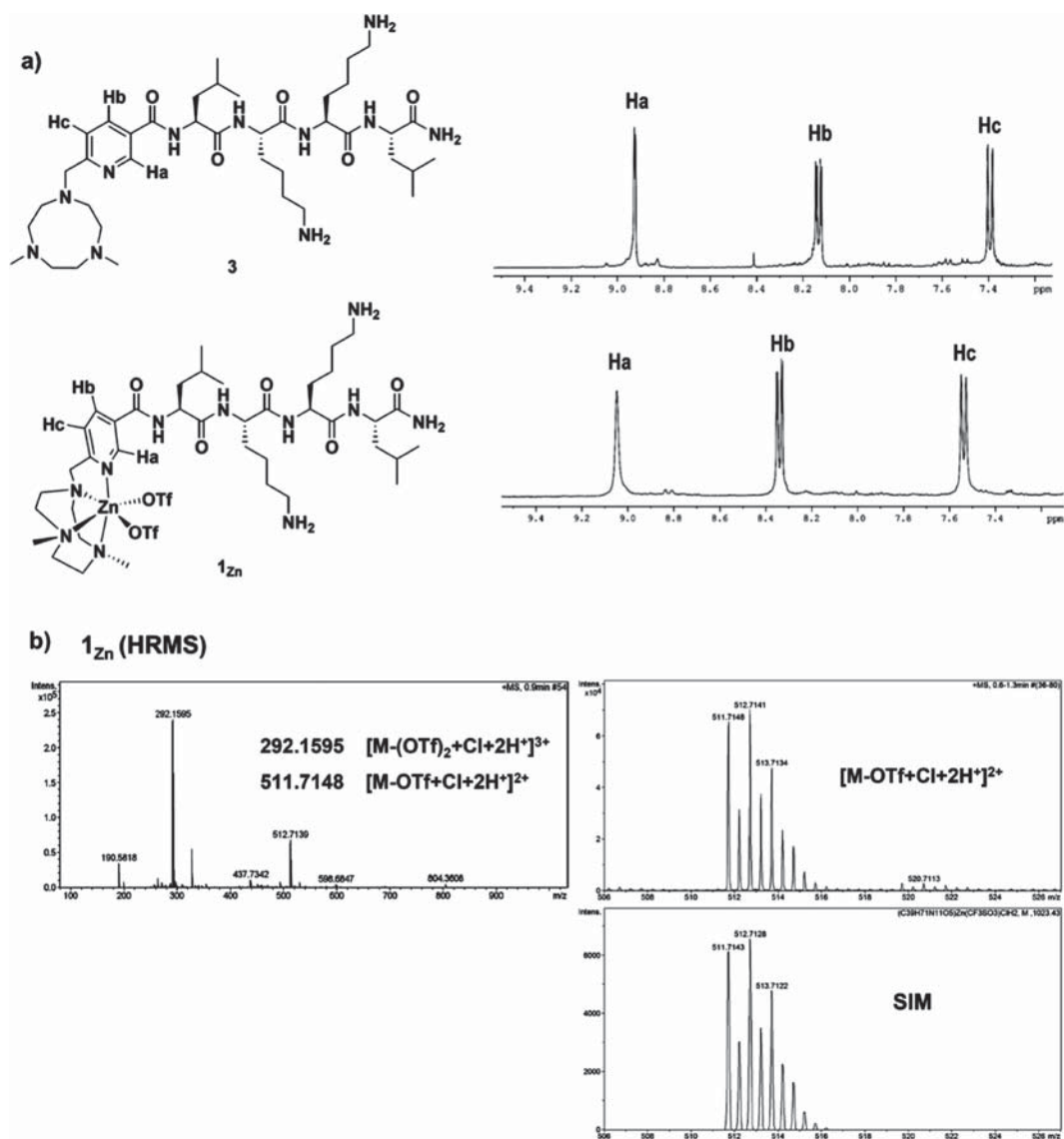
The synthesis of the metal binding peptide **4** was assayed by alkylation of the peptidyl resin **12** with the secondary amine **8** under microwave irradiation at 125 °C for 1 h. (Scheme 3b). Compound **8** was prepared by first reacting (*S,S'*)-bipyrrrolidine with picolylaldehyde followed by reduction of the amination **15** with  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  in the presence of TFA in  $\text{CH}_3\text{OH}$ , and was obtained in 85% overall yield.<sup>49</sup> Alkylation of resin **12** with **8** and subsequent acidolytic cleavage and basification afforded **4** in >99% purity. Analysis by ESI-MS, HRMS, and NMR showed the presence of the expected metal binding peptide.

**Synthesis of the Metallotetrapeptides  $1_M$  and  $2_M$ .** Once we obtained aminopyridine peptide conjugates **3** and **4**, we assayed their binding to metal triflates salts (zinc and copper, Scheme 4). Reactions were carried out by dissolving **3** or **4** in  $\text{CH}_3\text{CN}$  followed by addition of a solution of the corresponding metal triflate in  $\text{CH}_3\text{CN}$ . The mixture was stirred at room temperature for 5 h. Subsequent filtration through Celite and precipitation with diethyl ether yielded metallotetrapeptides  $1_M$  and  $2_M$  as powders which were characterized by HRMS.

**Characterization of the Metallotetrapeptides  $1_M$  and  $2_M$ .** Metalloproteins  $1_{\text{Cu}}$ ,  $1_{\text{Zn}}$ ,  $2_{\text{Cu}}$ , and  $2_{\text{Zn}}$  were characterized by high resolution mass spectrometry, UV–vis and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, when possible.

First, the stoichiometry of the reaction between metal binding peptide conjugate **4** and  $\text{Cu}(\text{II})$  was studied by performing a UV–vis spectrophotometric titration. Sequential addition of 0.2 equiv of  $\text{Cu}(\text{OTf})_2$  to a solution of **4** in  $\text{CH}_3\text{OH}$  revealed that a maximum absorbance at 626 nm, characteristic of the  $\text{Cu}^{2+}$  d-d transition, was reached upon addition of 1 equiv of the metal salt (Figure 1). The formation of  $2_{\text{Cu}}$  was clearly appreciable by the blue color of the solution. Further addition of  $\text{Cu}(\text{OTf})_2$  up to 5 equiv did not elicit changes in the maximum absorbance. In addition, in order to further ensure the role of the tetradentate ligand as unique metal binding site, a titration of the Fmoc deprotected tetrapeptide (devoid of the tetradentate ligand) with  $\text{Cu}(\text{OTf})_2$  was performed. No significant absorbance was observed in the UV–vis spectrum. The sum of the experiments strongly suggests that Lys side chains are excluded from metal coordination and the chelation occurs only with the (*S,S'*)-BPBP ligand located at the N-terminus of the peptide. Furthermore, Job plot of absorbance at  $\lambda_{\text{max}}$  of the titration vs the mole fraction of **4** confirmed the 1:1

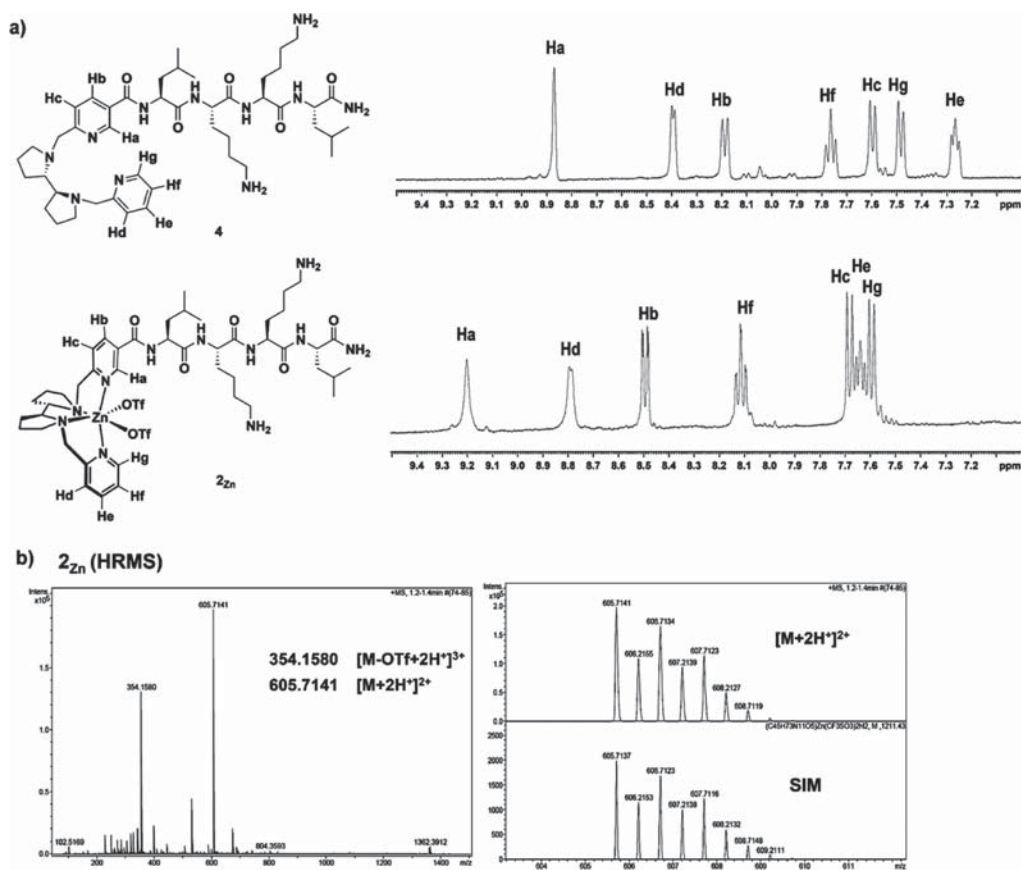




**Figure 2.** (a) <sup>1</sup>H NMR (selected aromatic region, CD<sub>3</sub>OD) of **3** and metallopeptide **1<sub>Zn</sub>**. (b) HRMS for **1<sub>Zn</sub>** with the theoretical isotopic patterns. Full spectra analyses are collected in the [Supporting Information](#).

complexation stoichiometry. On the other hand, metal binding to **3** was also investigated by UV–vis, supporting also the 1:1 complexation stoichiometry to form **1<sub>Cu</sub>** (Figure S20). UV–vis spectrophotometric titrations for the formation of **1<sub>Cu</sub>** and **2<sub>Cu</sub>** showed a linear correlation between the absorbance of their respective d-d band and the amount of Cu(OTf)<sub>2</sub> added. This linearity demonstrates that **3** and **4** bind Cu<sup>2+</sup> ions with a high binding constant (*K<sub>a</sub>*), for which a lower limit of 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> is deduced. Therefore, we conclude that the cationic nature of the peptide does not decrease the binding ability of the polyamine ligand, at least to a detectable level reachable by the UV–vis titrations.

Finally, the HRMS spectrum of **2<sub>Cu</sub>** showed cluster ions at *m/z* 605.2161 and 530.2360 with isotopic patterns that can be assigned to [M+2H<sup>+</sup>]<sup>2+</sup> and [M-OTf+H<sup>+</sup>]<sup>2+</sup> ions (Figure 1 and SI). Likewise, the HRMS spectrum of **1<sub>Cu</sub>** also displayed cluster ions at *m/z* 985.4420 and 871.4575 with isotopic patterns consistent with [M-OTf]<sup>+</sup> and [M-(OTf)<sub>2</sub>+Cl]<sup>+</sup> formulation (Figure S20 and SI). Peaks that could be assigned to Cu:metallopeptide stoichiometries different from 1:1 were not observed in the spectra, further confirming the proposal derived from UV–vis titrations, that each peptide molecule binds a single metal ion, at the aminopyridine site.



**Figure 3.** (a)  $^1\text{H}$  NMR (selected aromatic region,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ) of **4** and metallopeptide  $2_{\text{Zn}}$ . (b) HRMS for  $2_{\text{Zn}}$  with the theoretical isotopic patterns. Full spectra analyses are collected in the [Supporting Information](#).

Binding of  $\text{Zn}(\text{II})$  to **3** and **4** to respectively form  $1_{\text{Zn}}$  and  $2_{\text{Zn}}$  could be investigated by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy owing to the diamagnetic nature of this ion (Figure 2 and Figure 3). Addition of 1 equiv of  $\text{Zn}(\text{OTf})_2$  to **3** resulted in the formation of the metal complex  $1_{\text{Zn}}$  as shown clearly from the characteristic changes observed by NMR. A downfield shift of the three protons corresponding to the pyridine signals ( $\delta_{\text{HPyr}3}$  from 7.3 to 7.5 ppm,  $\delta_{\text{HPyr}4}$  from 8.1 to 8.3 ppm and  $\delta_{\text{HPyr}6}$  from 8.9 to 9.1 ppm) was noticed (Figure 2). Moreover, the singlet corresponding to the benzyl type methylene also shifted from 3.9 to 4.2 ppm supporting that pyridine and  $\text{Me}^2\text{pyTACN}$  are involved in the metal chelation. Further characterization of  $1_{\text{Zn}}$  was obtained by HRMS, which showed cluster ions at  $m/z$  511.7148 and 292.1596 with isotopic patterns that could be assigned to  $[\text{M}-\text{OTf}+\text{Cl}+2\text{H}^+]^{2+}$  and  $[\text{M}-\text{OTf}+\text{Cl}+2\text{H}^+]^{3+}$  ions, that confirm the formulation (Figure 2 and SI). Binding of  $\text{Zn}(\text{II})$  to **4** to form  $2_{\text{Zn}}$  can be also interrogated by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. Comparison of the  $^1\text{H}$  NMR spectra of **4** with that obtained after the addition of 1 equiv of  $\text{Zn}(\text{OTf})_2$  showed that upon complexation the signals corresponding to the seven pyridine protons underwent a downfield shift between 0.08 and 0.39 ppm (Figure 3). The signals arising from the (*S,S'*)-bipyrrrolidine as well as from the benzyl type methylene evidenced also a downfield shift of 0.18–0.36 ppm. In contrast,

$^1\text{H}$  NMR signals corresponding to the  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$  groups of the Lys residues remained invariable corroborating that the  $\text{Zn}$  coordination only comprised the (*S,S'*)-BPBP ligand, in agreement with the data obtained from the UV–vis titration with  $\text{Cu}(\text{II})$  ions. Besides, the HRMS spectrum of  $2_{\text{Zn}}$  showed cluster ions at  $m/z$  354.1580 and 530.7324 with isotopic patterns consistent with  $[\text{M}-\text{OTf}+2\text{H}^+]^{3+}$  and  $[\text{M}-\text{OTf}+\text{H}^+]^{2+}$  ions (Figure 3 and SI). Taken together, the sum of data successfully proved the formation of well-defined metalloptides.

**DNA Binding and DNA Cleavage Studies.** *Ethidium Bromide Displacement.* The quantification of binding strength of  $1_{\text{Cu}}$ ,  $2_{\text{Cu}}$ , **3**, and **4** to ct-DNA, poly(dA-dT) $_2$ , and poly(dG-dC) $_2$  was done by the competition between conjugates and ethidium bromide (EB). Displacement of ethidium bromide from all studied DNAs was accompanied by a decrease in the fluorescence intensity measured at 595 nm. The apparent binding constants ( $K_{\text{app}}$ ) were calculated from  $K_{\text{EB}}[\text{EB}] = K_{\text{app}}[\text{drug}]$ , where [drug] is the concentration of conjugates at a 50% reduction of fluorescence and  $K_{\text{EB}}$  is known.<sup>46</sup> The measured  $K_{\text{app}}$  values are summarized in Table 1. As it can be seen the binding affinities of nonmetalated conjugates **3** and **4** to ct-DNA are more than 1 order of magnitude lower than those of metalloptides  $1_{\text{Cu}}$  and  $2_{\text{Cu}}$ . This observation

**Table 1. Apparent DNA Binding Constants ( $K_{app}$ ) ( $\times 10^6$   $M^{-1}$ ) Evaluated for Conjugates 3, 4,  $1_{Cu}$  and  $2_{Cu}$**

compound	ct-DNA	poly(dA-dT) <sub>2</sub>	poly(dG-dC) <sub>2</sub>
3	0.27	n/a	n/a
4	0.13	n/a	n/a
$1_{Cu}$	7.1	6.2	5.7
$2_{Cu}$	5.9	5.3	4.7

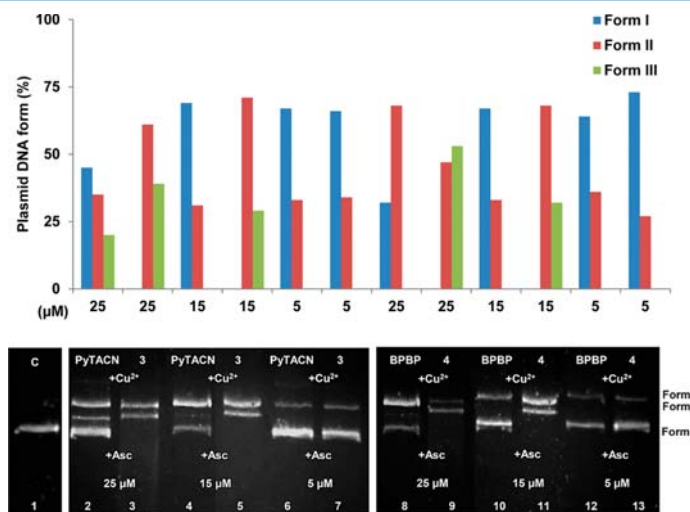
demonstrates that, upon chelation, the metal complex in both cases binds more strongly to the DNA. This could be attributed to the two labile positions that contain the metallic center, which may be engaged in covalent interactions with the phosphates of DNA, along with electrostatic interactions between the positively charged metal ion and the negatively charged phosphates. On the other hand,  $1_{Cu}$  and  $2_{Cu}$  exhibit slightly higher binding affinity for random ct-DNA than for poly(dA-dT)<sub>2</sub> and poly(dG-dC)<sub>2</sub> containing regular alternating purine and pyrimidine sequences. Small differences in binding affinities of  $1_{Cu}$  and  $2_{Cu}$  to poly(dA-dT)<sub>2</sub> and poly(dG-dC)<sub>2</sub> indicate low sequence selectivity. In all cases,  $1_{Cu}$  displaces EB from all studied DNAs a bit more efficiently than  $2_{Cu}$ .

**DNA Cleavage Experiments.** The DNA cleavage abilities of Me<sub>2</sub>PyTACN and (S,S')-BPBP ligands, conjugates 3, 4,  $1_{Zn}$ ,  $1_{Cu}$ ,  $2_{Zn}$ , and  $2_{Cu}$  were screened with pUC18 plasmid DNA. The conversion of supercoiled plasmid DNA (Form I) to nicked circular DNA (Form II) and linear DNA (Form III) was monitored by using agarose gel electrophoresis.

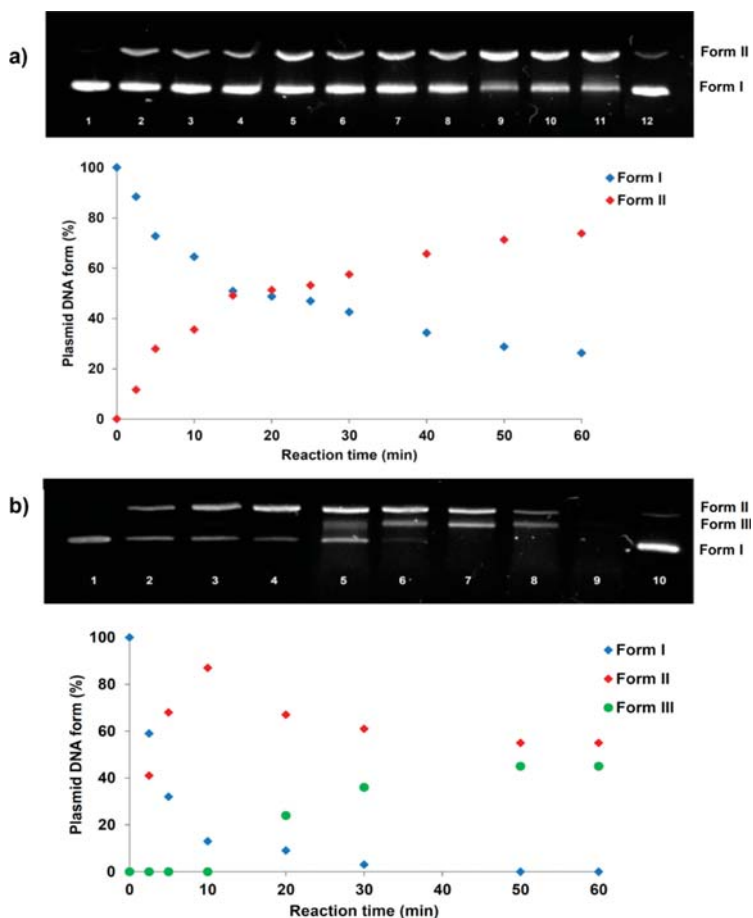
As shown in Figure S21, we first studied the activity of metal-free systems as well as in the presence of Zn<sup>2+</sup> or Cu<sup>2+</sup> in a 1:1 ratio with the Me<sub>2</sub>PyTACN and (S,S')-BPBP ligands or their peptide conjugates 3 and 4 in order to form in situ the resulting metallopeptides  $1_{Zn}$ ,  $1_{Cu}$ ,  $2_{Zn}$ , and  $2_{Cu}$ . To avoid any effect due to the participation of metal ions, 1 mM EDTA was added as chelating agent in metal-free cleavage tests.

Both tetradentate ligands and conjugate 3 and 4 were able to moderately interact with the supercoiled DNA (Form I) at moderate concentrations and short reaction times (50  $\mu$ M, 1 h; Figure S21, lanes 2 and 3). The same results were obtained when Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> metal ions were added in the respective reactions (Figure S21, lanes 4–7). Taking into account that the hydrolysis of the phosphodiester linkage in DNA is a difficult reaction, the appearance of these bands may result from unwinding of the DNA. Remarkably, in both series the addition of sodium L-ascorbate (Asc) as reducing agent in Cu<sup>2+</sup> complexes (1:1.5 ratio, M:Asc) promoted the total conversion of the supercoiled DNA (Form I) to nicked and linear DNA (Forms II and III, respectively), followed by smeared bands due to the DNA fragmentation (Figure S21, lanes 8 and 9). Thus, these extensive complete DNA transformations clearly indicated the importance of Cu<sup>2+</sup> and sodium L-ascorbate in the redox-active cleavage mechanism.<sup>11</sup> See Table S1 for the quantification of the DNA bands.

To further examine the results observed by the different metal-free systems, typical ROS scavengers for superoxide radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Tiron) and hydroxyl radical ·OH (DMSO) were included in these assays. As depicted in Figure S22, the DNA band promoted by conjugates 3 and 4 did not disappear when incubated in the presence of ROS scavengers. This observation suggests that ROS species were not involved in these metal-free assays. Moreover, in Figure S22 the appearance of an additional band between Form I and Form II was evidenced in all cases. This could be attributed to a close interaction of conjugates 3 and 4 with DNA leading to a less compact intermediate form, previous to the nicked form (Form II). It should be noted that metal-free and Zn<sup>2+</sup> experiments were slightly more efficient at acidic pH 6 than at neutral pH 7.4 (Figures S21 and S23), suggesting that their interaction abilities depended on their protonation form<sup>11,47,50</sup> despite being incubated for longer periods (24 h).<sup>51–53</sup>



**Figure 4.** Representative comparative assays of pUC18 DNA (18.9  $\mu$ M (bp)) incubated with Me<sub>2</sub>PyTACN, (S,S')-BPBP, 3, or 4 at different concentrations in Cacodylate buffer (0.1 M, pH 6) at 37 °C for 1 h. Cu<sup>2+</sup> was added in a 1:1 (M:L) ratio. C = DNA control. Asc = sodium L-ascorbate (1:1.5, M:Asc). The bottom panel shows the agarose gel images; the top panel shows the relative proportion of plasmid DNA (Form I, Form II and Form III). All lanes were run in the same gel. The relative proportion of the different bands is provided in the Supporting Information (Table S2).



**Figure 5.** (a) Kinetic trace of nicked pUC18 DNA (18.9  $\mu\text{M}$  (bp)) promoted by incubating  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  (15  $\mu\text{M}$ ) in Cacodylate buffer (0.1 M, pH 6) at 37  $^{\circ}\text{C}$ .  $\text{Cu}^{2+}$  was added in a 1:1 (M:L) and sodium L-ascorbate (Asc) (1:1.5, M:Asc). Top panel shows the agarose gel images at different reaction times: 0 min (lane 1), 2.5 min (lane 2), 5 min (lane 3), 10 min (lane 4), 15 min (lane 5), 20 min (lane 6), 30 min (lane 7), 50 min (lane 8), 60 min (lane 9), 90 min (lane 10), 90 min (lane 11) and DNA control at 90 min (lane 12). Bottom panel represents the variation of the relative proportion of plasmid DNA (Form I, Form II). (b) Kinetics of nicked pUC18 DNA (18.9  $\mu\text{M}$  (bp)) promoted by incubating  $2\text{Cu}$  (15  $\mu\text{M}$ ) in Cacodylate buffer (0.1 M, pH 6) at 37  $^{\circ}\text{C}$ .  $\text{Cu}^{2+}$  was added in a 1:1 (M:L) and Asc (1:1.5, M:Asc). Top panel shows the agarose gel images at different reaction times: 0 min (lane 1), 2.5 min (lane 2), 5 min (lane 3), 10 min (lane 4), 20 min (lane 5), 30 min (lane 6), 50 min (lane 7), 60 min (lane 8), 90 min (lane 9) and DNA control at 90 min (lane 10). Bottom panel represents the variation of the relative proportion of plasmid DNA (Form I, Form II and Form III).

Encouraged by these results, we examined the concentration dependence of both compound series in an effort to determine the optimal cleavage conditions and the tetrapeptide involvement during the cleavage reaction. Therefore, compounds **3**, **4**,  $1_{\text{Zn}}$ , and  $2_{\text{Zn}}$  were tested at higher concentrations (100, 150, and 200  $\mu\text{M}$ ) in Cacodylate buffer for 1 h. However, in all cases the interaction with DNA and the subsequent band formation was not improved (data not shown). On the other hand, the cleavage systems for the metalloproteins  $1_{\text{Cu}}$  and  $2_{\text{Cu}}$  and their respective ligands were examined at lower concentrations (25, 15, and 5  $\mu\text{M}$ ). Notably,  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  (Figure 4, lanes 2 and 4) and  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  (Figure 4, lanes 8 and 10) complexes were not able to totally cleave the plasmid DNA while their copper metalloproteins, under the same reaction conditions, displayed excellent nuclease activities at 25 and 15

$\mu\text{M}$ . As depicted in Figure 4 (lanes 5 and 11), the total conversion of the supercoiled form (Form I) to the nicked and linear form (Form II and Form III, respectively) were readily detected when incubating the copper metalloproteins at both concentrations in the presence of sodium L-ascorbate. At the lowest concentration (5  $\mu\text{M}$ ), the metalloproteins only showed a weak interaction with the supercoiled form of DNA. Furthermore, control assays of supercoiled plasmid DNA using (S,S')-BPBP (50  $\mu\text{M}$ ) and **4** (25  $\mu\text{M}$ ) and 10% excess of both binding moieties were performed (see Figure S24 and Figure S25, lanes 10–12). Remarkably, in both cases the Cu complexes ( $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  and  $2_{\text{Cu}}$ ) using 10% excess of the ligand showed the same activities as previously observed in 1:1 (M:L) ratio. This observation clearly ruled out the presence of free Cu and its involvement in the oxidative cleavage reaction.

Additionally, the oxidative cleavage mechanisms promoted by compounds  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$ ,  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$ ,  $1_{\text{Cu}}$  and  $2_{\text{Cu}}$  at 25 and 15  $\mu\text{M}$  were found to be almost inhibited at neutral pH 7.4 (Figure S26). These results revealed that the conjugation of  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  and  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  complexes to this cationic tetrapeptide sequence clearly improved their nuclease abilities, highlighting a promising peptide contribution to the DNA cleavage. Inhibition at neutral pH also suggests that the cationic nature of the peptide is lost or at least attenuated in these conditions. Lysine side chains are expected to have a  $\text{p}K_{\text{a}} \sim 10.5$ , but deprotonation at neutral pH may be rationalized by the close proximity of positive charge from the metal cation and additional lysine groups in the peptide.

In order to define and quantify the impact of introducing the cationic tetrapeptide sequence to  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  and  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  complexes on DNA cleavage efficiency, different kinetic studies of pUC18 DNA degradation were carried out. The loss of supercoiled DNA and the enhanced levels of open circular and linear forms were quantified after gel electrophoresis, as described in the Experimental Section, and further fitted with the aid of the kinetic model. Experimental reaction conditions were carefully optimized with the aim of monitoring the gradual disappearance of the supercoiled DNA (Form I). Bearing in mind that we were not able to properly follow the cleavage of supercoiled DNA incubating  $2_{\text{Cu}}$  at 25  $\mu\text{M}$  (Figure S27) or at 10  $\mu\text{M}$  (Figure S28), a compound concentration of 15  $\mu\text{M}$  was fixed for all kinetic assays. Hence, the time course of the supercoiled plasmid DNA cleavage (Form I) into nicked form (Form II) promoted by  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$ ,  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$ , and their corresponding metallopeptides  $1_{\text{Cu}}$  and  $2_{\text{Cu}}$ , respectively, are shown in Figures 5 and Figure S29. First we observed that the rate of conversion from Form I to Form II induced by  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  at 15  $\mu\text{M}$  increased with the increased reaction time (Figure 5a). The extension of the supercoiled DNA cleavage varied exponentially with the reaction time rendering pseudo first-order kinetics with an apparent initial first-order rate constant ( $k_{\text{obs}}$ ) of  $\sim 0.027 \text{ min}^{-1}$  and a half-life time ( $t_{1/2}$ ) of  $\sim 25.7 \text{ min}$  (Figure S30). Even extending the reaction time until 90 min (Figure 5a, lane 11), no linear DNA (Form III) was formed, which was supported by the previous behavior observed by  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  at the same concentration (Figure 4). Nevertheless, when performing the same experiment incubating  $2_{\text{Cu}}$  at 15  $\mu\text{M}$  (Figure 5b), we were pleased to observe that this metallopeptide totally cleaved the supercoiled DNA in the initial stage of the reaction (15–30 min, Figure 5b lanes 5–7). Moreover, subsequent nicking mediated by  $2_{\text{Cu}}$  promoted the conversion to nicked and linear forms (Figure 5b, lanes 7 and 8), finally yielding the entire degradation of DNA after 90 min of reaction (Figure 5b, lane 9). The  $k_{\text{obs}}$  for  $2_{\text{Cu}}$  was found to be  $\sim 0.11 \text{ min}^{-1}$  with  $t_{1/2} \approx 6.4 \text{ min}$  (Figure S30). These results evidenced that the DNA cleavage activity promoted by the metallopeptide  $2_{\text{Cu}}$  gave  $\sim 4$ -fold rate acceleration over that of compound  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$ , in agreement with the previous studies shown in Figure 4.

On the other hand, the same kinetic study was performed for  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  and  $1_{\text{Cu}}$  under the same reaction conditions (Figure S29a and S29b). Remarkably, the kinetic profile found for  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  contrasted with the findings for the metallopeptide  $1_{\text{Cu}}$ . The reaction profile observed for  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  pointed out a very slow cleavage activity after 90 min, displaying a pseudo first-order kinetic behavior with  $k_{\text{obs}} \sim 0.0071 \text{ min}^{-1}$  and  $t_{1/2} \sim 97.6 \text{ min}$  for supercoiled DNA (Figure S29a and Figure S30). However, its corresponding metal-

lopeptide  $1_{\text{Cu}}$  showed a pseudo first-order cleavage rate similar to  $2_{\text{Cu}}$  (Figure S29b) and was able to mediate the cleavage of the supercoiled DNA in the very early stage of the reaction (10–15 min, lanes 4 and 5). This metallopeptide displayed  $k_{\text{obs}}$  of  $\sim 0.16 \text{ min}^{-1}$  with a supercoiled DNA  $t_{1/2} \approx 4.3 \text{ min}$ , which corresponded to a  $\sim 23$ -fold rate enhancement of the DNA cleavage process over the parent complex  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  (Figure S30). Remarkably, the results obtained correlated to the cleavage profiles previously found for  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  and  $1_{\text{Cu}}$  depicted in Figure 4.

Therefore, the large rate enhancement of the DNA cleavage activity promoted by the two metallopeptides  $1_{\text{Cu}}$  and  $2_{\text{Cu}}$  made evident that, at very low concentrations, the conjugation of  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  and  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  complexes to the cationic tetrapeptide sequence LKKL contributed very favorably to the DNA cleavage activity. Notably, this positive effect was specially noted when comparing the DNA cleavage activity observed for  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  and its corresponding metallopeptide  $1_{\text{Cu}}$ .

Studies toward the identification of the oxidizing species involved in the oxidative cleavage mechanism promoted by  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  and  $2_{\text{Cu}}$  were undertaken. We considered the possibility that either reactive oxygen species (ROS) or a metal based oxidant such as copper-superoxide or copper peroxide species will be responsible for the oxidative damage. ROS scavengers for superoxide radical  $\text{O}_2^-$  (Tiron) and hydroxyl radical  $\cdot\text{OH}$  (DMSO) were added in the cleavage assays (Figure 6, see Table S3 for the quantification of the DNA bands). The concentration of  $(S,S')$ -BPBP ligand was fixed at 50  $\mu\text{M}$  while for **4** was incubated at its optimal cleavage conditions (15  $\mu\text{M}$ , Figure 4, lane 11). Notably, an important cleavage inhibition was detected for  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  and  $2_{\text{Cu}}$  when Tiron was added in the reaction systems. In contrast,

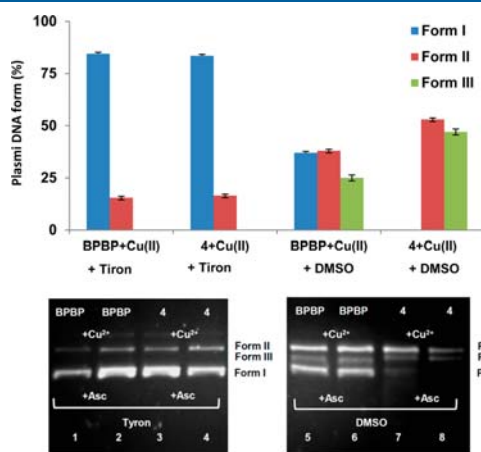
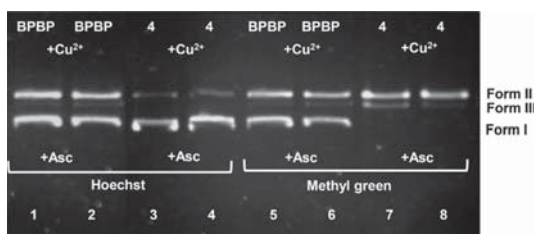


Figure 6. Agarose gel images of pUC18 DNA (18.9  $\mu\text{M}$  (bp)) incubating  $(S,S')$ -BPBP (50  $\mu\text{M}$ ) and **4** (15  $\mu\text{M}$ ) with ROS inhibitors in Cacodylate buffer (0.1 M, pH 6) at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h. ROS inhibitors: Tiron (10 mM) and DMSO (3  $\mu\text{L}$ ).  $\text{Cu}^{2+}$  was added in a 1:1 (M:L) ratio. Asc = sodium L-ascorbate (1:1.5, M:Asc). The bottom panel shows the agarose gel images; the top panel shows the relative proportion of plasmid DNA (Form I, Form II and Form III). Representative data from two independent experiments expressed as mean  $\pm$  standard deviation. All lanes were run in the same gel. The relative proportion of the different bands is depicted in Table S3.



both compounds exhibited high nuclease chemistry despite of the presence of DMSO as hydroxyl radical inhibitor. These results evidenced that both systems generate the superoxide radical. Therefore, we assumed that these species may be the responsible for the oxidative DNA cleavage. A caution note must be made at this point regarding the possible implication of metal based oxidation species. ROS scavengers are highly reactive against diffusible species, and it is highly unlikely that they would efficiently react with a putative metal based oxidant (such as a copper-superoxide species) that is placed in close proximity to the DNA oxidative target by virtue of its interaction with the peptide moiety. Therefore, inhibition of the oxidative damage by the ROS scavenger Tiron strongly suggests that diffusible superoxide anion is responsible for the oxidation activity.

In order to assess whether the enhanced nuclease reactivity of the copper metallopeptides is reflecting an enhanced binding affinity or groove preference toward plasmid DNA, further cleavage experiments with  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  and  $2_{\text{Cu}}$  were performed in the presence of major groove or minor groove DNA inhibitors. The same concentrations as in the previous study were used. As shown in Figure 7, the cleavage activity of



**Figure 7.** Agarose gel images of pUC18 DNA ( $18.9 \mu\text{M}$  (bp)) incubating BPBP ( $50 \mu\text{M}$ ) and 4 ( $15 \mu\text{M}$ ) in the presence of DNA minor groove inhibitor Hoechst ( $20 \mu\text{M}$ ) and major groove inhibitor Methyl green ( $20 \mu\text{M}$ ) in Cacodylate buffer ( $0.1 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 6$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 1 h.  $\text{Cu}^{2+}$  was added in a 1:1 (M:L) ratio. Asc = Sodium L-Ascorbate (1:1.5, M:Asc). All lanes were run in the same gel.

$[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  was partially inhibited in the presence of the major groove-binding agent methyl green. The same effect was observed when Hoechst was incubated in the reaction as minor groove binding agent. This result proposed that the chemical nuclease activity of  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$  was partially inhibited in both cases, suggesting that this oxidative complex was not able to selectively cleave the plasmid DNA. Interestingly, when analyzing the same experiments incubating the  $2_{\text{Cu}}$  metallopeptide, no inhibition effect on the DNA cleavage was observed in the presence of major groove inhibitor methyl green. In contrast, the presence of Hoechst induced a complete inhibition of the nuclease activity provided by  $2_{\text{Cu}}$  proposing that this minor-groove intercalator might bind in the preferred binding sites of conjugate  $2_{\text{Cu}}$ . These data suggested an improved binding affinity to the DNA minor groove by this conjugate and is in total agreement with the minor groove orientation induced by other previously reported cationic tetrapeptide sequences.<sup>31,33</sup> The LKKL sequence might preferentially interact in the minor-groove region by non-covalent interactions involving the protonated lysine  $\epsilon\text{-NH}_3^+$  groups.

In order to obtain further information on ability of  $1_{\text{Cu}}$  and  $2_{\text{Cu}}$  to produce sequence-selective DNA cleavage, the 158 bp

*Hind* III/*Nde* I restriction fragment of the plasmid pSP73 was mixed with various concentrations of metal-binding peptide conjugates 3 and 4 previously metalated with 1 equiv of  $\text{Cu}^{2+}$ . The cleavage reaction was triggered by addition of  $100 \mu\text{M}$  sodium L-ascorbate. Samples were analyzed by PAGE. Figures S31 and S32 show the results obtained for the reactions carried out in  $20 \text{ mM}$  Tris-HCl ( $\text{pH } 7.2$ ) and  $50 \text{ mM}$  cacodylate buffer ( $\text{pH } 6$ ). The copper metallopeptides  $1_{\text{Cu}}$  and  $2_{\text{Cu}}$  led to a nonspecific cleavage pattern where the DNA fragment was randomly cleaved at all nucleotides. The DNA was less cleaved by  $1_{\text{Cu}}$  than by  $2_{\text{Cu}}$ . Our results suggest that both conjugates do not exhibit sequence-specific binding to the DNA. On the other hand, previous experiments have demonstrated that the cleavage mechanism is based on the production of ROS species, predominantly superoxide radical. In aqueous solutions the mean lifetime of superoxide radical is  $50 \text{ ms}$  and the diffusion distance  $320 \text{ nm}$ .<sup>54</sup> Thus, this species can diffuse along the double helix and induce strand scission at relatively great distance from the site of production.

Finally, the biological activity of the compounds 3, 4,  $1_{\text{Zn}}$ ,  $1_{\text{Cu}}$ ,  $2_{\text{Zn}}$ , and  $2_{\text{Cu}}$  was assayed against nonmalignant cells (IBR3G). It was found that none of these compounds exhibited any cytotoxicity ( $>100 \mu\text{M}$ ). Further assays against MCF-7 and CAPAN-1 cancer cell lines showed that all compounds were also found not to be cytotoxic in these cases (Figure S34). Additionally, the same compounds displayed very low hemolytic activities even at  $150 \mu\text{M}$  (Table S4). The biological data suggests that these metallopeptides are not capable of reaching the cell nucleus. However, despite this preliminary cellular behavior, we envision that the conjugation of the same redox-active moieties and metal complexes to a functional peptide vector may render a potential strategy from a therapeutic point of view. Further efforts are currently underway toward achieving an effective cellular delivery with peptide-based carriers, while improving the intracellular accumulation and redox-directed anticancer effects.

## CONCLUSIONS

In the present work, the conjugation feasibility of Cu and Zn complexes to the short cationic tetrapeptide LKKL by means of solid-phase peptide synthesis (SPPS) has been studied. A straightforward methodology to render novel metal binding peptide conjugates has been successfully developed, and subsequent metalation of  $\text{Me}_2\text{PyTACN}$  and  $(S,S')$ -BPBP-based peptides with Zn(II) and Cu(II) metal ions has been fully characterized by HRMS, NMR, and UV-vis. DNA cleavage studies under optimized conditions indicate that copper metallopeptides based on  $\text{Me}_2\text{PyTACN}$  and  $(S,S')$ -BPBP ligands ( $1_{\text{Cu}}$  and  $2_{\text{Cu}}$ ) render an enhanced nuclease activity compared to the parent Cu complexes. Remarkably, Cu metallopeptides  $1_{\text{Cu}}$  and  $2_{\text{Cu}}$  gave a  $\sim 4$ -fold and  $\sim 23$  rate accelerations in comparison with their parent Cu complexes,  $[\text{Cu}(\text{PyTACN})]^{2+}$  and  $[\text{Cu}(\text{BPBP})]^{2+}$ , respectively. Moreover, the apparent DNA binding constants ( $K_{\text{app}}$ ) for  $1_{\text{Cu}}$  and  $2_{\text{Cu}}$  metallopeptides have been found to be  $7.1$  and  $5.9$  ( $\times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), respectively, more than 1 order of magnitude higher than those of metal binding conjugates 3 and 4. Although  $1_{\text{Cu}}$  and  $2_{\text{Cu}}$  did not display sequence-specific binding to the DNA, these excellent cleavage activities are explained by the presence of the cationic tetrapeptide that effectively induces an improved binding affinity to the DNA-minor groove, resulting in groove selectivity on the nuclease activity. Additional mechanistic studies propose that the oxidative cleavage mechanism is based

on the generation of highly reactive oxygen species, causing the DNA damage.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.inorgchem.5b01680.

Additional figures and tables of experimental data (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: miquel.costas@udg.edu.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Consolider Ingenio CSD/CSD2010-00065 from MICINN of Spain. We also thank the Catalan DIUE of the Generalitat de Catalunya (2014 SGR 862). X.R. thanks financial support from INNPLANTA project INP-2011-0059-PCT-420000-ACT1. M.C. and X.R. thank ICREA Acadèmia Awards. We also acknowledge the Serveis Tècnics de Recerca of the University of Girona for technical support. J.M. and V.B. thank the Czech Science Foundation (Grants P205/11/0856 and 14-21053S). J.M. and V.B. also acknowledge that their participation in the EU COST Action CM1105 enabled them to exchange regularly the most recent ideas in the field of platinum anticancer drugs with several European colleagues.

## ■ REFERENCES

- (1) Haas, K. L.; Franz, K. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4921–4960.
- (2) Storr, T.; Thompson, K. H.; Orvig, C. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 534–544.
- (3) Scott, L. E.; Orvig, C. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4885–4910.
- (4) Lewis, J. C. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2954–2975.
- (5) Ball, Z. T. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 560–570.
- (6) Zeglis, B. M.; Pierre, V. C.; Barton, J. K. *Chem. Commun.* **2007**, 4565–4579.
- (7) Liu, H.-K.; Sadler, P. J. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 349–359.
- (8) Pitié, M.; Pratiel, G. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1018–1059.
- (9) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5545–5559.
- (10) Komor, A. C.; Barton, J. K. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3617–3630.
- (11) Desbouis, D.; Troitsky, I. P.; Belousoff, M. J.; Spiccia, L.; Graham, B. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 897–937.
- (12) Jin, Y.; Lewis, M. A.; Gokhale, N. H.; Long, E. C.; Cowan, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8353–8361.
- (13) Joyner, J. C.; Cowan, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9912–9922.
- (14) Joyner, J. C.; Reichfield, J.; Cowan, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15613–15626.
- (15) Puckett, C. A.; Barton, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8738–8739.
- (16) Heinze, K.; Beckmann, M.; Hempel, K. *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 9468–9480.
- (17) Dirscherl, G.; König, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 597–634.
- (18) Faller, P.; Hureau, C.; Dorlet, P.; Hellwig, P.; Coppel, Y.; Collin, F.; Aliès, B. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2381–2396.
- (19) Yu, M.; Price, J. R.; Jensen, P.; Lovitt, C. J.; Shelper, T.; Duffy, S.; Windus, L. C.; Avery, V. M.; Rutledge, P. J.; Todd, M. H. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 12823–12835.
- (20) Rama, G.; Ardá, A.; Maréchal, J.-D.; Gamba, I.; Ishida, H.; Jiménez-Barbero, J.; Vázquez, M. E.; Vázquez López, M. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 7030–7035.
- (21) Meier, S. M.; Novak, M.; Kandioller, W.; Jakupec, M. a; Arion, V. B.; Metzler-Nolte, N.; Keppeler, B. K.; Hartinger, C. G. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 9297–9307.
- (22) Tabassum, S.; Al-Asbahy, W. M.; Afzal, M.; Arjmand, F.; Bagchi, V. *Dalt. Trans.* **2012**, *41*, 4955–4964.
- (23) Blackmore, L.; Moriarty, R.; Dolan, C.; Adamson, K.; Forster, R. J.; Devocelle, M.; Keyes, T. E. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2658–2660.
- (24) Leonidova, A.; Pierroz, V.; Rubbiani, R.; Lan, Y.; Schmitz, A. G.; Kaeck, A.; Sigel, R. K. O.; Ferrari, S.; Gasser, G. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 4044–4056.
- (25) King, G.; DeRose, V. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 196–200.
- (26) Kelso, M. J.; Beyer, L.; Hoang, H. N.; Lakdawala, A. S.; Snyder, J. P.; Oliver, W. V.; Robertson, T. A.; Appleton, T. G.; Fairlie, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4828–4842.
- (27) Albrecht, M.; Stortz, P. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 496–506.
- (28) Gamba, I.; Salvadó, I.; Rama, G.; Bertazzon, M.; Sánchez, M. L.; Sánchez-Pedregal, V. M.; Martínez-Costas, J.; Brissos, R. F.; Gamez, P.; Mascareñas, J. L.; Vázquez López, M.; Vázquez, M. E. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 13369–13375.
- (29) Ghesquière, J.; Gauthier, N.; De Winter, J.; Gerbaux, P.; Moucheron, C.; Defrancq, E.; Kirsch-De Mesmaeker, A. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 355–364.
- (30) Li, C.; Zhao, F.; Huang, Y.; Liu, X.; Liu, Y.; Qiao, R.; Zhao, Y. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1832–1837.
- (31) Suzuki, M. *EMBO J.* **1989**, *8*, 797–804.
- (32) Suzuki, M. *EMBO J.* **1989**, *8*, 4189–4195.
- (33) Huang, H.; Kozekov, I. D.; Kozekova, A.; Rizzo, C. J.; McCullough, A. K.; Lloyd, R. S.; Stone, M. P. *Biochemistry* **2010**, *49*, 6155–6164.
- (34) Cussó, O.; Garcia-Bosch, I.; Ribas, X.; Lloret-Fillol, J.; Costas, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14871–14878.
- (35) Company, A.; Prat, I.; Frisch, J. R.; Mas-Ballesté, R.; Güell, M.; Juhász, G.; Ribas, X.; Münck, E.; Luis, J. M.; Que, L., Jr.; Costas, M. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 1622–1634.
- (36) Garcia-Bosch, I.; Gómez, L.; Polo, A.; Ribas, X. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 65–70.
- (37) Fillol, J. L.; Codolà, Z.; Garcia-Bosch, I.; Gómez, L.; Pla, J. J.; Costas, M. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 807–813.
- (38) Gómez, L.; Garcia-Bosch, I.; Company, A.; Benet-Buchholz, J.; Polo, A.; Sala, X.; Ribas, X.; Costas, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5720–5723.
- (39) Company, A.; Gómez, L.; Fontrodona, X.; Ribas, X.; Costas, M. *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 5727–5731.
- (40) Company, A.; Feng, Y.; Güell, M.; Ribas, X.; Luis, J. M.; Que, L., Jr.; Costas, M. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 3359–3362.
- (41) Codolà, Z.; Garcia-Bosch, I.; Acuña-Parés, F.; Prat, I.; Luis, J. M.; Costas, M.; Lloret-Fillol, J. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 8042–8047.
- (42) Gómez, L.; Canta, M.; Font, D.; Prat, I.; Ribas, X.; Costas, M. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1421–1433.
- (43) Jabre, N. D.; Respondek, T.; Ulku, S. a; Korostelova, N.; Kodanko, J. J. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 650–659.
- (44) Jabre, N. D.; Korostelova, N.; Kodanko, J. J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2273–2276.
- (45) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- (46) Wyatt, M. D.; Garbiras, B. J.; Haskell, M. A.; Lee, M.; Souhami, R. L.; Hartley, J. A. *Anti-Cancer Drug Des.* **1994**, *9*, 511–525.
- (47) Hernández-Gil, J.; Ferrer, S.; Salvador, E.; Calvo, J.; Garcia-España, E.; Mareque-Rivas, J. C. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3655–3657.
- (48) Badosa, E.; Ferre, R.; Planas, M.; Feliu, L.; Besalú, E.; Cabrefiga, J.; Bardají, E.; Montesinos, E. *Peptides* **2007**, *28*, 2276–2285.
- (49) Hammoud, M. M.; Mckamie, J. J.; Heeg, M. J.; Kodanko, J. J. *Dalt. Trans.* **2008**, 4843–4845.

(50) Zhao, M.; Wang, H.-L.; Zhang, L.; Zhao, C.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7344–7346.

(51) Tjioe, L.; Meininger, A.; Joshi, T.; Spiccia, L.; Graham, B. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 4327–4339.

(52) Li, Z.-F.; Chen, H.-L.; Zhang, L.-J.; Lu, Z.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2303–2307.

(53) Tjioe, L.; Joshi, T.; Brugger, J.; Graham, B.; Spiccia, L. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 621–635.

(54) Skovsen, E.; Snyder, J. W.; Lambert, J. D. C.; Ogilby, P. R. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 8570–8573.





Pro-oxidant activity of amine-pyridine-based iron complexes efficiently kills cancer and cancer stem-like cells: Evidence for a new class of redox-directed anticancer metallodrugs. González-Bártulos M, Aceves-Luquero C, Qualai J, Cussó O, Martínez MA, Fernández de Matos S, Menéndez JA, Villalonga P, Costas M, Ribas X, Massaguer A. PLoS One. 2015 Sep 14;10(9):e0137800.



## RESEARCH ARTICLE

# Pro-Oxidant Activity of Amine-Pyridine-Based Iron Complexes Efficiently Kills Cancer and Cancer Stem-Like Cells

Marta González-Bártulos<sup>1,4</sup>, Clara Aceves-Luquero<sup>2</sup>, Jamal Qualai<sup>3</sup>, Olaf Cussó<sup>3,4</sup>, M<sup>a</sup> Angeles Martínez<sup>1,3</sup>, Silvia Fernández de Mattos<sup>2</sup>, Javier A. Menéndez<sup>5,6\*</sup>, Priam Villalonga<sup>2</sup>, Miquel Costas<sup>3,4\*</sup>, Xavi Ribas<sup>3,4\*</sup>, Anna Massaguer<sup>1\*</sup>

**1** Department of Biology, University of Girona, Girona, Catalunya, Spain, **2** Departament de Biologia Fonamental and Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears, Illes Balears, Spain, **3** Department of Chemistry, University of Girona, Girona, Catalunya, Spain, **4** Institut de Química Computacional i Catàlisi (IQCC), University of Girona, Girona, Catalunya, Spain, **5** Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology (ICO), Girona, Catalunya, Spain, **6** Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Girona, Catalunya, Spain

\* [anna.massaguer@udg.edu](mailto:anna.massaguer@udg.edu) (AM); [xavi.ribas@udg.edu](mailto:xavi.ribas@udg.edu) (XR); [miquel.costas@udg.edu](mailto:miquel.costas@udg.edu) (MC); [jmenendez@idibgi.org](mailto:jmenendez@idibgi.org) (JAM)



CrossMark  
click for updates

## OPEN ACCESS

**Citation:** González-Bártulos M, Aceves-Luquero C, Qualai J, Cussó O, Martínez MA, Fernández de Mattos S, et al. (2015) Pro-Oxidant Activity of Amine-Pyridine-Based Iron Complexes Efficiently Kills Cancer and Cancer Stem-Like Cells. PLoS ONE 10(9): e0137800. doi:10.1371/journal.pone.0137800

**Editor:** Sujit Kumar Bhutia, National Institute of technology Rourkela, INDIA

**Received:** May 5, 2015

**Accepted:** August 21, 2015

**Published:** September 14, 2015

**Copyright:** © 2015 González-Bártulos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), CONSOLIDER-INGENIO 2010 CSD2010-00065, and from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), SAF2012-38914, Plan Nacional de I+D+I.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Differential redox homeostasis in normal and malignant cells suggests that pro-oxidant-induced upregulation of cellular reactive oxygen species (ROS) should selectively target cancer cells without compromising the viability of untransformed cells. Consequently, a pro-oxidant deviation well-tolerated by nonmalignant cells might rapidly reach a cell-death threshold in malignant cells already at a high setpoint of constitutive oxidative stress. To test this hypothesis, we took advantage of a selected number of amine-pyridine-based Fe (II) complexes that operate as efficient and robust oxidation catalysts of organic substrates upon reaction with peroxides. Five of these Fe(II)-complexes and the corresponding amino-pyridine ligands were selected to evaluate their anticancer properties. We found that the iron complexes failed to display any relevant activity, while the corresponding ligands exhibited significant antiproliferative activity. Among the ligands, none of which were hemolytic, compounds **1**, **2** and **5** were cytotoxic in the low micromolar range against a panel of molecularly diverse human cancer cell lines. Importantly, the cytotoxic activity profile of some compounds remained unaltered in epithelial-to-mesenchymal (EMT)-induced stable populations of cancer stem-like cells, which acquired resistance to the well-known ROS inducer doxorubicin. Compounds **1**, **2** and **5** inhibited the clonogenicity of cancer cells and induced apoptotic cell death accompanied by caspase 3/7 activation. Flow cytometry analyses indicated that ligands were strong inducers of oxidative stress, leading to a 7-fold increase in intracellular ROS levels. ROS induction was associated with their ability to bind intracellular iron and generate active coordination complexes inside of cells. In contrast, extracellular complexation of iron inhibited the activity of the ligands. Iron complexes showed a high proficiency to cleave DNA through oxidative-dependent mechanisms, suggesting a likely mechanism of cytotoxicity. In summary, we report that, upon chelation of intracellular iron, the pro-oxidant activity of amine-pyrimidine-based iron complexes efficiently kills cancer and

cancer stem-like cells, thus providing functional evidence for an efficient family of redox-directed anti-cancer metallodrugs.

## Introduction

Cancer cells undergo metabolic adaptations to sustain their uncontrolled growth and proliferation. Diverse intrinsic and extrinsic molecular mechanisms contribute to this metabolic reprogramming to supply cancer cells with sufficient energy and biosynthetic capacity in the tumor environment [1,2]. Altered metabolism together with activated oncogenic signaling and deregulation of mitochondrial function typically results in an increase in the generation of reactive oxygen species (ROS) in cancer cells [3,4]. Interestingly, this phenomenon leads to a differential redox homeostasis in normal and malignant cells that is gaining ground as a promising target for the design of more selective and effective anticancer agents [5–8].

Highly reactive ROS are produced in cells by the incomplete reduction of molecular oxygen to water during aerobic metabolism. ROS are normally regulated by cellular defensive antioxidants [9,10] and participate in multiple cellular functions including signal transduction, enzyme activation, gene expression and protein post-translational modifications [11]. When generated in excess or when the efficiency of the cellular antioxidant system is submaximal, ROS accumulate and cause irreversible cellular damage through the oxidation of biomolecules such as lipid membranes, enzymes or DNA which generally leads to cellular death [12]. ROS can also promote cancer initiation and progression by inducing DNA mutations and pro-oncogenic signaling pathways [13,14].

Increased ROS in cancer cells upregulates the antioxidant response, resulting in a new redox balance that enables these cells to maintain higher ROS levels than normal cells. Consequently, cancer cells exhibit persistent oxidative stress, which promotes cell proliferation but is insufficient to cause cellular death [4,13]. This altered homeostasis renders cancer cells vulnerable to exogenous oxidizing agents that generate additional ROS, which are likely to increase oxidative stress levels above the cytotoxic threshold. This susceptibility is heightened by the restricted capacity of cancer cells to strengthen the antioxidant response to neutralize the oxidative insult [15]. In contrast, normal cells can tolerate higher levels of exogenous ROS stress since they exhibit lower constitutive ROS levels together with a superior responsiveness of antioxidant systems. In fact, it is well described that, in addition to their direct effects on DNA and cell division, the mechanism of action of many chemotherapeutic agents such as 5-fluorouracil, bleomycin, cisplatin, doxorubicin or paclitaxel also involves ROS-mediated apoptosis [13,16–19].

While the biological effects of ROS and the mechanisms regulating ROS levels are well established in cancer cells, little is known about the role of ROS in the cancer stem cell (CSC) subpopulation, which displays a high capacity for self-renewal and differentiation and also the potential to generate tumors with a marked chemo-/radio resistance [20,21]. CSCs contain lower levels of ROS than non-CSCs, likely as a consequence of enhanced free radical scavenging systems [22]. Low ROS levels might be related to the privileged status of this subset of cells, preserving DNA integrity and protein function, which is critical to maintain the potential for self-renewal and stemness [23,24]. Thus, exogenous ROS elevation might be an approach to kill the CSC subpopulation, which is normally enriched after conventional chemotherapy. Indeed, niclosamide and arsenic trioxide (AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), which are potent ROS inducers, have been shown to promote CSC death [25].

A number of anticancer agents that target the cellular redox balance are in different phases of preclinical and clinical development [5,6]. Mechanistically, these agents either inhibit the cellular antioxidant defense systems [27–29] or generate ROS [30–32]. In addition to these

agents, transition metal-based compounds may be promising candidates for pro-oxidant therapies. When accumulated in cells, metals such as iron, manganese and copper, undergo cycling redox reactions that generate high levels of ROS, principally the highly-damaging hydroxyl radical species through the Fenton reaction. This metal-mediated form of oxidative stress is a well-known cause of cell death [33], and thus, an increasing number of investigations are exploring the potential of metallo-drugs in redox-based anticancer therapies [34–37].

Transition metal complexes with aminopyridine-containing organic scaffolds have emerged as powerful catalysts for the oxidation of organic substrates. These complexes are also regarded as bioinspired catalysts since they reproduce structural and reactivity properties of oxidative enzymes. A key aspect of their activity is their strong binding to iron and manganese ions, generating powerful oxidants after reacting with peroxides [38–43]. These oxidant compounds function as catalysts to promote the oxidation of inert molecules such as alkanes, alkenes and even the challenging water molecule. The mechanism of action involves ferric-peroxide species, chemically reminiscent to activated bleomycin. In addition, these compounds are highly resistant to self-oxidation. With this background, we here assessed the antiproliferative and cytotoxic activity profiles of five amino-pyridine-based Fe(II)-complexes which have been previously shown to be particularly active in peroxide activation reactions [38–43], and the corresponding metal-free ligands, against a panel of diverse human cell lines including epithelial-to-mesenchymal (EMT)-induced stable populations of cancer stem-like cells and non-malignant cells. The most active compounds were further analyzed for their ability to inhibit the clonogenicity of cancer cells, modulate the cell cycle and induce cell death. The capacity of the amine-pyrimidine-based iron complexes to generate ROS and cause DNA damage was evaluated together with the influence of the chelation of intracellular iron on their cytotoxic profile. Based on the lethal disruption in the redox balance caused by these complexes in cancer and ROS-resistant cancer stem-like cells, we provide strong functional evidence for an efficient family of redox-directed anti-cancer metallo-drugs.

## Materials and Methods

### Materials

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), propidium iodide (PI), deferoxaminemesylate salt (DFO), N-acetyl-L-cysteine (NAC), calcein-acetoxymethylester (calcein-AM), cacodylate buffer, Tris-EDTA (ethylene-diamino tetracetic acid), tiron, sodium azide, methyl green, Hoechst, ethidium bromide, bromophenol blue, xylene cyanol, glycerol and RNase A were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methylene blue, hydrogen peroxide 35% (w/v) and ethanol were from Panreac (Barcelona, Spain). HEPES was from ICN (Madrid, Spain). Triton-X100 was from PlusOne (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) was from Molecular Probes (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Agarose was from Ecogen (Barcelona, Spain). Cisplatin (Pharmacia, Pfizer Inc, Kalamazoo, MI, USA) was kindly provided by the pharmacy of the Catalan Institute of Oncology (ICO, Hospital Dr. Josep Trueta, Girona, Spain). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), RPMI-1640 medium, phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin and trypsin were obtained from GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA). DMEM/F12, horse serum and insulin were from Invitrogen. Hydrocortisone, cholera toxin and epidermal growth factor were from Sigma-Aldrich. Mammary Epithelial Cell Growth Medium (MEGM) was from Lonza (Berkshire, UK). The pUC18 plasmid was from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Compounds selected for this study (**1**, **1-Fe**, **2**, **2-Fe**, **3**, **3-Fe**, **4**, **4-Fe**, **5** and **5-Fe**) were synthesized following reported procedures [38–41].

## Cell lines

Human MCF-7 breast cancer cell line, CAPAN-1 pancreatic cancer cell line, PC-3 prostate cancer cell line, Z-138, Jeko-1, Granta and SP53 non-Hodgkin's lymphoma cell lines, JURKAT T-cell acute lymphoblastic leukemia cells, LN229 and U87MG glioma cell lines and MCF 10A immortalized mammary epithelial cell line were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). The CCD-18Co human colon fibroblast cell line was obtained from EucellBank (University of Barcelona, Barcelona, Spain). 1BR3G transformed human skin fibroblasts were obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Porton, UK). MCF-7, CAPAN-1, PC-3, LN229 and U87MG were maintained in DMEM. Hematological cell lines were maintained in RPMI-1640. All media were supplemented with 10% FBS and 100 U/ml penicillin-streptomycin. Medium for JURKAT, Jeko-1 and Z-138 cells was supplemented with 25 mmol/L HEPES. MCF 10A cells were maintained in DMEM/F12 supplemented with 5% horse serum, 500ng/ml hydrocortisone, 100ng/ml cholera toxin, 10 µg/ml insulin and 20ng/ml epidermal growth factor. HMLE cells (immortalized human mammary epithelial cells), HMLER cells (HMLE cells overexpressing hTERT, SV40 T/t and H-RasV12) and HMLERshEcad cancer stem-like cells (HMLER cells transformed via short hairpin RNA to inhibit expression of the CDH1 gene, which encodes for E-cadherin) [44], were maintained in a 1:1 mixture of HMLE medium (DMEM/F-12 plus 5% horse serum, penicillin-streptomycin-glutamine (PSG), 10 µg/mL insulin, 10 ng/mL epidermal growth factor and 0.5 g/mL hydrocortisone) and MEGM. All cell lines were grown at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

## Cytotoxicity Assays

The cytotoxic activity of the compounds was determined by MTT reduction assay as described [45]. Compounds were diluted in Milli-Q water to obtain 1 mmol/L stock solutions. Appropriate aliquots of these solutions were diluted in the corresponding cell culture medium to obtain the final working concentrations. Aliquots of 5000 1BR3G cells, 6000 MCF-7, 6000 PC-3 cells, 10 000 CAPAN-1 cells, 4000 MCF 10A cells, 4000 HMLE cells or 4000 CCD-18Co cells were seeded in 96-well plates, 24 h prior to the treatments. Hematological cell lines were seeded at 400 000 cells/mL. Cells were treated with the corresponding compound at concentrations ranging from 0 to 100 µmol/L for 48 h. Three replicates for each compound were used. The IC<sub>50</sub> was established for each compound by standard non-linear regression and curve fitting using GraphPad Prism (Graph Pad software Inc., La Jolla, CA, USA).

## Hemolytic assay

The hemolytic activity of the compounds at 100 µmol/L was evaluated by determining hemoglobin release from erythrocyte suspensions of fresh human blood (5% vol/vol) as described [46].

## Colony formation assay

MCF-7 cells were seeded in 12-well plates. Twenty-four-hours later, cells were treated with cisplatin, compound **1**, **2** or **5** at 10 µmol/L, or vehicle alone as a control, for 3 and 24 h at 37°C. Additionally, cells were exposed to compound **1** for 3, 6, 12 and 24 hours. Subsequently, cells were washed with PBS, collected with trypsin and plated at low density (3000 cells in a 360-mm plate). Cells were allowed to divide and form colonies for 7–10 days; after which, colonies were fixed and stained with 2% methylene blue in 50% ethanol. The number of colonies in

each plate was determined using the Alpha Innotech Imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA).

### Caspase activity analysis

Enzymatic caspase activity was determined after exposing the cells to compound **1**, **2** and **5** at 10  $\mu\text{mol/L}$  for 48 h. Caspase 3/7 activity was measured with the luminometric Caspase-Glo 3/7 assay (Promega, Madison, WI, USA) using a Synergy HT multi-detection microplate reader (Bio-Tek).

### Cell cycle analysis

Cell cycle profiles were analyzed by flow cytometry of PI-stained cells. Briefly, cells were collected by centrifugation, washed in ice-cold PBS and fixed for 30 min at 4°C in 70% ethanol. After washing twice with PBS, DNA was stained with 50  $\mu\text{g/mL}$  PI in the presence of 50  $\mu\text{g/ml}$  RNase A. Stained cells were then processed using a FACScan flow cytometer (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

### ROS measurement

Cellular ROS content was determined using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate probe ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ). Cells were seeded in 24-well plates (50 000 cells/well) in phenol red-free DMEM 24 h prior to treatments. Cells were treated with different concentrations of compound **1**, **2** and **5** (2.5, 5 or 10  $\mu\text{mol/L}$ ) or vehicle alone as a control, for 5 or 24 hours at 37°C. In some experiments, cells were co-treated with the compounds plus 5 mmol/L NAC. After treatments, cells were washed with PBS and incubated with 1  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  in PBS for 30 minutes in the dark. After washing, cells were collected with trypsin and analyzed by flow cytometry using a FACS-Calibur flow cytometer (Becton-Dickinson<sup>®</sup>, Immunofluorescence Systems, Mountain View, CA, USA). The geometric mean fluorescence intensity of 10 000 cells was established using CellQuest<sup>™</sup> software (Becton Dickinson). The fluorescence fold-increase versus untreated cells was determined for each treatment.

### Determination of cellular labile iron pool

The cellular labile iron pool was determined with calcein-AM. CAPAN-1 cells (125 000 cells/well) were seeded in 24-well plates and incubated for 24 h. Then, cells were treated for 24 h with 10  $\mu\text{mol/L}$  of compound **1**, **2** or **5** at 37°C. In some experiments, cells were incubated for 2 h with 100  $\mu\text{mol/L}$  of DFO or 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_2$ . Cells exposed to the vehicle alone were used as a control. After treatments, cells were washed with PBS and incubated with calcein-AM (0.25  $\mu\text{mol/L}$ ) for 30 min at 37°C in the dark. Subsequently, cells were washed and collected with trypsin and the geometric mean fluorescence intensity of 10 000 cells was determined by flow cytometry as described.

### Cellular DNA damage analysis

DNA damage was assessed by monitoring the intensity of p-H2A.X fluorescence using flow cytometry. Briefly, cells were collected with trypsin, washed in PBS and fixed in 3.7% formaldehyde for 15 min on ice. Cells were then permeabilised with 0.2% v/v Triton-X100 for 10 min and incubated with 1:400 rabbit anti-p-(S139)-H2A.X antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) for 30 min on ice. After washing in 0.1% Triton-X100 in PBS, cells were incubated with 1:400 anti-rabbit Alexa 555-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch,



Newmarket, UK) for 20 min on ice. Analysis was carried out in a FACScan flow cytometer with Flowing software.

### DNA cleavage analysis

DNA cleavage was monitored by agarose gel electrophoresis. A stock solution of pUC18 DNA was freshly prepared in Milli-Q water at a concentration of 0.5 µg/mL (1512 µmol/L nucleotides; 756 µmol/L bp). Reactions were performed by mixing 0.5 µL of pUC18 with appropriate aliquots of the compounds and 1 µL of activating agent solution (35% wt/vol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O). Cacodylate buffer (0.1 M, pH 6.0) was added to the mixture to give a final volume of 20 µL. The final concentration of pUC18 DNA was 37.8 µmol/L in nucleotides (18.9 µmol/L bp). Samples were incubated for 1 h at 37°C; reactions were quenched by adding 6 µL of a buffer solution consisting of bromophenol blue (0.25%), xylene cyanol (0.25%), and glycerol (30%). Subsequently, the samples were subjected to electrophoresis in 0.8% agarose gels in 0.5×TBE buffer (0.045 mol/L Tris, 0.045 mol/L boric acid, and 1 mmol/L EDTA) at 100 V for 1 h and 40 min. Gels were stained with ethidium bromide (10 mg/mL in TBE) for 15 min and visualized under UV transillumination. DNA bands were captured using the ProgRes CapturePro 2.7 system and the intensity of each band was quantified with the GelQuant version 2.7 software (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) using a correction factor of 1.31 to compensate for the reduced ethidium bromide uptake of supercoiled plasmid pUC18 DNA [47]. The proportion of different forms of plasmid DNA was established for each treatment. To test the involvement of ROS in strand scission and possible complex–DNA interaction sites, various ROS scavengers and groove binders were added to the reaction mixtures. The scavengers used were Tiron (10 mmol/L), sodium azide (0.4 mol/L), and dimethyl sulfoxide (DMSO, 3 µL). The groove binders used were methyl green (20 mmol/L) and Hoechst (40 µmol/L).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS statistical software for Windows (version 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Quantitative variables were expressed as mean and standard deviation (SD) of at least three independent experiments. The normality of the data was tested using the Shapiro–Wilk test. The differences between data with normal distribution and homogeneous variances were analyzed using the parametric Student's *t* test. A value of *p* < 0.05 was considered significant.

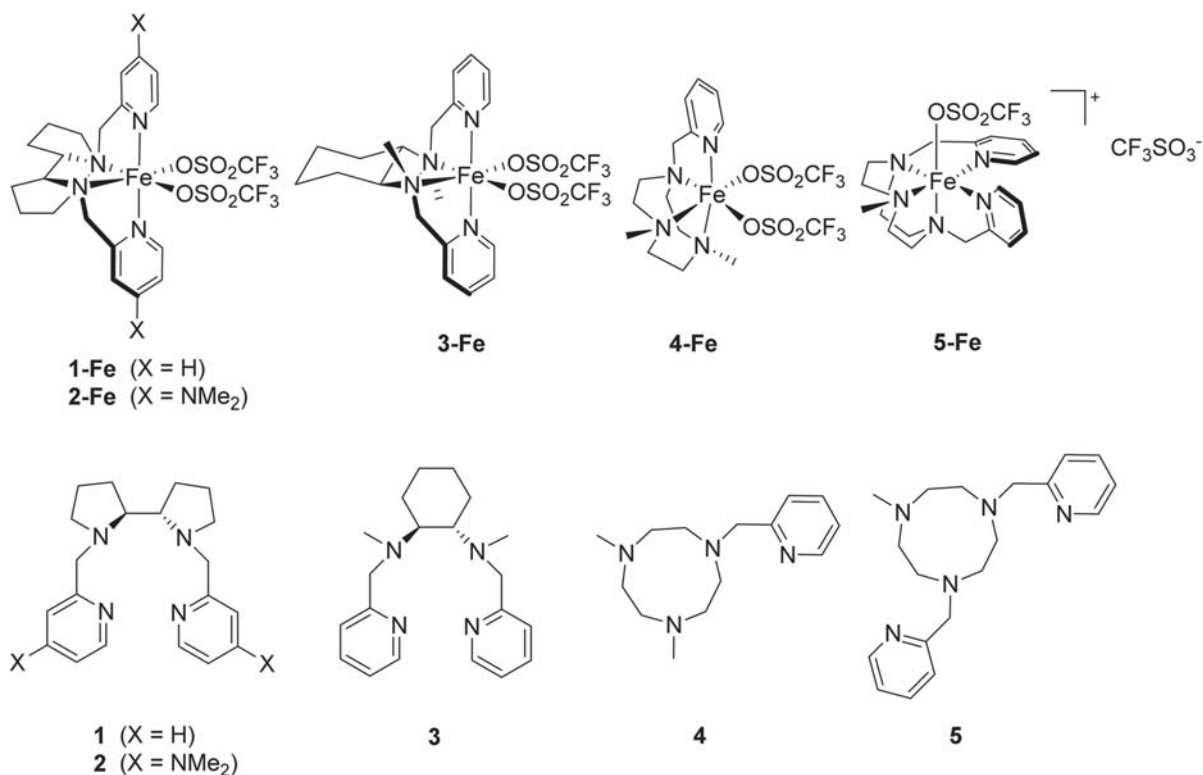
## Results

### Selection of compounds

Iron coordination complexes **1-Fe**, **2-Fe**, **3-Fe**, **4-Fe** and **5-Fe** were selected to assay their antitumor activity against different human cell lines based on their ability to form highly oxidizing species when reacting with peroxides [38–43]. Four Fe(II)-based complexes **1-Fe**, **2-Fe**, **3-Fe** and **4-Fe** contain tetradentate aminopyridine ligands and are known for their superior activity in oxidation catalysis [38–40,42,43]. Complex **5-Fe** contains a pentadentate ligand and is known to stabilize high oxidation states of iron [41]. Additionally, the iron-free organic compounds **1**, **2**, **3**, **4** and **5** were tested to evaluate the effect of metal ligation for their cytotoxic activity (Fig 1).

### Compounds **1**, **2** and **5** are highly cytotoxic against cancer and cancer stem-like cells

Antiproliferative activity of the iron complexes (**1-Fe**, **2-Fe**, **3-Fe**, **4-Fe** and **5-Fe**) and the corresponding iron-free ligands (**1**, **2**, **3**, **4** and **5**) was initially tested against two tumor cancer



**Fig 1. Structures of the iron complexes and the corresponding iron-free organic compounds.**

doi:10.1371/journal.pone.0137800.g001

cells lines, MCF-7 and CAPAN-1. Compounds were tested at different concentrations ranging from 0 to 100  $\mu\text{mol/L}$  to determine the concentration required to inhibit cell growth by 50% ( $\text{IC}_{50}$ ). Compounds with  $\text{IC}_{50}$  values greater than 100  $\mu\text{mol/L}$  were considered to be inactive. Only three of the five iron complexes (**1-Fe**, **3-Fe**, **4-Fe**) demonstrated a measurable antiproliferative effect in MCF-7 cells, while none of iron complexes were active against CAPAN-1 cells ([Table 1](#)). The antiproliferative activity of **3-Fe** and **4-Fe** was rather modest ( $\text{IC}_{50} = 73.5 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$  and  $63.5 \pm 2.1 \mu\text{mol/L}$ , respectively). In contrast, all iron-free ligands were cytotoxic in both cell lines analyzed, with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from  $3.7 \pm 0.4$  to  $88.5 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$  in MCF-7 cells and from  $6.0 \pm 0.7$  to  $32.0 \pm 10.4 \mu\text{mol/L}$  in CAPAN-1 cells. These values are within the range of well-established anticancer agents such as cisplatin assayed under the same conditions ([Table 1](#)). Given the weak antiproliferative activity of the iron complexes, we focused on the metal-free organic compounds and evaluated their cytotoxicity against a selection of tumor (PC-3, Z-138 and JURKAT) and non-malignant (HMLE, MCF 10A, 1BR3G and CCD-18Co) cell lines ([Table 2](#)). Compound **2** was the most active ligand against tumor cells, with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from  $3.8 \pm 0.2$  to  $7.2 \pm 1.9 \mu\text{mol/L}$ . Compounds **1** and **5** also exhibited low  $\text{IC}_{50}$  values (from  $4.8 \pm 1.2$  to  $15.1 \pm 3.1 \mu\text{mol/L}$  and from  $2.9 \pm 0.4$  to  $7.7 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$ , respectively), while a more moderate antitumor activity was obtained for ligands **3** and **4**. Only in the normal colon CCD-18Co cell line the activity of the compounds was lower than in tumor cells lines. Importantly, none of the ligands were hemolytic, even at 100  $\mu\text{mol/L}$  ([Table 2](#)). The antitumor

**Table 1. Cytotoxicity of the iron complexes and the corresponding ligands against MCF-7 and CAPAN-1 cells.**

Compound	Cell line	
	MCF-7	CAPAN-1
1-Fe	17.5 ± 0.9	>100
1	7.4 ± 0.2	9.9 ± 1.01
2-Fe	>100	>100
2	3.7 ± 0.4	6.0 ± 0.7
3-Fe	63.5 ± 2.1	>100
3	40.6 ± 2.5	27.7 ± 2.9
4-Fe	73.5 ± 0.7	>100
4	88.5 ± 0.7	32.0 ± 10.4
5-Fe	>100	>100
5	7.7 ± 0.3	7.9 ± 0.5
Cisplatin	2.4 ± 0.4	2.2 ± 0.3

<sup>a</sup>The IC<sub>50</sub> values were determined by the MTT assay after 48 h of compound exposure. Data represents the mean ± SD of at least three independent experiments made in triplicates.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.t001

properties of the ligands were further evaluated in a panel of cell lines, including human leukemia, lymphoma and glioma cancer cells, by analyzing their cytotoxic effects at 10 μmol/L. As anticipated, compounds **1**, **2** and **5** also displayed high antiproliferative activity against these cell lines (Fig 2A), demonstrating their ability to be broadly active antitumor agents.

To gain insight into the cytotoxic potency of ligands **1**, **2** and **5**, their antiproliferative activity was evaluated in a stable breast cancer stem (CS)-like cell line (HMLER-shEcad). This cell line was originally established from triple oncogenic transformed and immortalized human mammary epithelial cells (HMLER), wherein knockdown of E-cadherin triggered an epithelial-mesenchymal transition (EMT) that resulted in cells with features characteristic of CSCs [44,48]. As expected, CS-like HMLER-shEcad cells were more resistant to the well-known chemotherapy agent doxorubicin than non-CS-like HMLER isogenic control cells [48] (IC<sub>50</sub> = 0.3 ± 0.02 μmol/L vs 0.10 ± 0.02 μmol/L, respectively, representing a ~3-fold increase in IC<sub>50</sub>) (Fig 2B). In contrast, the cytotoxic profile of ligands **1** and **2** remained largely unaltered in CS-like

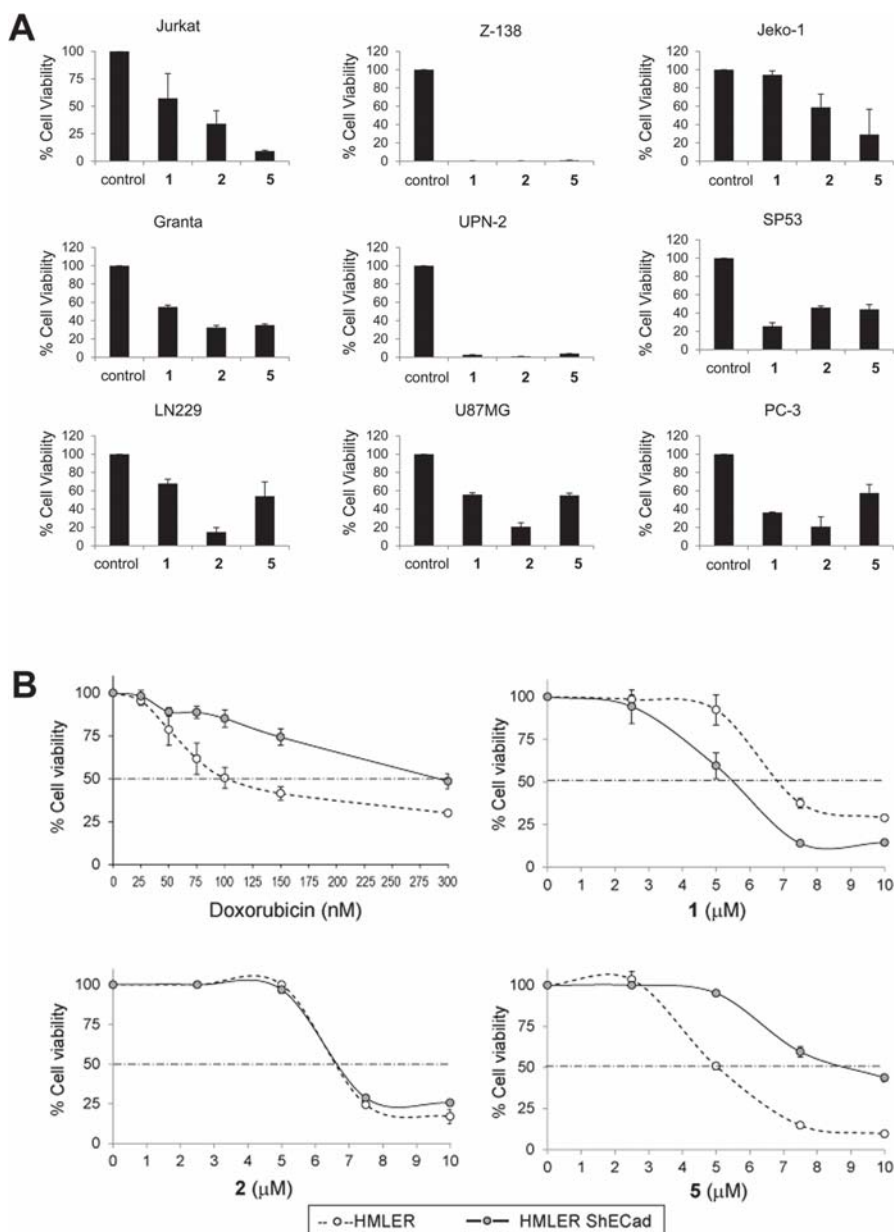
**Table 2. Cytotoxicity of 1, 2, 3, 4 and 5 against PC-3, Z-138 and JURKAT cancer cell lines and HMLE, MCF 10A, 1BR3G and CCD-18Co non malignant cells.**

Compound	Cell line							Hemolysis (%) <sup>b</sup>
	PC-3	Z-138	JURKAT	HMLE	MCF-10A	1BR3G	CCD-18Co	
1	8.5 ± 1.4	4.8 ± 1.2	15.1 ± 3.1	6.4 ± 0.4	18.8 ± 2.9	12.7 ± 1.6	27.0 ± 4.4	0
2	3.8 ± 0.2	4.4 ± 0.3	7.2 ± 1.9	7.0 ± 0.3	6.5 ± 1.3	7.5 ± 0.5	20.7 ± 0.3	0
3	35.0 ± 4.2	16.5 ± 1.4	>100	32.5 ± 3.8	39.7 ± 2.9	45.0 ± 1.0	>100	0
4	>100	23.1 ± 1.8	>100	47.7 ± 4.5	>100	78.0 ± 8.5	>100	0
5	7.7 ± 0.3	2.9 ± 0.4	5.4 ± 1.3	6.1 ± 0.1	23.8 ± 1.3	18.0 ± 4.2	53.5 ± 3.5	0

<sup>a</sup> The IC<sub>50</sub> values were determined by the MTT assay after 48 h of treatment. Data represents the mean ± SD of at least three independent experiments made in triplicates.

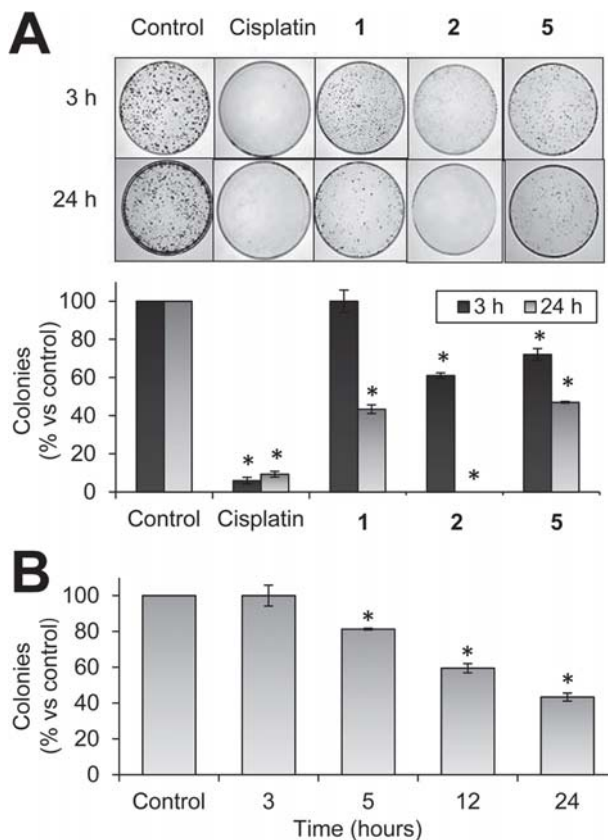
<sup>b</sup> Percentage of hemolysis at 100 μM.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.t002



**Fig 2. Cell viability assay.** (A) Cytotoxic activity of compounds **1**, **2**, and **5** against cancer cells. The indicated cell lines were treated for 48 h with ligands (10  $\mu\text{mol/L}$ ) and cell viability was measured with the MTT assay. Data represents the percentage of viable cells relative to untreated cells (control). (B) Cytotoxicity of doxorubicin and compounds **1**, **2** and **5** against CS-like cells. CS-like HMLER-shEcad cells and non-CS-like HMLER isogenic parental cells were treated for 48 h with graded concentrations of doxorubicin, **1**, **2** and **5**. Cell viability was measured with the MTT assay. For each treatment, the percentage of viable cells relative to untreated cells is indicated. Data represents the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments performed in triplicate.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.g002



**Fig 3. Clonogenic assay.** (A) Colony formation of MCF-7 cells after exposure to compounds **1**, **2** and **5** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) for 3 or 24 h. Cisplatin was included as a positive control. (B) Colony formation after exposure to compound **1** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) for 3, 5, 12 and 24 h. Bar charts show the percentage of counted colonies relative to control untreated cells and represent the mean $\pm$ SD of 3 independent experiments. \* $p < 0.05$  versus control cells.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.g003

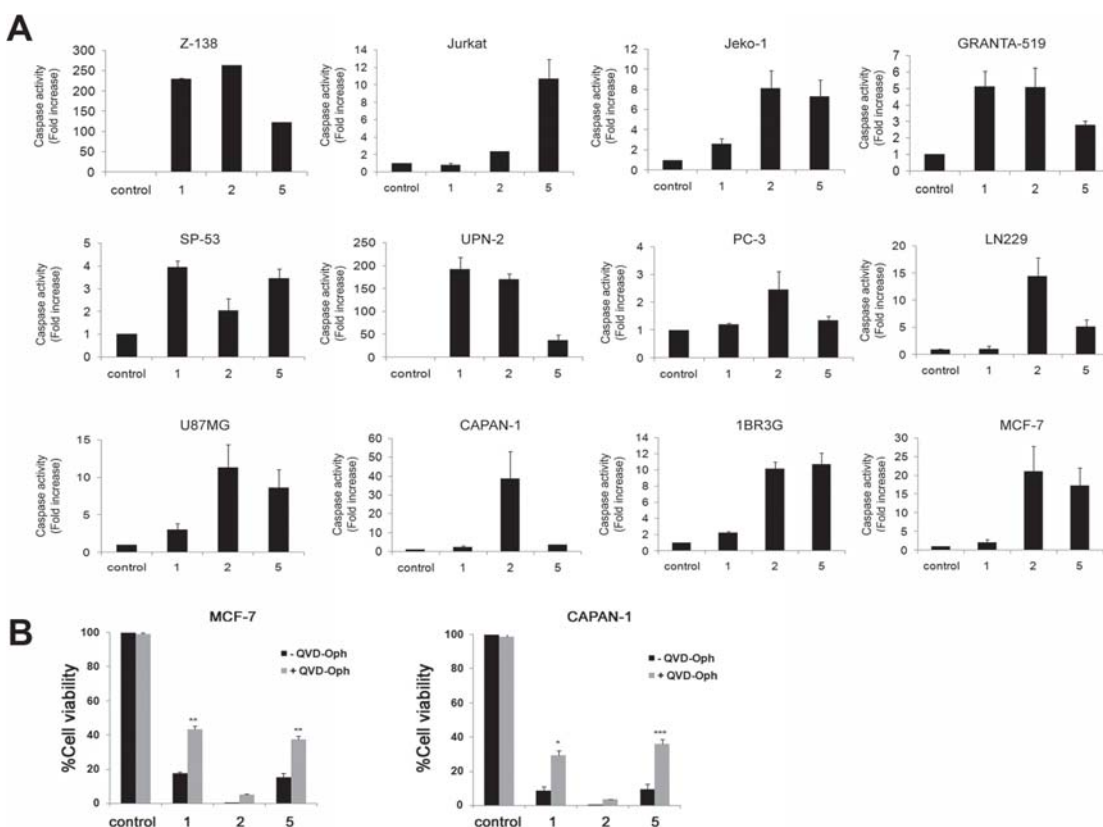
HMLER-shECad cells ( $IC_{50} = 5.3 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$  and  $6.8 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$ , respectively) relative to HMLER cells ( $IC_{50} = 6.5 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$  and  $6.6 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$ , respectively) (Fig 2B), indicating that these ligands induce cell death through a mechanism that cannot be repressed by the chemoresistant-CS-like phenotype. Moreover, compound **1** displayed some selective cytotoxicity towards HMLER-shECad cells. In contrast, HMLER-shECad exhibited some resistance to ligand **5**-induced cytotoxicity ( $IC_{50} = 8.6 \pm 0.5 \mu\text{mol/L}$  compared with  $5.1 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$  in HMLER cells) (Fig 2B).

The long-term activity of the ligands was determined by measuring their ability to inhibit the clonogenic potential of cancer cells. Thus, MCF-7 cells were treated for 3 or 24 h with 10  $\mu\text{mol/L}$  of ligand **1**, **2** or **5**, or cisplatin as a positive control, followed by plating at low density. Analysis of colony numbers after 10 days revealed a marked inhibitory effect of compound **2** on colony formation and the number of colonies was significantly reduced by 39% compared with control cells after 3 h exposure to the ligand (Fig 3A). Furthermore, the clonogenicity of MCF-7 cells was almost abolished after 24 h exposure to compound **2**, revealing a greater

inhibitory activity than cisplatin. At this time point, compounds **1** and **5** also significantly reduced the colony numbers by 57% and 53%, respectively, although their activity was lower than compound **2**, which is in agreement with the antiproliferative activity of the ligands (Table 2). In contrast to cisplatin treatment, inhibition of cell growth by ligands was time-dependent. Exposure of MCF-7 cells to ligand **1** for 3, 5, 12 and 24 h reduced the number of colonies by 0%, 18.7%, 40.5% and 56.6%, respectively (Fig 3B). These results indicate that the ligands trigger a delayed cell death mechanism that requires several hours to take place.

### Compounds **1**, **2** and **5** promote cell cycle arrest and apoptosis

To determine whether the ligands induce cellular death through the activation of programmed cell death (apoptosis), the activation of the executioner caspases, caspase-3 and -7, was analyzed using a luminometric assay in a panel of human cancer cell lines. Cells were treated with the ligands at 10  $\mu\text{mol/L}$  and caspase activity was monitored after 48 h. All three ligands activated caspase 3/7 to some extent (Fig 4). Compound **2** treatment clearly increased caspase 3/7

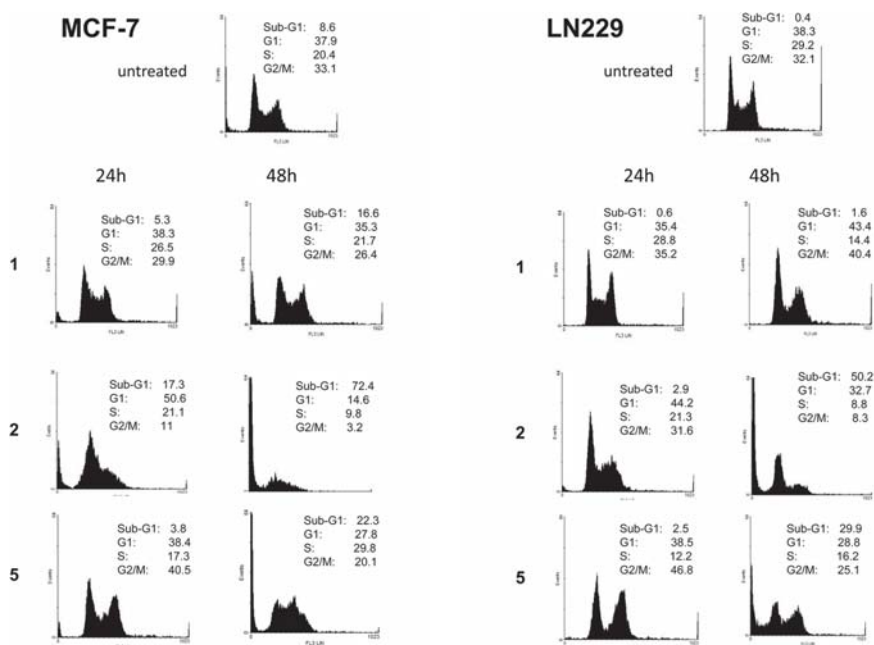


**Fig 4. Induction of caspase activity.** (A) The indicated cell lines were treated for 48 h with compounds **1**, **2** and **5** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) and caspase 3/7 activity was measured as indicated in Materials and Methods. Bar charts show the fold increase in caspase activity relative to untreated (control) and represent the mean  $\pm$ SD from three independent experiments performed in triplicate. (B) MCF-7 and CAPAN-1 cells were treated for 48 h with the ligands (10  $\mu\text{M}$ ) in the absence (-) or presence (+) of the pan-caspase inhibitor QVD-Oph (20  $\mu\text{M}$ ) and cell viability was measured with the MTT assay. The data shows the percentage of viable cells relative to untreated cells (control). Data represents the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments performed in triplicate. The differences between absence and presence of QVD-Oph treatment were statistically significant at \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0137800.g004

activity in all cell lines in comparison with untreated controls. Interestingly, treatment with compound **1** led to significant caspase 3/7 activation in lymphoma (Z-138, Jeko-1, Granta and SP-53) but not in leukemia (JURKAT) or glioma (LN229 and U87MG) cell lines. Compound **5** induced a broad pro-apoptotic effect, activating caspase 3/7 in most cell lines except PC-3 cells, and was the most effective compound against JURKAT cells (Fig 4). Importantly, these results correlate strongly with the profile of cytotoxic effects induced by compounds **1**, **2** and **5** (Fig 2A), and suggest that compounds **2** and **5** promote cell death chiefly by inducing apoptosis. These results were confirmed by analyzing the effect of caspase inhibition on the cytotoxic activity of the compounds. As shown in Fig 4B, the pan-caspase inhibitor QVD-Oph significantly reverted the cytotoxicity of compounds **1** and **5** in MCF-7 and CAPAN-1 cells inducing an increase in cell viability ranging from 2.5 to 4 fold. Noteworthy, in agreement with our previous observations, compound **2** displayed a very high cytotoxic activity, which may explain the lack of reversion in the presence of the caspase inhibitor in these experimental conditions. These findings support that the cytotoxic activity of these compounds involves caspase-dependent apoptosis.

To explore the effect of ligands on cell cycle progression, the cell cycle distribution of MCF-7 and LN229 cells was examined by flow cytometry after 24 and 48 h exposure to compounds **1**, **2** and **5** (10 µmol/L). In agreement with its robust cytotoxic activity in both cell lines, compound **2** increased the proportion of cells in G1 at 24 h, followed by a dramatic induction of apoptosis at 48 h as indicated by the increase in the sub-G1 population (Fig 5). In contrast, compound **1** exerted only a modest effect on the cell cycle, which was apparent after 48 h as indicated by a small induction of apoptosis in MCF-7 cells and a reduction in the S-phase



**Fig 5. Effect of ligands on cell cycle distribution.** MCF-7 cells (left) and LN229 cells (right) were left untreated (top) or treated with the indicated ligands (10 µmol/L) for 24 and 48 h. Cell cycle profiles were obtained by flow cytometry of propidium iodide-stained cells. The quantified percentage of cells in each cell cycle phase is indicated.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.g005

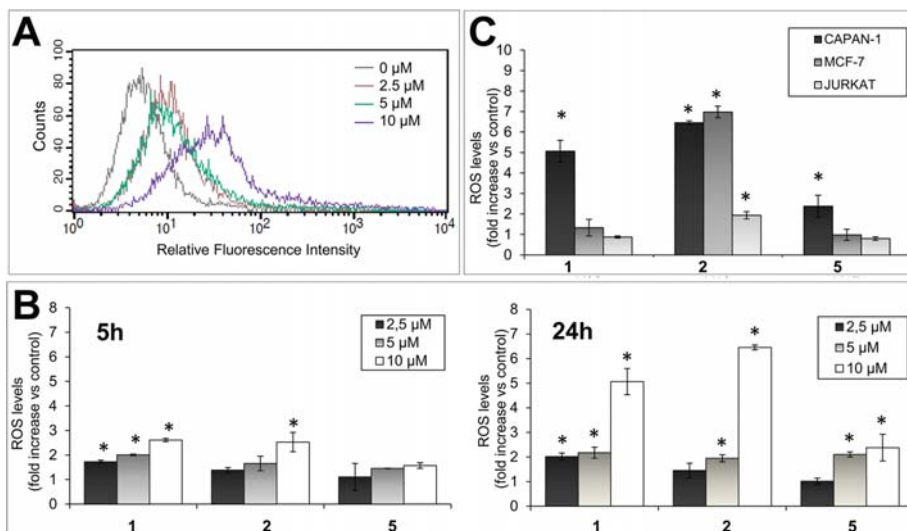


fraction in LN229 cells. Interestingly, in both cell lines, compound 5 treatment resulted in partial G2/M arrest at 24 h, followed by a marked induction of apoptosis at 48 h (Fig 5).

### Compounds 1, 2 and 5 are inducers of oxidative stress

To determine whether the compounds induce oxidative stress, ROS accumulation was evaluated in CAPAN-1 cells using the non-polar cell permeable probe H<sub>2</sub>DCFDA. Once inside cells, the acetate groups of the probe are enzymatically cleaved generating the nonfluorescent derivative H<sub>2</sub>DCF, which emits strong green fluorescence on oxidation by ROS [49]. Exposure of CAPAN-1 cells to increasing concentrations of compound 1 for 24 h resulted in a dose-dependent induction of ROS as measured by an increase in fluorescence from 5.8 (0 μmol/L) to 10.9 (2.5 μmol/L), 11.79 (5 μmol/L), and 32.6 (10 μmol/L) (Fig 6A). Exposure of CAPAN-1 cells to equal concentrations of 1, 2 and 5 for 5 and 24 h revealed that all three ligands could generate intracellular ROS in a dose- and time-dependent manner (Fig 6B). Consequently, CAPAN-1 cells exposed to compound 1 for 5 h exhibited a 1.73, 2.01 and 2.61-fold increase of ROS levels at 2.5, 5, and 10 μmol/L, respectively. Equivalent concentrations of compound 2 resulted in a 1.39, 1.66 and 2.53-fold increase in ROS (Fig 6B). At this time point, compound 5 exhibited lower oxidative activity than 1 and 2 at all concentrations. Importantly, ROS continued to be produced and, after 24 h treatment with ligands at 10 μmol/L, the intracellular ROS levels were 6.4-fold (2), 5.1-fold (1) and 2.4 fold (5) higher than in untreated cells (Fig 6B), pointing to a strong oxidative activity of the ligands in this cell line.

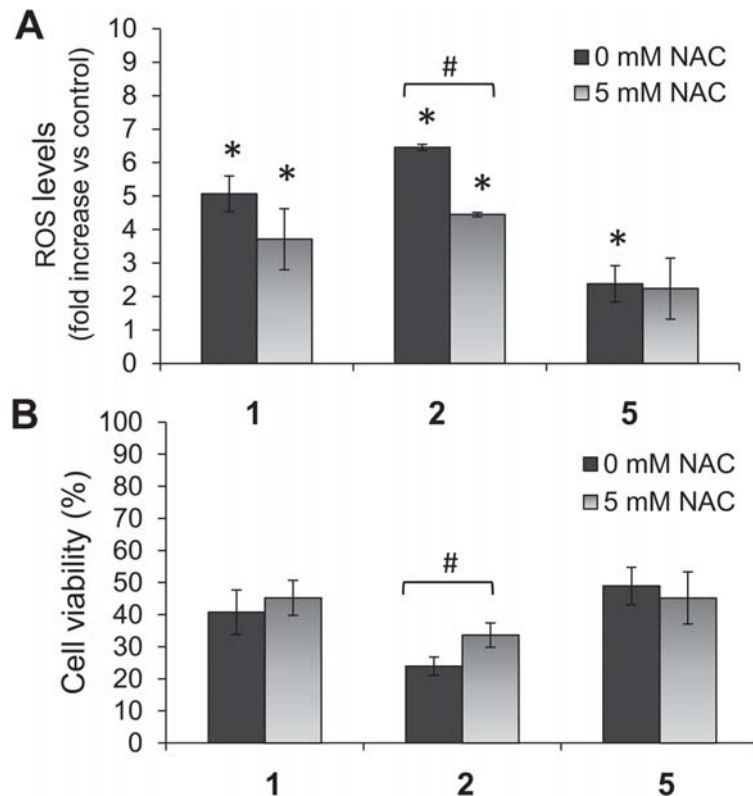
To explore the generality of ROS production, MCF-7 and JURKAT cells were likewise exposed to 10 μmol/L of compounds 1, 2 and 5 for 24 h. Results revealed a differential oxidative activity of the ligands in individual cell lines. In MCF-7 cells, compound 2 generated a significant 7-fold increase in ROS levels (Fig 6C), which was equivalent to the ROS induction



**Fig 6. Oxidative activity of ligands.** (A) CAPAN-1 cells were incubated with 0, 2.5, 5 or 10 μmol/L of compound 1 for 24 h and intracellular ROS levels were determined with H<sub>2</sub>DCFDA staining. Histogram shows the dose-dependent increase of the probe fluorescence intensity. (B) ROS levels (relative to untreated cells) after exposing CAPAN-1 cells to the indicated concentrations of compounds 1, 2 or 5 for 5 or 24 h. (C) ROS levels (relative to untreated cells) after exposing CAPAN-1, MCF7 and JURKAT cells to 10 μmol/L of 1, 2 and 5 for 24 h. Differences versus untreated control cells were considered significant at \**p* < 0.05. Data represents the mean ± SD from 3 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.g006



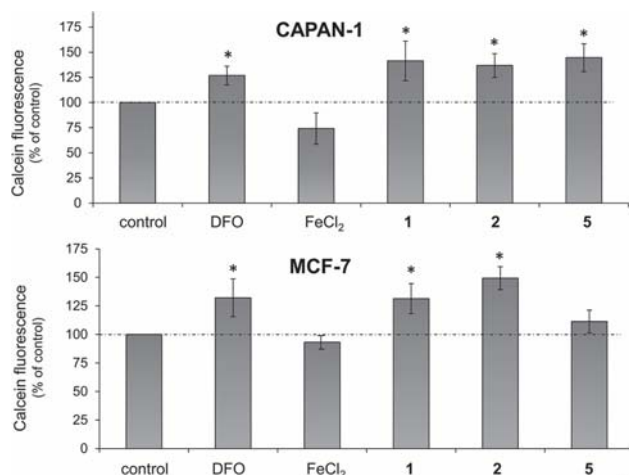


**Fig 7. Effects of NAC on compound 1, 2 and 5 activity.** CAPAN-1 cells were incubated with 10  $\mu\text{mol/L}$  of 1, 2 or 5 for 24 h with or without NAC (5 mmol/L). (A) Changes in the ROS levels were determined with  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  staining. (B) Changes in cell viability were determined by MTT assay. The results are presented as a percentage of untreated cells and represent mean $\pm$ SD of 3 independent experiments. \* $p < 0.05$  versus control cells. # $p < 0.05$  versus cells without NAC treatment.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.g007

detected in CAPAN-1 cells. The oxidative activity of compound 1 in MCF-7 cells was, however, lower than in CAPAN-1 cells. In JURKAT cells, ROS levels were significantly increased only with compound 2 (1.94 folds versus control cells; Fig 6C).

To assess the relationship between prooxidant properties and cytotoxic activity of the ligands, we studied whether the widely-used ROS scavenger N-acetylcysteine (NAC) could inhibit ligand-induced cytotoxicity. NAC treatment (5 mmol/L) reduced levels of ROS induced by compounds 1 and 2 in CAPAN-1 cells by 31.1% and 26.8%, respectively; however, the effect of NAC on the oxidative activity of 5 was more modest (Fig 7A). Furthermore, CAPAN-1 cell viability significantly increased from 23.9 $\pm$ 2.9% when exposed to compound 2 (5  $\mu\text{mol/L}$ ) in the absence of NAC to 33.6 $\pm$ 3.8% in the presence of 5 mmol/L NAC, representing a 40.6% increase in cell survival (Fig 7B). CAPAN-1 cell viability also increased from 40.7 $\pm$ 6.9% with compound 1 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) without NAC to 45.2 $\pm$ 5.4% in the presence of NAC, while no protective effect of NAC was observed for compound 5 cytotoxicity (Fig 7B).



**Fig 8. Chelating activity of 1, 2 and 5 in CAPAN-1 cells.** CAPAN-1 cells were treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  of 1, 2 or 5, deferoxamine (DFO) (100  $\mu\text{mol/L}$ ) and  $\text{FeCl}_2$  (100  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h and the intracellular labile iron was determined with calcein-AM. Data represents the mean $\pm$ SD of 3 independent experiments. \* $p < 0.05$  versus control cells.

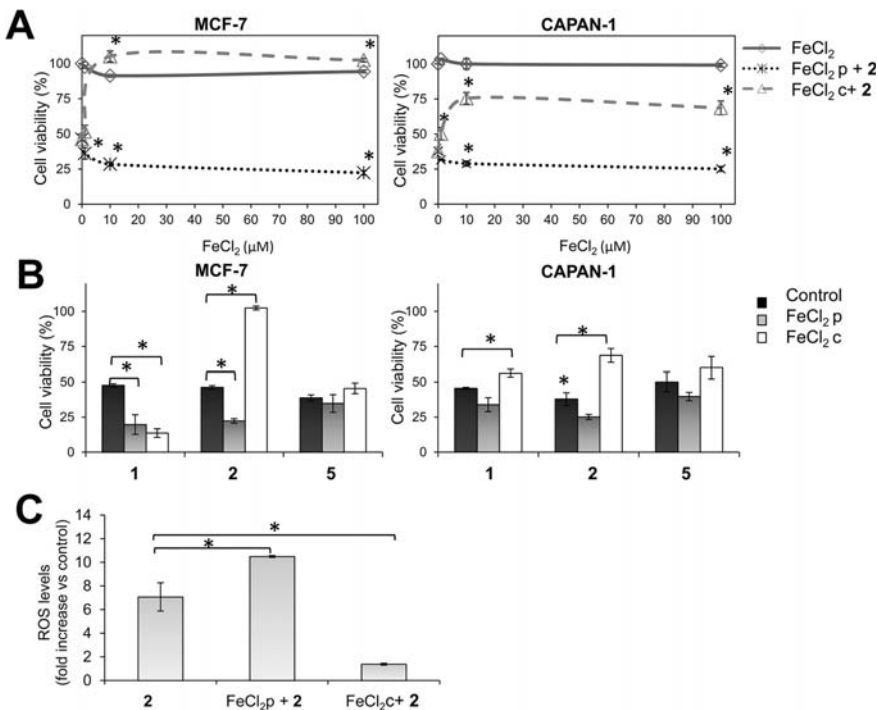
doi:10.1371/journal.pone.0137800.g008

### Compounds 1, 2 and 5 chelate intracellular labile iron

We analyzed whether ligand-induced ROS generation was associated with their strong capacity to bind iron [38–43], forming iron coordination species inside cells. Thus, the effect of compounds 1, 2 and 5 on the intracellular labile iron pool in CAPAN-1 and MCF-7 cells was determined using the iron-sensitive probe calcein-AM, a cell membrane-permeable molecule that is rapidly hydrolyzed in the cytosol to release the fluorescent probe calcein. Calcein fluorescence is quenched stoichiometrically upon binding to intracellular metals, mainly to labile iron [50,51]. The classic iron chelator agent deferoxamine (DFO) was used to estimate the labile iron pool in CAPAN-1 and MCF-7 cells [52]. Treatment of CAPAN-1 cells with ligands at 10  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h prior to incubation with calcein-AM significantly increased the fluorescence intensity of the probe to 141.4 $\pm$ 19.5% (1), 136.8 $\pm$ 11.7% (2) and 144.6 $\pm$ 13.8% (5) of untreated cells (Fig 8A), revealing a decrease in the intracellular iron content. Incubation of the cells with DFO at 100  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h resulted in a similar increase in calcein fluorescence, indicating that the cellular chelatable iron was complexed by DFO to a similar extent to the ligands (Fig 8A). In contrast, exposure of CAPAN-1 cell to 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_2$  for 24 h led to a quenching effect on calcein that resulted in a fluorescence decrease to 74.2 $\pm$ 15.5% of control cells (Fig 8A). Similar iron-binding capacity was detected for compounds 1 and 2 in MCF-7 cells since pre-incubation with the ligands significantly increased calcein fluorescence by 131.4 $\pm$ 13.2% (1) and 133.8 $\pm$ 10.02% (2) compared with untreated cells (Fig 8B), which was equivalent to the fluorescence increase observed after DFO incubation (132.1 $\pm$ 16.5%). However, only a moderate iron-chelating effect was detected for compound 5 in MCF-7 cells (Fig 8B).

### The cytotoxicity of compounds 1, 2 and 5 is not associated to intracellular iron depletion

Given the above, we addressed whether the depletion of intracellular iron by the chelating activity of the ligands plays a role in their cytotoxicity. Thus, the antiproliferative activity of



**Fig 9. Effects of iron on 1, 2 and 5 activity.** (A) Effect of 2 h FeCl<sub>2</sub> pre-incubation (FeCl<sub>2</sub> p) (dotted line) or co-incubation (FeCl<sub>2</sub> c) (dashed line) at 1, 10 or 100 μmol/L on the cytotoxicity of 2 (5 μmol/L) in MCF-7 and CAPAN-1 cells. FeCl<sub>2</sub> alone was included as a control (solid line). Cell viability was determined after 48 h of treatment by the MTT assay. (B) Effect of FeCl<sub>2</sub> pre-incubation or co-incubation (100 μmol/L) on the cytotoxicity of 2 (5 μmol/L), 1 and 5 (10 μmol/L). Cells treated with the ligands alone were included as a reference (control). (C) ROS induction in CAPAN-1 cells after 24 h treatment with 2 (10 μmol/L) alone, together with FeCl<sub>2</sub> or after FeCl<sub>2</sub> pre-incubation (at 100 μmol/L). Results are presented as a percentage of untreated cells and represent mean±SD of 3 independent experiments. \*p < 0.05 versus control cells.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.g009

compound 2 (5 μmol/L) in CAPAN-1 and MCF-7 cells was determined after pretreatment of cells with increasing concentrations of FeCl<sub>2</sub> for 2 h in order to increase the intracellular iron content and balance the depletion of iron provoked by the ligands. Cells were also exposed to equivalent concentrations of FeCl<sub>2</sub> alone to exclude any iron-induced cytotoxicity. Results showed that treatment with FeCl<sub>2</sub> alone did not affect the viability of MCF-7 or CAPAN-1 cells at any tested concentration (Fig 9A). In contrast, FeCl<sub>2</sub> pretreatment increased the cytotoxicity of compound 2 in an iron concentration-dependent manner (Fig 9A), resulting in a significant reduction in MCF-7 and CAPAN-1 cell viability by 51.8% and 37.7%, respectively, in cells pretreated with 100 μmol/L FeCl<sub>2</sub> (Fig 9B). Remarkably, when FeCl<sub>2</sub> was co-incubated with compound 2, the cytotoxic effect of the ligand in both cell lines was clearly inhibited (Fig 9A and 9B), probably because the corresponding non-active iron-complex (2-Fe) was rapidly generated in the cell culture medium. FeCl<sub>2</sub> pretreatment also significantly enhanced compound 1 cytotoxicity in MCF-7 and CAPAN-1 cells (by 58.6% and 25.5%, respectively), while FeCl<sub>2</sub> co-incubation inhibited the cytotoxicity of the ligand in CAPAN-1, but not in MCF-7 cells (Fig 9B). These findings are in agreement with our previous results showing that the corresponding iron complex (1-Fe) was cytotoxic against MCF-7 cells (IC<sub>50</sub> = 17.5 μmol/L) while it was not active against CAPAN-1 cells (IC<sub>50</sub> > 100 μmol/L). Neither pretreatment nor co-incubation

with  $\text{FeCl}_2$  affected compound **5** cytotoxicity, particularly in MCF-7 cells, which may be explained by the reduced oxidative activity of this ligand in this cell line (Fig 9B).

The enhanced cytotoxicity of compound **2** in  $\text{FeCl}_2$ -pretreated CAPAN-1 cells was associated with a significant increase in its oxidative activity, resulting in a 1.5-fold increase in ROS levels compared with non-pretreated cells. In contrast, extracellular complexation of compound **2** to iron by  $\text{FeCl}_2$  co-incubation abolished ROS induction (Fig 9C).

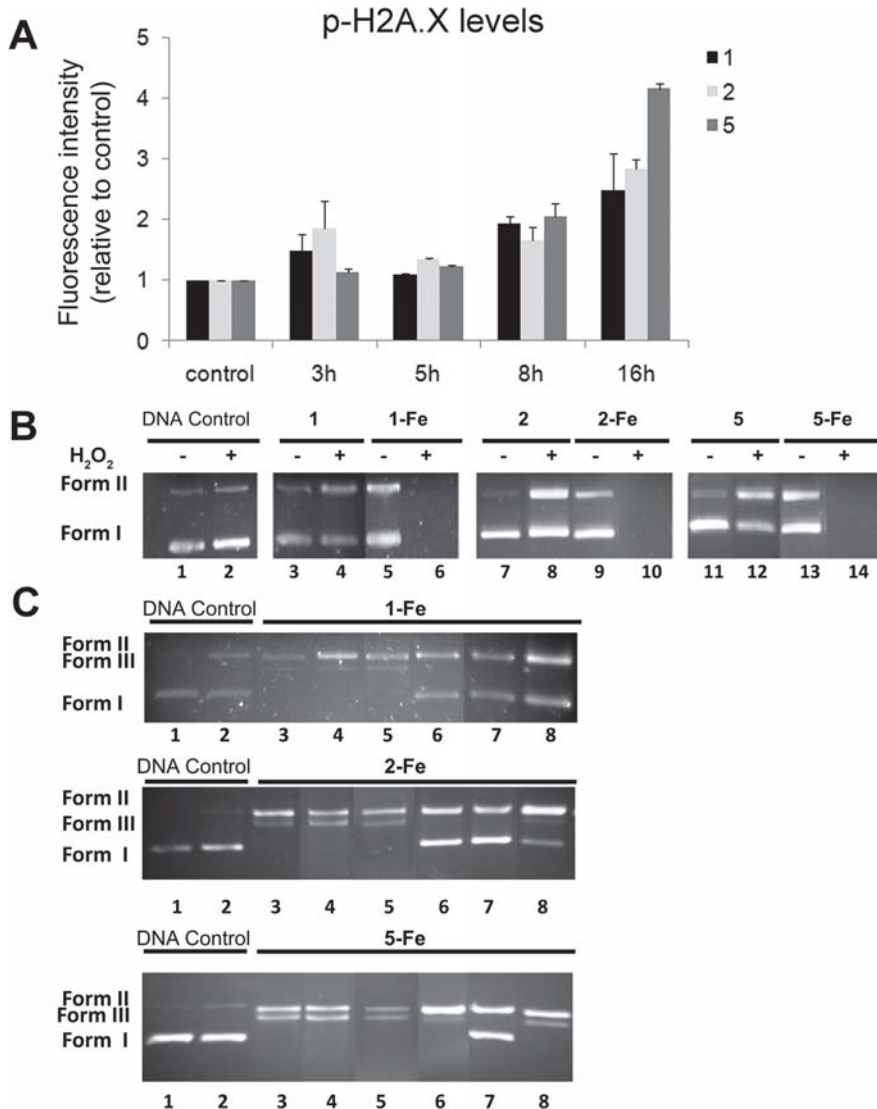
### Compounds 1, 2 and 5 induce oxidative DNA damage

The ability of compounds **1**, **2** and **5** to induce DNA damage was evaluated at the cellular level by analyzing the phosphorylation of histone H2A.X on serine 139, a well-established cellular marker of DNA double-stranded breaks [53]. Exposure to ligands (10  $\mu\text{mol/L}$ ) resulted in a time-dependent increase in phosphorylated H2A.X in MCF-7 cells, between three fold (**1** and **2**) and four fold (**5**) (Fig 10A).

To complete the analysis, we evaluated the capacity of the ligands to directly interact with DNA using supercoiled pUC18 DNA and gel electrophoresis. The nuclease activity of ligands **1**, **2** and **5** (25  $\mu\text{mol/L}$ ) and their respective iron complexes **1-Fe**, **2-Fe** and **5-Fe** (25  $\mu\text{mol/L}$ ) was measured as the extent of the conversion of supercoiled DNA (Form I) to open circular DNA (Form II) and/or linear DNA (Form III) in the presence and absence of hydrogen peroxide. As expected, **1-Fe**, **2-Fe** and **5-Fe** displayed strong nuclease activity in the presence of hydrogen peroxide, leading to a complete degradation of plasmid DNA under the conditions established for the assay (Fig 9B lanes 6, 10 and 14, respectively; Table 3). When the concentration was decreased to 15  $\mu\text{mol/L}$ , **1-Fe**, **2-Fe** and **5-Fe** were able to induce total conversion of the supercoiled DNA (Form I) to a nicked circular form (Form II) and linear form (Form III) (Fig 10C lane 3) by double strand breaks in the plasmid DNA. The relative proportions of the different forms of plasmid DNA after the treatments are detailed in Table 4. The DNA cleavage activity of the different compounds was studied in the presence of Hoechst (a minor DNA groove blocker) [54,55] and methyl green (a major DNA groove blocker) [56,57]. As shown in Fig 10C (lines 4 and 5) and Table 4, the amount of linear DNA was not reduced by addition of specific DNA groove blockers, indicating that the nuclease activity takes place without any groove selectivity. The involvement of ROS in the nuclease mechanism was confirmed by monitoring the inhibition of DNA cleavage in the presence of ROS scavengers (Fig 10C lines 6,7 and 8; Table 4) [58]. Accordingly, the addition of tiron (a superoxide radical scavenger), sodium azide (a singlet oxygen scavenger) and dimethylsulfoxide (a hydroxyl radical scavenger), reduced DNA cleavage activity of **1-Fe** and **2-Fe**, indicating the involvement of different ROS in the DNA cleavage reactions. In contrast, **5-Fe** activity was reverted only by addition of sodium azide [59], suggesting that the nuclease activity of this complex is likely to be associated with singlet oxygen generation.

### Discussion

Exploiting the differences between normal and cancer cells is an essential step to develop innovative cancer therapies. In this regard, the distinction between redox setpoints in these two cell types represents a valuable therapeutic window that might permit redox-targeting interventions to potently and selectively eliminate cancer cells with constitutively upregulated levels of ROS [5]. Theoretically, a pro-oxidant deviation that might be well tolerated by nonmalignant cells could rapidly reach a cell-death threshold in malignant cells already at a high setpoint of constitutive oxidative stress. This hypothetical scenario prompted us to study the suitability of five highly oxidant iron complexes with selected aminopyridine ligands (**1-Fe**, **2-Fe**, **3-Fe**, **4-Fe** and **5-Fe**), which were expected to be potent ROS inducers together with the corresponding



**Fig 10. Analysis of the DNA damage induced by 1, 2 and 5.** (A) Quantification of cellular DNA damage. MCF-7 cells were exposed to 10  $\mu\text{mol/L}$  1, 2 and 5 for the indicated times and the levels of p-H2A.X were quantified using flow cytometry after immunostaining with anti-pH2A.X specific antibodies. The graph represents the mean fluorescence intensity for each experimental condition, relative to untreated cells. (B) Electrophoretic analysis of DNA cleavage. Supercoiled pUC18 plasmid DNA (18.9  $\mu\text{mol/L}$ ) was incubated with ligands 1, 2 and 5 and their respective Fe(II) complexes 1-Fe, 2-Fe and 5-Fe at 25  $\mu\text{M}$  for 1 h (37°C). Lane 1, DNA control; lane 2, DNA control + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; lane 3, 5, 7, 9, 11, 13, ligand or Fe(II) complex in the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; lane 4, 6, 8, 10, 12, 14, ligand or Fe(II) complex in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (C) Effect of groove binders and ROS scavengers on the cleavage of supercoiled pUC18 plasmid DNA treated with complexes 1-Fe, 2-Fe and 5-Fe at 15  $\mu\text{mol/L}$  for 1 h (37°C) in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lane 1, DNA control; lane 2, DNA control + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; lane 3, complex control in the absence of potential inhibitors; lane 4, Hoechst 40  $\mu\text{mol/L}$ ; lane 5, methyl green 20  $\mu\text{mol/L}$ ; lane 6, Tiron 10 mmol/L; lane 7, sodium azide 0.4 mol/L; lane 8, 3  $\mu\text{L}$  of DMSO.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.g010

uncomplexed ligands, as potential antitumoral agents. Our results demonstrate that the iron complexes failed to display any relevant cytotoxic activity, whereas the iron-free organic

**Table 3. Relative proportions of different forms of plasmid DNA after 1, 1-Fe, 2, 2-Fe, 5 and 5-Fe treatments.**

Form*:	Proportion [%]	
	I	II
Untreated	86.9	13.1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	83.7	16.3
1	84.3	15.7
1 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	52.8	47.2
1-Fe	61.8	38.2
1-Fe + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	0
2	91.3	8.7
2 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	56.8	43.2
2-Fe	74.1	25.9
2-Fe + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	0
5	92.3	7.7
5 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	53.3	46.7
5-Fe	64.8	35.2
5-Fe + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	0

\* I: supercoiled form, II: open form.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.t003

counterparts were cytotoxic. In particular, compounds **1**, **2** and **5** exhibited strong antiproliferative activity against a broad panel of molecularly diverse human cancer cells with IC<sub>50</sub> values in the low micromolar range. Importantly, the cytotoxic activity profile of compounds **1** and **2** remained unaltered in EMT-induced stable populations of cancer stem-like cells, which characteristically exhibit resistance to the majority of commonly employed anti-cancer agents including the well-known ROS inducer doxorubicin [60,61].

The apparently counterintuitive cytotoxicity of the aminopyridine ligands can be explained from the studies of cellular Fe(II) chelation, which show that Fe(II) from the labile iron pool is efficiently chelated by the metal-free ligands. Thus, it appears reasonable to propose that the inactivity of the synthesized iron complexes must be related to the impossibility of charged

**Table 4. Relative proportions of different forms of plasmid DNA after 1-Fe, 2-Fe and 5-Fe treatments in the presence of groove binders and ROS scavengers.**

Form*:	Proportion [%]								
	1-Fe			2-Fe			5-Fe		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Untreated	89.2	10.8	0	99.8	0.2	0	98.1	1.9	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	59.3	40.7	0	95.5	4.5	0	94.7	5.3	0
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	82.4	17.6	0	84.0	16.0	0	56.9	43.1
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Hoescht	0	86.8	13.2	0	63.7	36.3	0	52.8	47.2
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Methyl green	0	90.7	9.3	0	78.6	21.4	0	51.0	49.0
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Tiron	47.6	52.4	0	60.7	39.3	0	0	96.7	3.3
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Sodium Azide	41.8	58.2	0	63.6	36.4	0	54.5	45.5	0
Complex + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + DMSO	57.5	42.5	0	26.0	62.7	11.3	0	74.8	25.2

\* I: supercoiled form, II: open form, III: linear form.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.t004

species to cross the cell membrane since iron conjugation confers a positive charge to the apolar nature of the ligands, leading to less lipid-soluble molecules with impaired ability to cross the cell membrane [62]. Conversely, neutral organic ligands can readily traverse the cell membrane and form the highly oxidizing iron complexes in situ [26–28, 30–31].

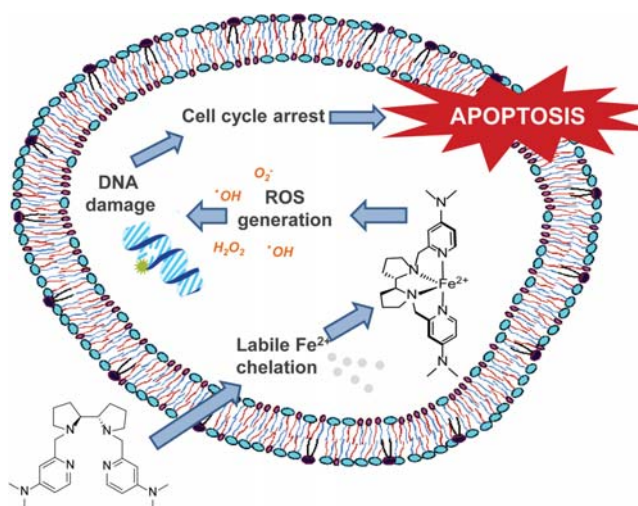
Ligands **1** and **2** were found to be strong inducers of oxidative stress, leading to a greater than 5-fold increase in ROS levels in CAPAN-1 cells. The oxidative activity of compound **5** was rather more modest. Interestingly, the kinetic profile of ROS accumulation paralleled the results obtained in clonogenic assays, indicating that prolonged exposure to ligands is required to exceed the threshold levels of oxidative damage capable of compromising cell growth. ROS accumulation strongly correlated with the induction of oxidative DNA damage and preceded the activation of caspases and the onset of apoptosis, indicating that the ligands promote delayed cell death through oxidative mechanisms. Indeed, results obtained with NAC demonstrated that ROS reduction enhanced the cellular survival to compounds **1** and **2** treatments, confirming that oxidative stress is, in part, responsible for cell death. Nevertheless, NAC had little effect on the cytotoxicity of compound **5**, suggesting that alternative mechanisms may be involved in its cytotoxicity, in agreement with its unique ability to promote G2/M arrest.

Remarkably, a lower oxidative activity of the ligands was detected in MCF-7 and JURKAT cells compared with CAPAN-1 cells, despite similar cytotoxicity. The vulnerability of cancer cells to oxidative stress is greatly dependent on the particular pathways dysregulated in the cells as well as on their antioxidative capacities [6,63]. Consequently, different alterations in ROS levels may lead to similar cytotoxic outcomes in different tumors. For instance, chronic lymphocytic leukemia lymphocytes are reported to have a predominant oxidative stress status, which may favor an enhanced cytotoxic response to prooxidant interventions [64,65]. Nonetheless, it cannot be ruled out that other mechanisms may be contributing to the cytotoxic activity of the ligands, particularly for compound **5**.

We examined whether the depletion of intracellular iron by the chelating activity of the ligands may be involved in their antitumor activity. Iron is essential for cell growth and DNA synthesis, and iron deprivation can lead to cellular death [66,67]. Different studies and clinical trials have demonstrated that iron-chelators are effective anti-cancer agents [68–70]. Our results showed that iron overload with  $\text{FeCl}_2$  salts failed to reverse the cytotoxic activity of the ligand in cells. On the contrary, higher intracellular iron levels led to increased cytotoxicity of the compounds presumably because the intracellular formation of the oxidizing iron-complexes was enhanced, resulting in a significant increase in the amount of ROS. Hence, the anti-tumor effect of the ligands relies on their strong oxidative activity rather than their iron-chelating capacity. These experiments also confirmed that the extracellular generation of iron-complexes by co-incubation of the ligands with  $\text{FeCl}_2$  salts clearly inhibits their cytotoxic activity.

Different anticancer compounds with metal binding properties can induce DNA strand breaks when binding redox active metals in the presence of oxygen [71]. The bleomycin family of glycopeptide antibiotics constitutes paradigmatic examples with utility in current chemotherapy. It is well established that bleomycin cytotoxicity is founded on a metal-dependent prooxidant mechanism that leads to DNA fragmentation. Bleomycin binds ferrous iron and  $\text{O}_2$  and after one-electron reduction in vivo produces an activated intermediate, a ferric hydroperoxide species [BLM-Fe(III)-OOH], which cleaves DNA by hydrogen abstraction [5]. Similarly, ligands **1**, **2** and **5** demonstrated DNA cleavage activity in cells, with kinetics that mirrored intracellular ROS accumulation. Analysis of the interaction of ligands with naked DNA revealed that only the Fe-complexed ligands displayed nuclease activity by inducing double strand breaks in the DNA in the presence of hydrogen peroxide. The DNA cleavage activity was quenched by different ROS scavengers, revealing that the nuclease activity of **1-Fe** and





**Fig 11. Mode of action of the amine-pyridine ligands.** The cytotoxic activity of amine-pyridine ligands involves different inter-dependent processes: intracellular Fe(II) chelation, generation of ROS, DNA fragmentation through oxidative mechanisms, induction of cell cycle arrest and apoptosis.

doi:10.1371/journal.pone.0137800.g011

2-Fe involve different ROS, while the activity of 5-Fe is likely to be associated to singlet oxygen generation. Further, the nuclease activity took place without any DNA groove selectivity. Collectively, these results indicate that once bound to intracellular iron, the ligands induce a strong oxidative DNA damage through ROS, which results in double-stranded DNA breaks.

The anti-cancer activity of amine-pyridine-based iron complexes relies on different inter-dependent processes, involving intracellular Fe(II) chelation, generation of ROS, DNA fragmentation through oxidative mechanisms, induction of cell cycle arrest and apoptosis (Fig 11). This mode of action is clearly associated with the observed cytotoxic effects of 1 and 2. Additional mechanisms may be involved in the anticancer activity of 5, which displays similar anti-proliferative and proapoptotic activities but limited generation of ROS.

Cancer cells have increased steady-state ROS levels and are likely to be more vulnerable to damage by further ROS insults induced by exogenous agents [1,72]. Indeed, the cell-killing activity of the vast majority of currently used anti-cancer therapies is mostly related to a commonly shared ability, directly or indirectly, to generate ROS [69]. Accordingly, drug resistance phenotypes, including those of multidrug resistant tumor- and metastasis-initiating CS-like cellular states, can be explained in terms of resistance to ROS-induced apoptotic killing. In a call for a much faster timetable for developing new curative anti-cancer strategies, it has been recently proposed that greater efforts must be made on “oxidative therapy” as a strategy against the current incurability of metastatic cancers [7]. Although it is acknowledged that future studies will have to confirm any beneficial *in vivo* effects and the nature of interaction as cocktail partners either with current ROS-generating radio- and chemo-therapeutic regimens or with the newer therapies that do not directly generate ROS, our current findings illustrate that, upon chelation of intracellular iron, the pro-oxidant activity of amine-pyrimidine-based iron complexes efficiently kills cancer and ROS-refractory cancer stem-like cells. Thus, our study provides functional evidence for promising redox-directed anti-cancer metallodrugs.



## Acknowledgments

We are greatly indebted to Prof. Robert A. Weinberg (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA) for providing the HMLE, HMLER<sup>shCntrl</sup> and HMLER<sup>shEcad</sup> cells used in this work.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAM JAM PV MC XR AM. Performed the experiments: MGB CAL JQ PV AM. Analyzed the data: MGB SFM JAM PV MC XR AM. Contributed reagents/materials/analysis tools: OC JAM XR MC. Wrote the paper: MGB MAM JAM PV MC XR AM.

## References

1. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11: 85–95. doi: [10.1038/nrc2981](https://doi.org/10.1038/nrc2981) PMID: [21258394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21258394/)
2. Phan LM, Yeung S-CJ, Lee M-H. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol Med*. 2014; 11: 1–19. doi: [10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001](https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001) PMID: [24738035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24738035/)
3. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol*. 2008; 18: 165–73. doi: [10.1016/j.tcb.2008.01.006](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.01.006) PMID: [18296052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18296052/)
4. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*. 2009; 136: 823–37. doi: [10.1016/j.cell.2009.02.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.024) PMID: [19269363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19269363/)
5. Wondrak GT. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11: 3013–69. doi: [10.1089/ARS.2009.2541](https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2541) PMID: [19496700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19496700/)
6. Montero AJ, Jassem J. Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. *Drugs*. 2011; 71: 1385–96. doi: [10.2165/11592590-000000000-00000](https://doi.org/10.2165/11592590-000000000-00000) PMID: [21812504](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21812504/)
7. Watson J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biol*. 2013; 3: 120144. doi: [10.1098/rsob.120144](https://doi.org/10.1098/rsob.120144) PMID: [23303309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23303309/)
8. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013; 12: 931–47. doi: [10.1038/nrd4002](https://doi.org/10.1038/nrd4002) PMID: [24287781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24287781/)
9. Kidd P. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern Med Rev*. 1997; 2: 155–176.
10. Powis G, Montfort WR. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41: 261–95. 1 PMID: [11264458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11264458/)
11. Giannoni E, Buricchi F, Raugeli G, Ramponi G, Chiarugi P. Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol Cell Biol*. 2005; 25: 6391–6403. PMID: [16024778](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16024778/)
12. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 2003; 17: 1195–214. PMID: [12832285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12832285/)
13. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar B a. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 2010; 38: 96–109. doi: [10.1177/0192623309356453](https://doi.org/10.1177/0192623309356453) PMID: [20019356](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20019356/)
14. Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: A diabolic liaison. *International Journal of Cell Biology*. 2012.
15. Laurent A, Nicco C, Chéreau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, et al. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res*. 2005; 65: 948–956. PMID: [15705895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15705895/)
16. Zhou S, Palmeira CM, Wallace KB. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol Lett*. 2001; 121: 151–157. PMID: [11369469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11369469/)
17. Manoury B, Nenau S, Leclerc O, Guenon I, Boichot E, Planquois JM, et al. The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2005; 6: 11. PMID: [15663794](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15663794/)
18. Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2009. pp. 223–242. doi: [10.1016/j.etp.2008.09.003](https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.09.003) PMID: [18986801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18986801/)

19. Alexandre J, Batteux F, Nicco C, Chreau C, Laurent A, Guillevin L, et al. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2006; 119: 41–48. PMID: [16450384](#)
20. Nguyen L V., Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature Reviews Cancer*. 2012.
21. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8: 755–768. doi: [10.1038/nrc2499](#) PMID: [18784658](#)
22. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009; 458: 780–783. doi: [10.1038/nature07733](#) PMID: [19194462](#)
23. Shi X, Zhang Y, Zheng J, Pan J. Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 16: 1215–28. doi: [10.1089/ars.2012.4529](#) PMID: [22316005](#)
24. Wang K, Zhang T, Dong Q, Nice EC, Huang C, Wei Y. Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Death Dis*. 2013; 4: e537. doi: [10.1038/cddis.2013.50](#) PMID: [23492768](#)
25. Jin Y, Lu Z, Ding K, Li J, Du X, Chen C, et al. Antineoplastic mechanisms of niclosamide in acute myelogenous leukemia stem cells: inactivation of the NF-kappaB pathway and generation of reactive oxygen species. *Cancer Res*. 2010; 70: 2516–2527. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-09-3950](#) PMID: [20215516](#)
26. Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2004; 431: 997–1002. PMID: [15496926](#)
27. Townsend DM, He L, Hutchens S, Garrett TE, Pazoles CJ, Tew KD. NOV-002, a glutathione disulfide mimetic, as a modulator of cellular redox balance. *Cancer Res*. 2008; 68: 2870–2877. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-07-5957](#) PMID: [18413755](#)
28. Montero a J, Diaz-Montero CM, Deutsch YE, Hurley J, Koniaris LG, Rumboldt T, et al. Phase 2 study of neoadjuvant treatment with NOV-002 in combination with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel in patients with HER-2 negative clinical stage II-IIIc breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 132: 215–23. doi: [10.1007/s10549-011-1889-0](#) PMID: [22138748](#)
29. Wu J, Henderson C, Feun L, Van Veldhuizen P, Gold P, Zheng H, et al. Phase II study of darinaparsin in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs*. 2010; 28: 670–676. doi: [10.1007/s10637-009-9286-9](#) PMID: [19565187](#)
30. Efferth T. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. *Drug Resistance Updates*. 2005. pp. 85–97. PMID: [15878303](#)
31. Thomas SR, Khuntia D. Motexafin gadolinium: a promising radiation sensitizer in brain metastasis. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2011. pp. 195–203. doi: [10.1517/17460441.2011.546395](#) PMID: [22647136](#)
32. Loor G, Kondapalli J, Schriewer JM, Chandel NS, Vanden Hoek TL, Schumacker PT. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49: 1925–1936. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.021](#) PMID: [20937380](#)
33. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radic Biol Med*. 1985; 1: 3–25. PMID: [3013969](#)
34. Mojžišová G, Mojžiš J, Vašková J. Organometallic iron complexes as potential cancer therapeutics. *Acta Biochim Pol*. 2014; 61: 651–654. PMID: [25522226](#)
35. Jungwirth U, Kowol CR, Keppler BK, Hartinger CG, Berger W, Heffeter P. Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15: 1085–127. doi: [10.1089/ars.2010.3663](#) PMID: [21275772](#)
36. Sun RW-Y, Ma D-L, Wong EL-M, Che C-M. Some uses of transition metal complexes as anti-cancer and anti-HIV agents. *Dalton Trans*. 2007; 4884–92. PMID: [17992273](#)
37. Fatfat M, Merhi R, Rahal O, Stoyanovsky D a, Zaki A, Haidar H, et al. Copper chelation selectively kills colon cancer cells through redox cycling and generation of reactive oxygen species. *BMC Cancer*. 2014; 14: 527. doi: [10.1186/1471-2407-14-527](#) PMID: [25047035](#)
38. Costas M, Que L. Ligand topology tuning of iron-catalyzed hydrocarbon oxidations. *Angew Chemie—Int Ed*. 2002; 41: 2179–2181.
39. Cusso O, Garcia-Bosch I, Ribas X, Lloret-Fillol J, Costas M. Asymmetric epoxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by manipulating the electronic properties of non-heme iron catalysts. *J Am Chem Soc*. 2013; 135: 14871–14878. doi: [10.1021/ja4078446](#) PMID: [24060452](#)

40. Company A, Gómez L, Gü Ell M, Ribas X, Luis JM, et al. Alkane hydroxylation by a nonheme iron catalyst that challenges the heme paradigm for oxygenase action. *J Am Chem Soc.* 2007; 129: 15766–15767. PMID: [18052284](#)
41. Company A, Sabenya G, González-Bójar M, Gómez L, Clémancey M, Blondin G, et al. Triggering the generation of an iron(IV)-oxo compound and its reactivity toward sulfides by RuII photocatalysis. *J Am Chem Soc.* 2014; 136: 4624–4633. doi: [10.1021/ja412059c](#) PMID: [24568126](#)
42. Chen MS, White MC. A predictably selective aliphatic C-H oxidation reaction for complex molecule synthesis. *Science.* 2007; 318: 783–787. PMID: [17975062](#)
43. Canta M, Font D, Gómez L, Ribas X, Costas M. The Iron(II) Complex [Fe(CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(mcp)] as a Convenient, Readily Available Catalyst for the Selective Oxidation of Methylenic Sites in Alkanes. *Adv Synth Catal.* 2014; 356: 818–830.
44. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell.* 2008; 133: 704–715. doi: [10.1016/j.cell.2008.03.027](#) PMID: [18485877](#)
45. Barragán F, Carrion-Salip D, Gómez-Pinto I, González-Cantó A, Sadler PJ, de Llorens R, et al. Somatostatin subtype-2 receptor-targeted metal-based anticancer complexes. *Bioconjug Chem.* 2012; 23: 1838–55. PMID: [22871231](#)
46. Badosa E, Ferré R, Planas M, Feliu L, Besalú E, Cabrefiga J, et al. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides.* 2007; 28: 2276–2285. PMID: [17980935](#)
47. Li Q, Browne WR, Roelfes G. DNA cleavage activity of Fe(II)N4Py under photo irradiation in the presence of 1,8-naphthalimide and 9-aminoacridine: unexpected effects of reactive oxygen species scavengers. *Inorg Chem.* 2011; 50: 8318–25. doi: [10.1021/ic2008478](#) PMID: [21780766](#)
48. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, et al. Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. *Cell.* 2009; 138: 645–659. doi: [10.1016/j.cell.2009.06.034](#) PMID: [19682730](#)
49. Hempel Stephen L., Buettner Garry R., O'Malley Yunxia Q., Duane A. Wessels DMF. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 146–159. PMID: [10443931](#)
50. Cabantchik ZI, Glickstein H, Milgram P, Breuer W. A fluorescence assay for assessing chelation of intracellular iron in a membrane model system and in mammalian cells. *Anal Biochem.* 1996; 233: 221–7. PMID: [8789722](#)
51. Kakhlon O and CZI. The labile Iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 1037–1046. PMID: [12374615](#)
52. Richardson DR. Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2002. pp. 267–281. PMID: [12050019](#)
53. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX Phosphorylation : Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids.* 2010; 2011: 1–9.
54. Frau S, Bernadou J, Meunier B. Hoechst 33258, a specific DNA minor groove binder. *Bull Soc Chim Fr.* 1996; 133: 1053–1070.
55. García-Giménez JL, Alzuet G, González-Álvarez M, Castiñeiras A, Liu-González M, Borrás J. A dinuclear copper(II) complex with adeninate bridge ligands and prominent DNA cleavage activity. Structural and spectroscopic characterization and magnetic properties. *Inorg Chem.* 2007; 46: 7178–7188. PMID: [17630687](#)
56. Kim SK, Norden B. Methyl green: A DNA major-groove binding drug. *FEBS Lett.* 1993; 315: 61–64. PMID: [8416812](#)
57. Borrás J, Alzuet G, González-Álvarez M, García-Giménez JL, Macías B, Liu-González M. Efficient DNA cleavage induced by copper(II) complexes of hydrolysis derivatives of 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine in the presence of reducing agents. *Eur J Inorg Chem.* 2007; 822–834.
58. García-Giménez JL, González-Álvarez M, Liu-González M, Macías B, Borrás J, Alzuet G. Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with N-(9H-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocy. *J Inorg Biochem.* 2009; 103: 923–34. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2009.04.003](#) PMID: [19428113](#)
59. Zhang X, Rosenstein BS, Wang Y, Lebwohl M, Wei H. Identification of possible reactive oxygen species involved in ultraviolet radiation-induced oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23: 980–985. PMID: [9358240](#)

60. Eyler CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 2839–2845. doi: [10.1200/JCO.2007.15.1829](https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.1829) PMID: [18539962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18539962/)
61. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100: 672–679. doi: [10.1093/jnci/djn123](https://doi.org/10.1093/jnci/djn123) PMID: [18445819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18445819/)
62. Liu ZD, Hider RC. Design of iron chelators with therapeutic application. *Coord Chem Rev*. 2002; 232: 151–171.
63. Fang J, Nakamura H, Iyer a K. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target*. 2007; 15: 475–86. PMID: [17671894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17671894/)
64. Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med*. 2001; 30: 1286–1292. PMID: [11368926](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11368926/)
65. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: From highly fatal to highly curable. *Blood*. 2008. pp. 2505–2515. doi: [10.1182/blood-2007-07-102798](https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-102798) PMID: [18299451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18299451/)
66. Kalinowski DS, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev*. 2005; 57: 547–583. PMID: [16382108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16382108/)
67. Merlot AM, Kalinowski DS, Richardson DR. Novel Chelators for Cancer Treatment: Where Are We Now? *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013, 18(8): 973–1006
68. Yu Y, Gutierrez E, Kovacevic Z, Saletta F, Obeidy P, Suryo Rahmanto Y, et al. Iron chelators for the treatment of cancer. *Curr Med Chem*. 2012; 19: 2689–2702. PMID: [22455580](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22455580/)
69. Whitnall M, Howard J, Ponka P, Richardson DR. A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 14901–6. PMID: [17003122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17003122/)
70. Lovejoy DB, Jansson PJ, Brunk UT, Wong J, Ponka P, Richardson DR. Antitumor activity of metal-chelating compound Dp44mT is mediated by formation of a redox-active copper complex that accumulates in lysosomes. *Cancer Res*. 2011; 71: 5871–5880. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-11-1218](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1218) PMID: [21750178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21750178/)
71. Hecht SM. Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *J Nat Prod*. 2000; 63: 158–68. PMID: [10650103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10650103/)
72. Torti S V, Torti FM. Iron and Cancer: More Ore To Be Mined. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13: 342–355. doi: [10.1038/nrc3495](https://doi.org/10.1038/nrc3495) PMID: [23594855](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23594855/)



Delivering aminopyridine ligands into cancer cells through conjugation to the cell-penetrating peptide BP16. Soler M, González-Bártulos M, Figueras E, Massaguer A, Feliu L, Planas M, Ribas X, Costas M. *Org Biomol Chem*. 2016 Apr 26;14(17):4061-70.

Copyright © 2016 Royal Society of Chemistry





Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 4061

## Delivering aminopyridine ligands into cancer cells through conjugation to the cell-penetrating peptide BP16†

M. Soler,<sup>a,b</sup> M. González-Bártulos,<sup>a,c</sup> E. Figueras,<sup>b</sup> A. Massaguer,<sup>\*c</sup> L. Feliu,<sup>\*b</sup> M. Planas,<sup>\*b</sup> X. Ribas<sup>\*a</sup> and M. Costas<sup>\*a</sup>

Peptide conjugates incorporating the N-based ligands <sup>Me2</sup>PyTACN or (S,S')-BPBP at the N- or the C-terminus of the cell-penetrating peptide **BP16** were synthesized (PyTACN-BP16 (**BP341**), BP16-PyTACN (**BP342**), BPBP-BP16 (**BP343**), and BP16-BPBP (**BP344**)). Metal binding peptides bearing at the N-terminus the ligand, an additional Lys and a β-Ala were also prepared (PyTACN-βAK-BP16 (**BP345**) and BPBP-βAK-BP16 (**BP346**)). Moreover, taking into account the clathrin-dependent endocytic mechanism of **BP16**, the enzymatic cleavable tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly was incorporated between the ligand and the N- or C-terminus of **BP16** (BPBP-GFLG-BP16 (**BP347**) and BP16-GFLG-BPBP (**BP348**)). Analysis of the cytotoxicity of all the peptide conjugates showed that: (i) the position of the ligand influenced the IC<sub>50</sub> values, (ii) the incorporation of the βAla-Lys dipeptide rendered non active sequences, (iii) peptide conjugates derived from the (S,S')-BPBP ligand were more active than those bearing <sup>Me2</sup>PyTACN, and (iv) the introduction of the cleavable tetrapeptide significantly enhanced the activity of the BPBP conjugates (IC<sub>50</sub> of 4.3 to 11.7 μM (**BP347** and **BP348**) compared to 26.0 to >50 μM (**BP343**, **BP344** and **BP346**)). The most active peptide was BPBP-GFLG-BP16 (**BP347**) (IC<sub>50</sub> of 4.3 to 5.0 μM). This high activity was attributed to its high internalization in MCF-7 cells, as shown by flow cytometry, and to the subsequent release of the ligand by the intracellular cleavage of the enzyme-labile spacer, as observed in cathepsin B enzymatic assays. Therefore, these results pave the way for the design of novel peptide conjugates to be used in pro-oxidant anticancer therapies.

Received 1st March 2016,

Accepted 1st April 2016

DOI: 10.1039/c6ob00470a

www.rsc.org/obc

## Introduction

Great strides have been made in recent years in finding effective cancer treatments. Despite the significant efforts invested in this field, current anticancer therapies are hindered by the poor solubility of drugs as well as their low cellular uptake and lack of selectivity. In this sense, targeted drug

delivery has emerged as a convenient strategy to overcome these limitations.<sup>1–6</sup> Peptide-mediated drug delivery constitutes a powerful and versatile tool to enhance the uptake and trigger the release of therapeutic agents into cancer cells.<sup>7–9</sup> In particular, one of the most common approaches to facilitate the cellular uptake of anticancer drugs is based on their conjugation to a cell-penetrating peptide (CPP).<sup>10–23</sup> On the other hand, the efficacy of the drug can be further increased by its conjugation to a CPP bearing an enzyme-cleavable moiety which could allow its intracellular release.<sup>8</sup> Despite the exact mode of action of CPPs is not well understood, it is generally accepted that CPPs are mainly internalized by endocytosis.<sup>24</sup> Following this pathway, they will end up inside lysosomes where lysosomal proteases are expected to hydrolytically cleave drugs from CPPs incorporating specific cleavage sites recognized by these enzymes.<sup>7,8,13</sup> For example, cathepsin B is able to promote the pH-sensitive release of therapeutic agents from CPPs holding the tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly.<sup>25</sup> The resulting peptide conjugates have been successfully used in drug delivery strategies.<sup>26–30</sup>

Recently, we have identified KKLFFKKILKKL-NH<sub>2</sub> (**BP16**) from a library of antimicrobial undecapeptides as a novel CPP.

<sup>a</sup>OBIS-CAT Research Group, Institut de Química Computacional i Catàlisi (IQCC) and Departament de Química, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Catalonia, Spain. E-mail: xavi.ribas@udg.edu, miquel.costas@udg.edu

<sup>b</sup>LIPPSO, Departament de Química, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Catalonia, Spain. E-mail: lidia.feliu@udg.edu, marta.planas@udg.edu

<sup>c</sup>Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi, E-17071 Girona, Catalonia, Spain. E-mail: anna.massaguer@udg.edu

† Electronic supplementary information (ESI) available: Materials and methods; cell lines; synthesis of the metal binding peptides **BP343**, **BP344**, **BP345**, **BP346**, **BP349** and **BP350**; schemes of the synthesis of the (S,S')-BPBP derivative **4** and of the metal binding peptides **BP342**, **BP344**, **BP348** and **BP350**; NMR and mass spectra of compounds for the synthesis of **4**; HPLC, ESI-MS and HRMS of peptide conjugates; HPLC and HRMS of 5(6)-carboxyfluorescein-labeled peptides. See DOI: 10.1039/c6ob00470a





**BP16** efficiently internalizes into cancer cells mainly through a clathrin-dependent endocytic mechanism and is an excellent vector for the intracellular delivery of the DNA-alkylating drug chlorambucil (CLB).<sup>31</sup> Besides, the incorporation of the cleavable spacer Gly-Phe-Leu-Gly in CLB-BP16 conjugates allows the selective release of CLB, leading to a further increase of the efficacy of this drug obtaining IC<sub>50</sub> values in the very low micromolar range.<sup>30</sup>

Transition metal complexes can interfere in cellular redox chemistry through metal or ligand based redox processes. Targeting the redox balance in cancer cells might promote irreversible damage through reactive oxygen species (ROS)-mediated mechanisms.<sup>32–35</sup> In this context, nitrogen rich tetradentate aminopyridine ligands 1,4-dimethyl-7-(2-pyridylmethyl)-1,4,7-triazacyclononane (<sup>Me2</sup>PyTACN) and (2*S*,2'*S'*)-1,1'-bis(pyrid-2-ylmethyl)-2,2'-bipyrrrolidine ((*S,S'*)-BPBP) and their transition metal complexes have been described to form powerful oxidation species upon reaction with peroxides. These species resemble those operating in nonheme iron dependent enzymes, and have found use in the catalytic oxidation of organic substrates.<sup>36–44</sup> Interestingly, it has been recently demonstrated that <sup>Me2</sup>PyTACN and (*S,S'*)-BPBP ligands are able to chelate intracellular iron in cancer cells and that the resulting redox-active moieties promote apoptosis *via* iron-dependent pro-oxidant mechanisms.<sup>45</sup> Therefore, we envisioned that the intracellular delivery of <sup>Me2</sup>PyTACN and (*S,S'*)-BPBP ligands into cancer cells could constitute an effective approach to obtain promising redox-directed anticancer agents.

On the other hand, complexes of these ligands and metal ions, such as Cu(II) and Zn(II), have been successfully conjugated to a cationic tetrapeptide using a versatile stepwise approach by means of solid-phase peptide synthesis (SPPS).<sup>46</sup> Moreover, it has been found that Cu metallopeptides show an enhanced nuclease activity compared to the parent complexes [Cu(PyTACN)]<sup>2+</sup> and [Cu(BPBP)]<sup>2+</sup>, leading to ~4-fold and ~23 rate accelerations, respectively. Furthermore, additional mechanistic studies propose that an oxidative cleavage mechanism is operative, based on the generation of ROS species, causing the DNA damage.

Based on the above considerations, we envisaged that the conjugation of a <sup>Me2</sup>PyTACN or a (*S,S'*)-BPBP ligand to a CPP, such as **BP16**, could enhance their cellular uptake improving their biological activity. In this study, we report the solid-phase synthesis of **BP16** conjugates incorporating a <sup>Me2</sup>PyTACN or a (*S,S'*)-BPBP ligand at either the N- or the C-terminus. Considering the clathrin-dependent endocytic mechanism of **BP16**, metal binding peptides bearing the ligand and the enzymatic cleavable tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly at both ends of **BP16** were also prepared. The cytotoxicity of all these sequences was evaluated in cancer and healthy cell lines. In addition, the internalization of the corresponding 5(6)-carboxyfluorescein-labeled metal binding peptides was examined by flow cytometry. Finally, ligand release from the metal binding peptides incorporating the tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly was demonstrated by cathepsin B enzymatic digestion.

## Results and discussion

### Design of metal binding peptides

We previously reported families of tetradentate ligands derived from PyTACN and BPBP that formed iron and manganese complexes with high catalytic activities in oxidation reactions.<sup>36–44</sup> Mechanistic studies in these reactions showed evidences in favor of the implications of oxygenase-like metal based oxidants, which in turn confer interesting selectivity properties. Moreover, biological analysis of <sup>Me2</sup>PyTACN and (*S,S'*)-BPBP ligands have shown their ability to chelate intracellular labile Fe(II) in cancer cells and that the resulting redox-active complexes induce apoptosis through pro-oxidant mechanisms.<sup>45</sup> In this work we envisioned that the conjugation of these ligands to a CPP could facilitate their uptake into cancer cells increasing their activity. Recently, we described the undecapeptide **BP16** as a CPP able to favor the translocation of biologically active compounds across the cell membrane.<sup>30,31</sup> Based on this, herein we designed peptide conjugates resulting from the combination of the <sup>Me2</sup>PyTACN or the (*S,S'*)-BPBP ligands with **BP16**.

Previous studies revealed the importance of evaluating the influence of the position of a drug in a peptide sequence on its activity.<sup>30,47–49</sup> Thus, we first designed conjugates PyTACN-BP16 (**BP341**), BP16-PyTACN (**BP342**), BPBP-BP16 (**BP343**) and BP16-BPBP (**BP344**), incorporating the <sup>Me2</sup>PyTACN or the (*S,S'*)-BPBP ligand at either the N- or the C-terminal end of **BP16** (Fig. 1). Besides, we also included in this study metal binding peptides PyTACN-βAK-BP16 (**BP345**) and BPBP-βAK-BP16 (**BP346**), bearing at the N-terminus an additional Lys, a β-Ala and the corresponding ligand. The Lys serves as a site for labeling and the β-Ala residue was introduced as a spacer between the ligand and the peptide sequence. With the aim of promoting the intracellular release of the ligand, the cathepsin B cleavable sequence Gly-Phe-Leu-Gly was incorporated on the sequences BPBP-BP16 (**BP343**) and BP16-BPBP (**BP344**), rendering peptide conjugates BPBP-GFLG-BP16 (**BP347**) and BP16-GFLG-BPBP (**BP348**), respectively. In addition, to study the cellular uptake properties of the N-terminal metal binding peptides **BP346** and **BP347**, they were labeled with 5(6)-carboxyfluorescein (CF) leading to compounds BPBP-βAK(CF)-BP16 (**BP349**) and BPBP-GFLG-BP16-CF (**BP350**), respectively. In derivatives **BP342**, **BP344**, **BP348** and **BP350** containing at the C-terminus the ligands <sup>Me2</sup>PyTACN or (*S,S'*)-BPBP, the GFLG-BPBP or the CF moieties, respectively, these moieties were attached to the N<sup>ε</sup>-amino group of an additional Lys residue, which was introduced to maintain the cationic charges of the parent sequence.

### Synthesis of metal binding peptides

We first studied the synthesis of the metal binding peptides **BP341** and **BP343** bearing the <sup>Me2</sup>PyTACN or the (*S,S'*)-BPBP ligand at the N-terminus, respectively (Scheme 1). For this purpose, the peptidyl resin H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA was prepared from a Fmoc-Rink-MBHA resin following a standard



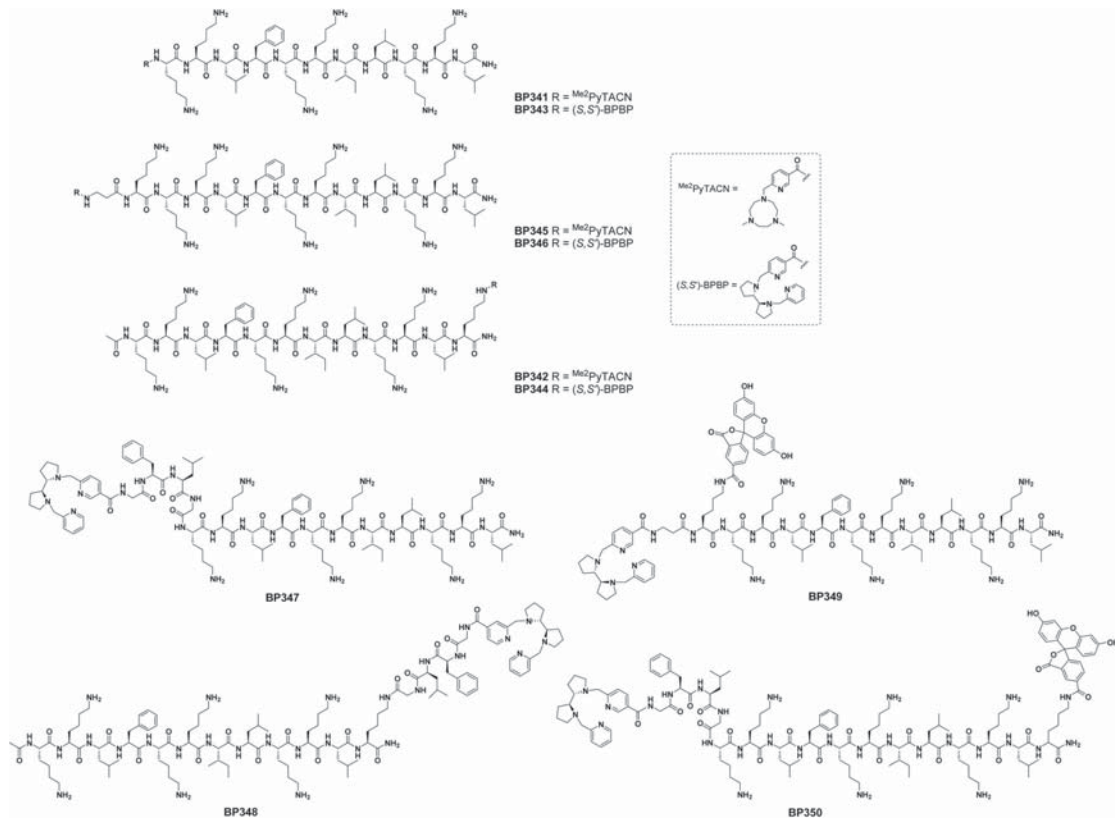


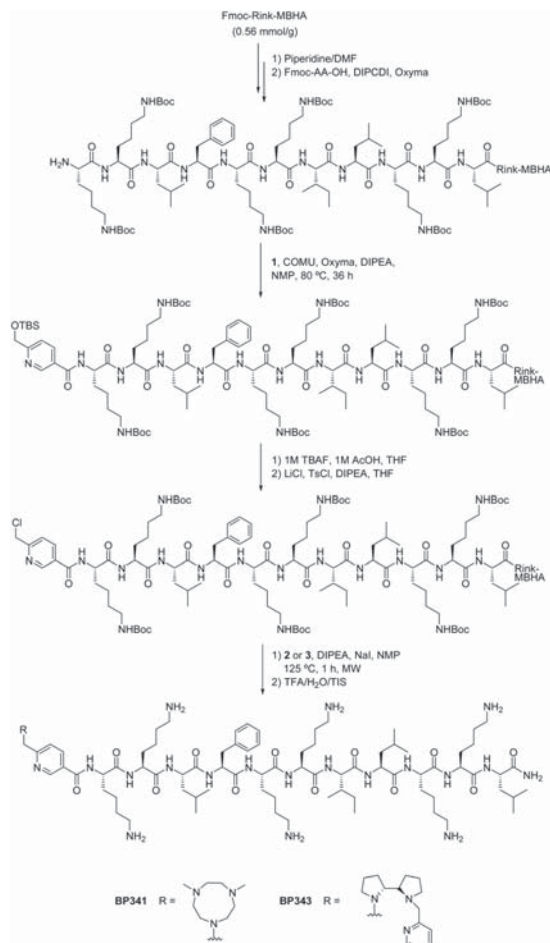
Fig. 1 Structure of the metal binding peptides described in this work.

Fmoc/*t*Bu strategy. The Fmoc group removal step was performed by exposing the peptidyl resin to a piperidine/DMF (3 : 7) solution. Couplings of the conveniently protected Fmoc amino acids were mediated by ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate (Oxyma) and *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) in *N,N*-dimethylformamide (DMF). Peptide elongation proceeded through sequential Fmoc removal and coupling of the corresponding amino acid. Incorporation of the  $Me^2$ PyTACN or the (S,S')-BPBP ligand was assayed following the protocol previously described for the preparation of metal binding tetrapeptides.<sup>46</sup> Thus, the peptidyl resin H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA was treated with 6-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]nicotinic acid (**1**)<sup>46</sup> in the presence of COMU, Oxyma and *N,N'*-diisopropylethylamine (DIPEA) in *N*-methyl-2-pyrrolidinone (NMP) at 80 °C for 36 h. The TBS group was removed by exposing the resulting resin to a solution of tetrabutylammonium fluoride (TBAF) and acetic acid (AcOH) in THF at room temperature for 6 h. Chlorination of the hydroxymethyl group was achieved by subjecting the resin to three treatments of 6 h with LiCl, *p*-toluenesulfonyl chloride (TsCl) and DIPEA in THF. Finally, alkylation with the secondary amine 1,4-dimethyl-1,4,7-triazacyclononane ( $Me^2$ -TACN) (**2**) or (2*S*,2*S'*)-1-(pyrid-2-

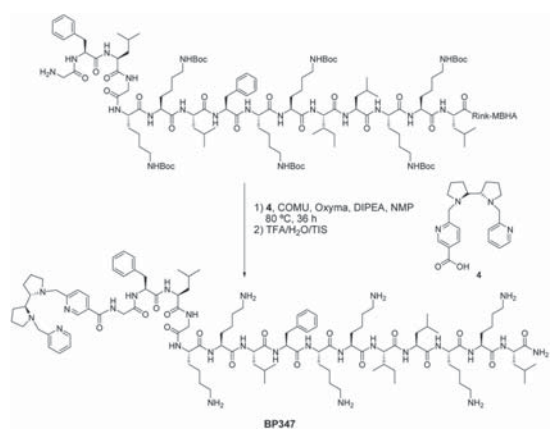
ylmethyl)-2,2'-bipyrrrolidine (**3**) was performed in presence of NaI (0.04 equiv.) and DIPEA (24 equiv.) in NMP under microwave irradiation at 125 °C for 1 h. After acidolytic cleavage with trifluoroacetic acid (TFA)/H<sub>2</sub>O/triisopropylsilane (TIS) (95 : 2.5 : 2.5), the crude reaction mixtures were dissolved in water and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to remove TsCl impurities. The aqueous phases were lyophilized and conjugates **BP341** and **BP343** were obtained in excellent purities (>99 and 94%, respectively). Metal binding peptides **BP345** and **BP346**, bearing an additional Lys, a β-Ala and the  $Me^2$ PyTACN or the (S,S')-BPBP ligand at the N-terminus of **BP16**, were prepared following the same strategy and were obtained in >99% purity. Their identities were confirmed by ESI-MS and HRMS.

The preparation of metal binding peptide **BP347**, incorporating the tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly and the (S,S')-BPBP ligand was accomplished by coupling the (S,S')-BPBP derivative **4** to the N-terminus of the corresponding peptidyl resin (Scheme 2). Synthesis of **4** was achieved through *N*-alkylation of the secondary amine **3** with methyl 6-(chloromethyl)nicotinate hydrochloride, which was obtained following previously described protocols (Scheme S1†).<sup>46</sup> Hydrolysis of the resulting methyl ester provided the (S,S')-BPBP derivative **4** in 51% overall yield. Coupling of **4** to the peptidyl resin H-Gly-Phe-





Scheme 1 Synthesis of metal binding peptides BP341 and BP343.



Scheme 2 Synthesis of metal binding peptide BP347.

Leu-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA mediated by COMU, Oxyma, DIPEA in NMP at 80 °C for 36 h afforded metal binding peptide **BP347** in 95% purity, which was characterized by HRMS.

Metal binding peptides **BP342** and **BP344**, containing the  $\text{Me}_2\text{PyTACN}$  and (*S,S'*)-BPBP ligands, respectively, at the side-chain of a C-terminal Lys residue were then prepared (Scheme S2<sup>†</sup>). For its selective derivatization, this Lys residue was incorporated as Fmoc-Lys(Dde)-OH (Dde = *N*-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl]). Peptidyl resin H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Dde)-Rink-MBHA was synthesized and then acetylated at the N-terminus. After Dde group removal by treatment with hydrazine, the nicotinic acid derivative **1** was coupled with COMU, Oxyma and DIPEA in NMP. Subsequent TBS group removal, chlorination and alkylation with secondary amines **2** and **3** were performed as described above for metal binding peptides **BP341** and **BP343**. Acidolytic cleavage of the resulting resins afforded conjugates **BP342** and **BP344** in 98 and 90% purity, respectively, and were characterized by HRMS.

Synthesis of metal binding peptide **BP348**, incorporating the GLFG-(*S,S'*)-BPBP moiety at the side-chain of a C-terminal Lys, also started from peptidyl resin H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Dde)-Rink-MBHA (Scheme S3<sup>†</sup>). After N-terminal acetylation, selective Dde group removal and subsequent coupling of the amino acids of the GLFG moiety, the (*S,S'*)-BPBP derivative **4** was incorporated using COMU, Oxyma and DIPEA in NMP at 80 °C for 36 h. Conjugate **BP348** was obtained in 90% purity and was characterized by HRMS.

For the preparation of the fluorescein-labeled BPBP conjugates **BP349** (BPBP- $\beta$ AK(CF)-BP16) and **BP350** (BPBP-GFLG-BP16-CF), the Lys residue to be labeled was incorporated as Fmoc-Lys(Dde)-OH. Thus, **BP349** and **BP350** were prepared from peptidyl resins H- $\beta$ -Ala-Lys(Dde)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA and H-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Dde)-Rink-MBHA, respectively (Scheme S4<sup>†</sup>). These peptidyl resins were treated with the (*S,S'*)-BPBP derivative **4** and then subjected to Dde group removal with hydrazine followed by 5(6)-carboxy-fluorescein coupling in presence of DIPCDI, Oxyma in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NMP}$ . The resulting resins were washed with piperidine/NMP to remove overincorporated carboxyfluorescein moieties and then treated with TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /TIS (95 : 2.5 : 2.5) to afford **BP349** and **BP350** in >99 and 94% purity, respectively, which were characterized by HRMS.

#### Cell cytotoxicity of BP16 conjugates incorporating a $\text{Me}_2\text{PyTACN}$ or (*S,S'*)-BPBP ligand

The cytotoxicity of the metal binding peptides was examined in MCF-7 and CAPAN-1 tumour cells, and in 1BR3G non-malignant cells. Our aim was to determine the influence on the activity of incorporating: (i) the ligand at the N- or at the C-terminus of **BP16**; (ii) the dipeptide  $\beta$ -Ala-Lys between the ligand and the N-terminus of **BP16**; and (iii) the Gly-Phe-Leu-Gly enzy-



matic cleavable sequence between the ligand and the N- or the C-terminal end of **BP16**. The  $IC_{50}$  values were determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay after 48 h of peptide exposure at concentrations ranging from 0 to 50  $\mu\text{M}$  (Table 1).

The metal binding peptide **BP341**, incorporating the  $Me^2$ PyTACN ligand at the N-terminus of **BP16**, was not active against the cell lines tested, whereas the C-terminal derivative **BP342** (BP16-PyTACN) showed  $IC_{50}$  values of 35.5 and 41.5  $\mu\text{M}$  against 1BR3G and CAPAN-1 cells, respectively. The introduction of the dipeptide  $\beta$ Ala-Lys between the ligand and the N-terminus of **BP16** did not improve the results, the metal binding peptide **BP345** exhibited  $IC_{50}$  values  $>50$   $\mu\text{M}$  against the three cell lines.

Regarding the BPBP-metal binding peptides, the conjugate **BP343** (BPBP-BP16), bearing the ligand at the N-terminus, displayed  $IC_{50}$  of 36.8 and 45.8  $\mu\text{M}$  against 1BR3G and CAPAN-1 cells, respectively, and the C-terminal BPBP derivative (**BP344**) was active against 1BR3G and MCF-7 cells with  $IC_{50}$  of 26.0 and 34.5  $\mu\text{M}$ , respectively (Table 1). Similarly to the  $Me^2$ PyTACN derivatives, the incorporation of the dipeptide  $\beta$ Ala-Lys also rendered a non-active peptide (**BP346**).

The analysis of these results revealed that the activity of the metal binding peptides was consistent with that observed for the ligands alone.<sup>45</sup> Thus, **BP16** conjugates incorporating the (S,S')-BPBP ligand were more active than the sequences bearing the  $Me^2$ PyTACN metal binding moiety. However, the conjugation of these ligands to **BP16** decreased their activity. Moreover, contrary to our expectations, the incorporation of a dipeptide spacer between the ligand and **BP16** resulted in non-active conjugates. These results suggest that the peptide sequence adopts a conformation that could interfere with the metal binding ability of the ligand. In addition and in agreement with previous results, a different behaviour of the N- and C-terminal derivatives was observed. This fact points out that the position of a cargo in a peptide sequence influences the biological activity of the resulting conjugate, constituting a crucial factor in the design of biologically active peptide conjugates.<sup>30,47–49</sup>

The higher activity of the BPBP-metal binding peptides compared to the  $Me^2$ PyTACN conjugates prompted us to focus next studies on sequences bearing the former ligand. Remarkably, the incorporation of the cathepsin B cleavable sequence Gly-Phe-Leu-Gly in conjugates **BP343** and **BP344** resulted in metal binding peptides **BP347** and **BP348**, respectively, with an excellent activity ( $IC_{50}$  = 5.0–11.7  $\mu\text{M}$ ). The best derivative was **BP347**, bearing the BPBP-GFLG moiety at the N-terminus of **BP16**. This derivative displayed  $IC_{50}$  values ranging from 4.3 to 5.0  $\mu\text{M}$  against the three cell lines, comparable to those of widely used anticancer drugs such as cisplatin or doxorubicin.<sup>50,51</sup> Moreover, this metal binding conjugate showed an enhanced cytotoxic activity compared to that determined for the (S,S')-BPBP ligand alone against the same cell lines (Table 1). These results can be reasoned taken into account the uptake mechanism described for **BP16**, which internalizes into cancer cells by clathrin-dependent endocytosis being lysosomes the final stage of this pathway.<sup>31</sup> Therefore, the high activity observed for **BP347** and **BP348** could be attributed to the selective release of the ligand in the lysosomal compartment promoted by cathepsin B. A similar effect was previously reported for conjugates incorporating the anticancer drug chlorambucil (CLB) and the tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly linked to **BP16**.<sup>30</sup> Moreover, the behaviour of **BP347** and **BP348** compared to conjugates **BP343** and **BP344** reinforces our previous hypothesis that the peptide sequence could hamper the activity of the ligand. Concerning the possible mechanism of action, on the basis of a previous study,<sup>45</sup> the selective release of the (S,S')-BPBP ligand would facilitate the chelation of intracellular labile Fe(II) inside the cell. Then, chemically reminiscent to activated bleomycin, the cytotoxic activity of this moiety would rely on the generation of ROS, DNA fragmentation through oxidative mechanisms and further induction of cell cycle arrest and apoptosis. Unfortunately, the conjugation of the (S,S')-BPBP ligand to the cell-penetrating peptide **BP16** did not increase the selectivity of the ligand towards tumour cells. However, **BP347** and **BP348** highlight the benefit of designing conjugates that include peptide systems able to deliver and release their cargo into the cells.

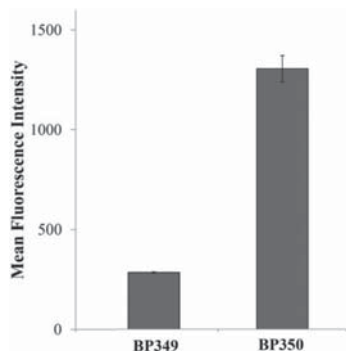
**Table 1** Cytotoxicity of **BP16** conjugates in 1BR3G, MCF-7 and CAPAN-1 cells

Compound	Sequence <sup>a</sup>	Notation	$IC_{50}$ <sup>b</sup> ( $\mu\text{M}$ )		
			1BR3G	MCF-7	CAPAN-1
<b>BP341</b>	$Me^2$ PyTACN-KKLFKKILKKL	PyTACN-BP16	>50	>50	>50
<b>BP342</b>	Ac-KKLFKKILKKLK( $Me^2$ PyTACN)	BP16-PyTACN	35.5 $\pm$ 1.9	>50	41.5 $\pm$ 0.7
<b>BP343</b>	(S,S)-BPBP-KKLFKKILKKL	BPBP-BP16	36.8 $\pm$ 7.2	>50	45.8 $\pm$ 1.1
<b>BP344</b>	Ac-KKLFKKILKKLK((S,S)-BPBP)	BP16-BPBP	26.0 $\pm$ 3.4	34.5 $\pm$ 5.0	>50
<b>BP345</b>	$Me^2$ PyTACN- $\beta$ AK-KKLFKKILKKL	PyTACN- $\beta$ AK-BP16	>50	>50	>50
<b>BP346</b>	(S,S)-BPBP- $\beta$ AK-KKLFKKILKKL	BPBP- $\beta$ AK-BP16	>50	>50	>50
<b>BP347</b>	(S,S)-BPBP-GFLG-KKLFKKILKKL	BPBP-GFLG-BP16	4.7 $\pm$ 1.4	5.0 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.8
<b>BP348</b>	Ac-KKLFKKILKKLK(GFLG-(S,S)-BPBP)	BP16-GFLG-BPBP	9.5 $\pm$ 0.8	11.7 $\pm$ 0.5	6.9 $\pm$ 0.7
(S,S')-BPBP		(S,S')-BPBP	12.7 $\pm$ 1.6	7.4 $\pm$ 0.2	9.9 $\pm$ 1.0
$Me^2$ PyTACN		$Me^2$ PyTACN	78.0 $\pm$ 8.5	88.5 $\pm$ 0.7	32.0 $\pm$ 10.4

<sup>a</sup> All sequences are C-terminal amides. <sup>b</sup> The  $IC_{50}$  values were determined by the MTT assay after 48 h of peptide exposure. Data represents the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments made in triplicates.





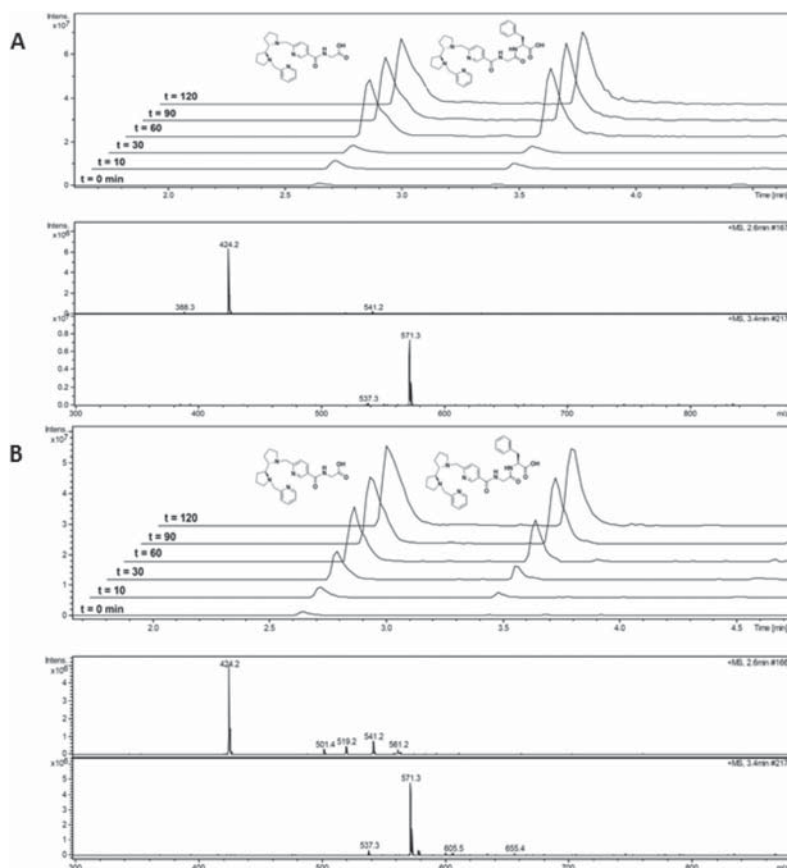


**Fig. 2** Uptake of 5(6)-carboxyfluorescein (CF) labeled conjugates **BP349** (BPBP- $\beta$ AK(CF)-BP16) and **BP350** (BPBP-GFLG-BP16-CF) in MCF-7 cells. Cells were exposed to the peptide conjugate at 25  $\mu$ M for 6 h at 37  $^{\circ}$ C. Each column in the graph represents the mean fluorescence intensity of the cells determined in three independent experiments  $\pm$  SD.

### Cellular uptake of BPBP peptide conjugates

To analyze if the cytotoxic activity observed for these metal binding peptides correlated with their cell internalization, we studied the cellular uptake properties of the most active conjugate **BP347** and of the non-active sequence **BP346**. For this purpose, the internalization ability of the corresponding 5(6)-carboxyfluorescein (CF)-labeled conjugates **BP350** (BPBP-GFLG-BP16-CF) and **BP349** (BPBP- $\beta$ AK(CF)-BP16) was examined by flow cytometry (Fig. 2). These experiments were performed by incubating MCF-7 cells with the corresponding CF-labeled peptide conjugate at 25  $\mu$ M for 6 h at 37  $^{\circ}$ C.

As represented in Fig. 2, important differences between the cellular uptake of labeled conjugates **BP349** and **BP350** were observed. Remarkably, the internalization ability of conjugate **BP350** was about 5-fold higher than that of **BP349** (1427.20  $\pm$  72 vs. 310.31  $\pm$  0.1). This result correlated with the cytotoxic activity exhibited by the corresponding non-labeled sequences **BP346** and **BP347**, respectively. Therefore, the high activity of



**Fig. 3** Enzymatic digestion of **BP347** (BPBP-GFLG-BP16) and **BP348** (BP16-GFLG-BPBP) by cathepsin B. (A) Extracted ion chromatogram resulting from the enzymatic digestion of **BP347** after 0, 10, 30, 60, 90 and 120 min of exposure to the enzyme; ESI-MS spectrum of the peaks at  $t_R = 2.6$  and 3.4 min after 90 min. (B) Extracted ion chromatogram resulting from the enzymatic digestion of **BP348** after 0, 10, 30, 60, 90 and 120 min of exposure to the enzyme; ESI-MS spectrum of the peaks at  $t_R = 2.6$  and 3.4 min after 90 min.



the metal binding peptide **BP347** could be attributed to its high cellular uptake and to the subsequent release of the (*S,S'*)-BPBP ligand by the intracellular cleavage of the enzymelabile spacer Gly-Phe-Leu-Gly.

### Cathepsin B enzymatic assays

To determine the intracellular release of the ligand, enzymatic digestions with the lysosomal enzyme cathepsin B were carried out with conjugates **BP347** (BPBP-GFLG-BP16) and **BP348** (BP16-GFLG-BPBP) (Fig. 3). Conditions for digestion were chosen to mimic the lysosomal medium (pH 4.5–5.5) and followed a previously reported method.<sup>47</sup> Experiments were performed by exposure of **BP347** and **BP348** to a solution of cathepsin B in phosphate buffer (pH 5) containing 25 mM L-Cys and 1 mM EDTA. Enzymatic digestions were monitored by HPLC-MS after 10, 30, 60, 90 and 120 min. In the case of the N-terminal binding peptide **BP347** (BPBP-GFLG-BP16), the main fragments split by cathepsin B were (*S,S'*)-BPBP-Gly-OH ( $[M + H]^+ = 424.2$ ) and (*S,S'*)-BPBP-Gly-Phe-OH ( $[M + H]^+ = 571.3$ ) (Fig. 3A). These fragments eluted at a retention time of 2.6 and 3.4 min, respectively, and increased over time, remaining stable after 90 min of digestion. Our results suggested that the main cleavage sites were between the Gly and the Phe residues, and between the Phe and the Leu amino acids in the tetrapeptide sequence.

The digestion of the C-terminal binding peptide **BP348** also revealed the release of the fragments (*S,S'*)-BPBP-Gly-OH ( $[M + H]^+ = 424.2$ ) and (*S,S'*)-BPBP-Gly-Phe-OH ( $[M + H]^+ = 571.3$ ) in a time-dependent manner (Fig. 3B). The intensity of the peaks corresponding to these fragments pointed out that the hydrolysis of the amide bond between the Gly and the Phe residues occurred faster than that of the Phe-Leu bond.

These findings confirm that the release of the ligand could occur in the lysosomes under enzymatic conditions and correlate with the high cytotoxicity observed for these conjugates. These data are in agreement with previous studies based on conjugates bearing chlorambucil attached to **BP16** through the cathepsin B-cleavable tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly.<sup>30</sup>

## Conclusions

In summary, we have shown that conjugation of the (*S,S'*)-BPBP ligand to the enzymatic cleavable tetrapeptide Gly-Phe-Leu-Gly at the N- or the C-terminus of the cell-penetrating peptide **BP16** renders peptide conjugates with high cytotoxic activity against cancer cells. The role of **BP16** in these sequences is to deliver the ligand into the cancer cells while the presence of the tetrapeptide allows a very efficient enzyme-triggered release of the ligand inside the cells. These findings confirm the usefulness of **BP16** as cell-penetrating peptide and, at the same time, suggest that (*S,S'*)-BPBP represents a promising pro-oxidant therapeutic strategy in the search for novel redox-directed anticancer treatments.

## Experimental section

### Synthesis of methyl (2*S*,2*S'*)-6-[1'-(pyrid-2-ylmethyl)-[2,2'-bipyrrolidin]-1-ylmethyl] nicotinate

(2*S*,2*S'*)-1-(Pyrid-2-ylmethyl)-2,2'-bipyrrolidine (**3**)<sup>46</sup> (0.79 g, 3.41 mmol) was dissolved in H<sub>2</sub>O (5.80 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.80 mL). NaOH pellets (0.31 g, 7.84 mmol) and methyl 6-(chloromethyl) nicotinate hydrochloride (0.63 g, 3.41 mmol)<sup>46</sup> were added. The mixture was stirred during 24 h at room temperature and the reaction was monitored by TLC. After consumption of the starting material, 1 M NaOH (35 mL) was added and the aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 25 mL). The combined organic layers were dried with anhydrous MgSO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated under reduced pressure yielding the expected nicotinate derivative as an orange oil (0.70 g, 54% yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.69–1.82 (m, 8 H, 2 × H<sub>3</sub>, 2 × H<sub>3</sub>, 2 × H<sub>4</sub>, 2 × H<sub>4</sub>), 2.18–2.26 (m, 2 H, H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>), 2.75–2.83 (m, 2 H, 2 × H<sub>5</sub>), 2.94–3.02 (m, 2 H, 2 × H<sub>5</sub>), 3.52 (d, *J* = 14.3 Hz, 1 H, NCH<sub>2</sub>Pyr), 3.57 (d, *J* = 15.2 Hz, 1 H, NCH<sub>2</sub>Pyr), 3.92 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 4.18 (d, *J* = 14.3 Hz, 1 H, NCH<sub>2</sub>Pyr), 4.26 (d, *J* = 15.2 Hz, 1 H, NCH<sub>2</sub>Pyr), 7.07–7.09 (m, 1 H, pyr-5'), 7.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, pyr-3'), 7.49 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, pyr-5), 7.57 (td, *J* = 2.0 Hz and 8.2 Hz, 1 H, pyr-4'), 8.17 (dd, *J* = 1.6 Hz and 8.2 Hz, 1 H, pyr-4), 8.46–8.47 (m, 1 H, pyr-6'), 9.07 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H, pyr-2). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 23.61, 23.68 (C<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>), 26.25, 26.31 (C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>), 52.25 (CH<sub>3</sub>), 55.28, 55.32 (C<sub>5</sub>, C<sub>5</sub>), 61.15, 61.20 (C<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 65.82 (NCH<sub>2</sub>pyr), 121.72 (pyr-5'), 122.07, 122.82, 124.10 (pyr-3, pyr-5, pyr-3'), 136.34, 137.39 (pyr-4, pyr-4'), 148.82 (pyr-6'), 150.10 (pyr-2), 160.03 (pyr-2'), 165.27 (pyr-6), 165.95 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI): *m/z* = 381.2 [M + H]<sup>+</sup>.

### Synthesis of (2*S*,2*S'*)-6-[1'-(pyrid-2-ylmethyl)-[2,2'-bipyrrolidin]-1-ylmethyl] nicotinic acid (**4**)

An aqueous solution of LiOH (1.6 M, 5.55 mmol, 3.55 mL) was added dropwise to a solution of methyl (2*S*,2*S'*)-6-[1'-(pyrid-2-ylmethyl)-[2,2'-bipyrrolidin]-1-ylmethyl] nicotinate (**1** g, 1.85 mmol) in THF/CH<sub>3</sub>OH (1 : 1, 7.2 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min and at room temperature for 4 h. After this time, the solvent was evaporated under reduced pressure to provide compound **4** as a white solid (0.65 g, 95% yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 1.68–1.74 (m, 8 H, 2 × H<sub>3</sub>, 2 × H<sub>3</sub>, 2 × H<sub>4</sub>, 2 × H<sub>4</sub>), 2.20–2.30 (m, 2 H, H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>), 2.76–2.82 (m, 2 H, 2 × H<sub>5</sub>), 2.94–2.98 (m, 2 H, 2 × H<sub>5</sub>), 3.53 (d, *J* = 19.4 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>Pyr), 4.21 (d, *J* = 19.4 Hz, 1 H, NCH<sub>2</sub>Pyr), 4.25 (d, *J* = 19.4 Hz, 1 H, NCH<sub>2</sub>Pyr), 7.22–7.30 (m, 1 H, pyr-5'), 7.48 (d, *J* = 10.6 Hz, 2 H, pyr-5, pyr-3'), 7.75 (td, *J* = 2.4 and 7.2 Hz, 1 H, pyr-4'), 8.21 (dd, *J* = 2.7 and 10.6 Hz, 1 H, pyr-4), 8.39–8.40 (m, 1 H, pyr-6'), 8.94 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H, pyr-2). MS (ESI): *m/z* = 367.2 [M + H]<sup>+</sup>. HRMS (ESI): calcd for C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 367.2129; found 367.2119; calcd for C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup> 389.1948; found 389.1934.

### Synthesis of the metal binding peptides

**General method for the synthesis of the peptidyl resins.** Peptidyl resins were synthesized manually by the solid-phase



method following Fmoc-type chemistry. A Fmoc-Rink-MBHA resin (0.56 mmol g<sup>-1</sup>) was used as solid support and *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) or *N*-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl] (Dde) as side-chain protecting groups for Lys. Couplings of the Fmoc-aminoacids (4 equiv.) were performed by treatment with DIPCDI (4 equiv.) and Oxyma (4 equiv.) in DMF under stirring at room temperature for 2 h, and monitored by the Kaiser test.<sup>52</sup> For sequences containing up to eleven residues, the Fmoc group was removed by treating the resin with a mixture of piperidine/DMF (3 : 7, 2 + 10 min). For longer sequences, Fmoc group removal was carried out with piperidine/NMP (3 : 7, 1 × 3 min + 3 × 10 min). After each coupling and deprotection step, the resin was washed with DMF (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min), and air dried. After the coupling of the eleventh residue, NMP was used instead of DMF. Peptide elongation was performed by repeated cycles of Fmoc group removal, coupling and washings.

**Synthesis of Me<sup>2</sup>PyTACN-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH<sub>2</sub> (PyTACN-BP16) (BP341).** This metal binding peptide was synthesized from the peptidyl resin H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA (50 mg) which was placed in a 5 mL round-bottomed flask. Freshly prepared 6-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]nicotinic acid (**1**)<sup>46</sup> (10 equiv.), COMU (10 equiv.), Oxyma (10 equiv.) and DIPEA (20 equiv.) were dissolved in NMP (1 mL) by sonication and allowed to react for 10 min. This solution was then added to the resin and the mixture was heated at 80 °C for 36 h under stirring. After this time, the resin was washed with NMP (6 × 1 min), CH<sub>3</sub>OH (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 × 1 min). The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.<sup>52</sup> The resulting peptidyl resin was placed in a syringe and was treated with TBAF (1 M, 664 μL) and AcOH (1 M, 20 μL) in THF (500 μL) under stirring at room temperature for 6 h. Then, the resin was washed with THF (3 × 1 min), CH<sub>3</sub>OH (3 × 1 min), NMP (3 × 1 min), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 1 min) and THF (1 × 1 min). The resulting resin was treated with a solution of LiCl (10 equiv.), TsCl (2 equiv.), and DIPEA (3 equiv.) in THF (1 mL). The reaction mixture was shaken for 6 h at room temperature. This treatment was repeated three times. Between treatments and at the end of the reaction, the resin was washed with THF (3 × 1 min), CH<sub>3</sub>OH (3 × 1 min), H<sub>2</sub>O (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 1 min). To perform the *N*-alkylation, the peptidyl resin was placed in a 15 mL quartz vial containing a magnetic stir bar and treated with a solution of Me<sup>2</sup>TACN-3HBr (**2**)<sup>46</sup> (3 equiv.), NaI (0.04 equiv.) and DIPEA (24 equiv.) in NMP. The sealed vial was heated at 125 °C under MW irradiation for 1 h. After the reaction time, upon cooling, the resulting resin was placed in a syringe and the solvent was removed. The resin was washed with NMP (6 × 1 min), CH<sub>3</sub>OH (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 × 1 min), and then cleaved with TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95 : 2.5 : 2.5) for 3 h at room temperature. Following TFA evaporation and cold Et<sub>2</sub>O extraction, the crude was dissolved in H<sub>2</sub>O (5 mL) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 3 mL). The aqueous phase was lyophilized and the residue was dissolved in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (1 : 1) affording the conjugate peptide **BP341**. To remove trifluoroacetate counterions, a Strato-

Spheres™ SPE device containing a PL-HCO<sub>3</sub> MP resin was used. This resin was initially pre-conditioned with CH<sub>3</sub>OH (1 mL). Then, an aqueous solution of **BP341** was treated with the SPE device, which was washed with H<sub>2</sub>O. The aqueous solution was lyophilized affording the desired TFA-free amine conjugate, which was tested for purity by HPLC. Detection was performed at 220 nm. Solvent A was 0.1% aq. TFA and solvent B was 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN. Analysis was carried out with a Kromasil 100 C<sub>18</sub> (4.6 mm × 40 mm, 3.5 μm) column with a 2–100% B linear gradient over 7 min at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. ESI-MS and HRMS (ESI) were used to confirm peptide identity. **BP341** was obtained in >99% purity. *t*<sub>R</sub> = 6.85 min. MS (ESI): *m/z* = 554.4 [M + 3H]<sup>3+</sup>, 831.1 [M + 2H]<sup>2+</sup>, 1661.1 [M + H]<sup>+</sup>. HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>84</sub>H<sub>154</sub>N<sub>22</sub>O<sub>12</sub> [M + 4H]<sup>4+</sup> 415.8024; found 415.8037; calcd for C<sub>84</sub>H<sub>153</sub>N<sub>22</sub>O<sub>12</sub> [M + 3H]<sup>3+</sup> 554.0674; found 554.0696; calcd for C<sub>84</sub>H<sub>152</sub>N<sub>22</sub>O<sub>12</sub> [M + 2H]<sup>2+</sup> 830.5975; found 830.5994.

**Synthesis of Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys(Lys<sup>Me2</sup>PyTACN)-NH<sub>2</sub> (BP16-PyTACN) (BP342).** This metal binding peptide was synthesized from the peptidyl resin H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Dde)-Rink-MBHA. This peptidyl resin (50 mg) was acetylated with acetic anhydride/pyridine/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 1 : 1 v/v, 2 × 30 min) under stirring. The resin was then washed with NMP (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min), and the Kaiser test was used to test the completion of the reaction.<sup>52</sup> The resulting peptidyl resin was treated with hydrazine/NMP (2 : 98, 5 × 20 min). After these treatments the resin was washed with NMP (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 × 1 min). Conjugation of the Me<sup>2</sup>PyTACN ligand at the free amino group, acidolytic cleavage, removal of trifluoroacetate counterions and characterization were carried out following the procedure described for **BP341**. The metal binding peptide **BP342** was obtained in 98% purity. *t*<sub>R</sub> = 7.23 min. MS (ESI): *m/z* = 1831.2 [M + H]<sup>+</sup>. HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>92</sub>H<sub>169</sub>N<sub>24</sub>O<sub>14</sub> [M + 5H]<sup>5+</sup> 366.8645; found 366.8653; calcd for C<sub>92</sub>H<sub>168</sub>N<sub>24</sub>O<sub>14</sub> [M + 4H]<sup>4+</sup> 458.3287; found 458.3293; calcd for C<sub>92</sub>H<sub>167</sub>N<sub>24</sub>O<sub>14</sub> [M + 3H]<sup>3+</sup> 610.7692; found 610.7719.

**Synthesis of (S,S')-BPBP-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-NH<sub>2</sub> (BPBP-GFLG-BP16) (BP347).** This metal binding peptide was synthesized from the peptidyl resin H-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Rink-MBHA (50 mg). Nicotinic acid derivative **4** (10 equiv.) was preactivated with COMU (5 equiv.), Oxyma (5 equiv.) and DIPEA (10 equiv.) in NMP for 5 min. This solution was added to the peptidyl resin and the mixture was heated at 80 °C for 36 h under stirring. The resin was washed with NMP (6 × 1 min), CH<sub>3</sub>OH (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 × 1 min). Completion of the reaction was confirmed using the Kaiser test.<sup>52</sup> The resulting peptidyl resin was cleaved with TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95 : 2.5 : 2.5) for 3 h at room temperature. Following TFA evaporation and cold Et<sub>2</sub>O extraction, the crude was dissolved in H<sub>2</sub>O (5 mL) and lyophilized. Removal of trifluoroacetate counterions and characterization was carried out following the procedure described for **BP341**, leading to the metal binding peptide **BP347** in >99% purity.



$t_R = 7.24$  min. HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{109}H_{183}N_{26}O_{16}$   $[M + 5H]^{5+}$  422.4856; found 422.4859; calcd for  $C_{109}H_{182}N_{26}O_{16}$   $[M + 4H]^{4+}$  527.8551; found 527.8563; calcd for  $C_{109}H_{181}N_{26}O_{16}$   $[M + 3H]^{3+}$  703.4711; found 703.4738.

**Synthesis of Ac-Lys-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys-Leu-Lys(Gly-Leu-Phe-Gly-(S,S')-BPBP)-NH<sub>2</sub> (BP16-GLFG-BPBP) (BP348).** This metal binding peptide was synthesized from the peptidyl resin H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ile-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Dde)-Rink-MBHA. This peptidyl resin (50 mg) was acetylated with acetic anhydride/pyridine/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 1 : 1 v/v, 2 × 30 min) under stirring. The resin was then washed with NMP (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 1 min), and the Kaiser test was used to test the completion of the reaction.<sup>52</sup> The resulting peptidyl resin was treated with hydrazine/NMP (2 : 98, 5 × 20 min). After these treatments the resin was washed with NMP (6 × 1 min) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 × 1 min). The amino acids Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH and Fmoc-Gly-OH were sequentially coupled following the protocol described above for the synthesis of peptidyl resins. After Fmoc group removal, coupling of the nicotinic acid derivative **4** was performed as described for **BP347**. The resulting peptidyl resin was cleaved with TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95 : 2.5 : 2.5) for 3 h at room temperature. Following TFA evaporation and cold Et<sub>2</sub>O extraction, the crude was dissolved in H<sub>2</sub>O (5 mL) and lyophilized. Removal of trifluoroacetate counterions and characterization were carried out following the procedure described for **BP341**, leading to the metal binding peptide **BP348** in 97% purity.  $t_R = 7.89$  min. HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{117}H_{198}N_{28}O_{18}$   $[M + 6H]^{6+}$  380.5901; found 380.5931;  $C_{117}H_{197}N_{28}O_{18}$   $[M + 5H]^{5+}$  456.5067; found 456.5078; calcd for  $C_{117}H_{196}N_{28}O_{18}$   $[M + 4H]^{4+}$  570.3815; found 570.3816; calcd for  $C_{117}H_{195}N_{28}O_{18}$   $[M + 3H]^{3+}$  760.1729; found 760.1737.

### Cytotoxicity assays

Cytotoxicity of peptides conjugates **BP341**–**BP348** in CAPAN-1, and MCF-7 tumour cells, and in 1BR3G non-malignant cells was determined by the MTT assay. Appropriate aliquots of these solutions were diluted in the cell culture medium to obtain the final working concentrations. Aliquots of 10 000 CAPAN-1 cells, 6000 MCF-7 cells and 5000 1BR3G cells were seeded on 96-well plates 24 h prior to the treatments. Then, cells were treated for 48 h with the corresponding compound at concentrations ranging from 0 to 50 μM. After removal of the treatment, cells were washed with PBS and incubated for additional 2 h in the darkness with fresh culture medium (100 μL) with MTT (10 μL). The medium was discarded and DMSO (100 μL) was added to each well to dissolve the purple formazan crystals. Plates were agitated at room temperature for 10 min and the absorbance of each well was determined with an absorbance microplate reader (ELx800, BioTek, Winooski, USA) at a wavelength of 570 nm. Three replicates for each compound were used, and all treatments were tested at least in three independent experiments. For each treatment, the cell viability was determined as a percentage of the control untreated cells, by dividing the mean absorbance of each treatment by the mean absorbance of the untreated cells. The IC<sub>50</sub>

was established for each compound by standard non-linear regression and curve fitting using GraphPad Prism (Graph Pad software Inc., La Jolla, CA).

### Flow cytometry

The uptake efficiency of **BP349** (BPBP-βAK(CF)-BP16) and **BP350** (BPBP-GFLG-BP16-CF) by MCF-7 cells was quantified by flow cytometry. Aliquots of 50 000 cells were seeded in 24 well-plates and allowed to attach for 24 h. Next, cells were treated with **BP349** and **BP350** at 25 μM for 6 h at 37 °C. The cells were harvested by trypsinization and gently washed with 2% FBS in cold PBS. The fluorescence of the cells, corresponding to the cellular uptake of the carboxyfluorescein labeled peptides, was analyzed using FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) equipped with the CellQuest™ software (Becton Dickinson). The mean fluorescence intensity was represented on a four orders of magnitude log scale (1–10 000). Ten thousand cells were analyzed in each experiment.

### Cathepsin B enzymatic assays

The enzymatic digestion of metal binding peptides **BP347** (BPBP-GFLG-BP16) and **BP348** (BP16-GLFG-BPBP) was evaluated using a previously reported method with minor modifications.<sup>47</sup> A cathepsin B stock solution (1 × 10<sup>4</sup> U L<sup>-1</sup>, 10 μL) was added to phosphate buffer (pH 5.0, 25 mM L-Cys, 1 mM EDTA; 940 μL) and preactivated for 10 min at 37 °C. Next, **BP347** and **BP348** (1.8 mM, 50 μL) were added to the mixture. Aliquots of this mixture (110 μL) were sampled at 0, 10, 30, 60, 90 and 120 min, flash frozen in liquid nitrogen and analyzed by HPLC-MS. The analytical HPLC conditions used for these analyses were the same as described above for **BP341**.

## Acknowledgements

This work was supported by Consolider Ingenio CSD/CSD2010-00065 from MICINN of Spain. We also thank the Catalan DIUE of the Generalitat de Catalunya (2014 SGR 862). X. R. thanks financial support from INNPLANTA project INP-2011-0059-PCT-420000-ACT1. M. C. and X. R. thank ICREA Academia Awards. We also acknowledge the Serveis Tècnics de Recerca of the University of Girona for technical support.

## Notes and references

- 1 C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 7743–7765.
- 2 L. W. Kleiner, J. C. Wright and Y. Wang, *J. Controlled Release*, 2014, **181**, 1–10.
- 3 R. V. J. Chari, M. L. Miller and W. C. Widdison, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 3796–3827.
- 4 J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen and J. Savolainen, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2008, **7**, 255–270.





- 5 Y. Singh, M. Palombo and P. J. Sinko, *Curr. Med. Chem.*, 2008, **15**, 1802–1826.
- 6 R. Karaman, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2013, **82**, 643–668.
- 7 S. Aluri, S. M. Janib and J. A. Mackay, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2009, **61**, 940–952.
- 8 L. Bildstein, C. Dubernet and P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**, 3–23.
- 9 R. Mahato, W. Tai and K. Cheng, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**, 659–670.
- 10 E. Vivès, J. Schmidt and A. Pèlerin, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1786**, 126–138.
- 11 S. B. Fonseca, M. P. Pereira and S. O. Kelley, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2009, **61**, 953–964.
- 12 Y. Huang, Y. Jiang, H. Wang, J. Wang, M. C. Shin, Y. Byun, H. He, Y. Liang and V. C. Yang, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2013, **65**, 1299–1315.
- 13 L. M. Bareford and P. W. Swaan, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2007, **59**, 748–758.
- 14 I. Nakase, Y. Kawaguchi, N. Nomizu and S. Futaki, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2015, **27**, 81–88.
- 15 K. Kurrikoff, M. Gestin and U. Langel, *Expert Opin. Drug Delivery*, 2016, **13**, 373–387.
- 16 R. Weinstein, E. N. Savariar, C. N. Felsen and R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 874–877.
- 17 N. Nischan, H. D. Herce, F. Natale, N. Bohlke, N. Budisa, M. C. Cardoso and C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 1950–1953.
- 18 B. M. deRonde, A. Birke and G. N. Tew, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 3013–3019.
- 19 E. Koren and V. P. Torchilin, *Trends Mol. Med.*, 2012, **18**, 385–393.
- 20 I. Nakase, H. Akita, K. Kogure, A. Gräslund, U. Langel, H. Harashima and S. Futaki, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 1132–1139.
- 21 E. G. Stanzl, B. M. Trantow, J. R. Vargas and P. A. Wender, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 2944–2954.
- 22 G. Gasparini, E.-K. Bang, G. Molinar, D. V. Tulumello, S. Ward, S. O. Kelly, A. Roux, N. Sakai and S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 6069–6074.
- 23 D. M. Copolovici, K. Langel, E. Eriste and Ü. Langel, *ACS Nano*, 2014, **8**, 1972–1994.
- 24 M. Fotin-Mleczek, R. Fischer and R. Brock, *Curr. Pharm. Des.*, 2005, **11**, 3613–3628.
- 25 M. M. Mohamed and B. F. Sloane, *Nat. Rev. Cancer*, 2006, **6**, 764–775.
- 26 K. B. Bai, O. Láng, E. Orbán, R. Szabó, L. Köhidai, F. Hudecz and G. Mezö, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 2260–2269.
- 27 K. Splith, W. Hu, U. Schatzschneider, R. Gust, I. Ott, L. A. Onambele, A. Prokop and I. Neundorff, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 1288–1296.
- 28 R. Shankar, A. Samyutty, C. Riggin, S. Kannan, U. Wenzel and R. Kolhatkar, *Mol. Pharm.*, 2013, **10**, 3776–3788.
- 29 M. Moreno, E. Zurita and E. Giralt, *J. Controlled Release*, 2014, **182**, 13–21.
- 30 M. Soler, M. González-Bártulos, E. Figueras, X. Ribas, M. Costas, A. Massaguer, M. Planas and L. Feliu, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 1470–1480.
- 31 M. Soler, M. González-Bártulos, D. Soriano-Castell, X. Ribas, M. Costas, F. Tebar, A. Massaguer, L. Feliu and M. Planas, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 1652–1663.
- 32 H. Pelicano, D. Carney and P. Huang, *Drug Resist. Updates*, 2004, **7**, 97–110.
- 33 D. Trachootham, J. Alexandre and P. Huang, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2009, **8**, 579–591.
- 34 N. Graf and S. J. Lippard, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2012, **64**, 993–1004.
- 35 I. Romero-Canelón and P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 12276–12291.
- 36 A. Company, L. Gómez, X. Fontrodona, X. Ribas and M. Costas, *Chem. – Eur. J.*, 2008, **14**, 5727–5731.
- 37 A. Company, Y. Feng, M. Güell, X. Ribas, J. M. Luis, L. Que, Jr. and M. Costas, *Chem. – Eur. J.*, 2009, **15**, 3359–3362.
- 38 L. Gómez, I. Garcia-Bosch, A. Company, J. Benet-Buchholz, A. Polo, X. Sala, X. Ribas and M. Costas, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 5720–5723.
- 39 J. L. Fillol, Z. Codolà, I. Garcia-Bosch, L. Gómez, J. J. Pla and M. Costas, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 807–813.
- 40 I. Garcia-Bosch, L. Gómez, A. Polo and X. Ribas, *Adv. Synth. Catal.*, 2012, **354**, 65–70.
- 41 I. Prat, L. Gómez, M. Canta, X. Ribas and M. Costas, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 1908–1913.
- 42 Z. Codolà, I. Garcia-Bosch, F. Acuña-Parés, I. Prat, J. M. Luis, M. Costas and J. Lloret-Fillol, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 8042–8047.
- 43 L. Gómez, M. Canta, D. Font, I. Prat, X. Ribas and M. Costas, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 1421–1433.
- 44 O. Cussó, I. Garcia-Bosch, X. Ribas, J. Lloret-Fillol and M. Costas, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 14871–14878.
- 45 M. González-Bártulos, C. Aceves-Luquero, J. Qualai, O. Cussó, M. A. Martínez, S. Fernández de Mattos, J. A. Menéndez, P. Villalonga, M. Costas, X. Ribas and A. Massaguer, *PLoS One*, 2015, **10**, e0137800.
- 46 M. Soler, E. Figueras, J. Serrano-Plana, M. González-Bártulos, A. Massaguer, A. Company, M. Á. Martínez, J. Malina, V. Brabec, L. Feliu, M. Planas, X. Ribas and M. Costas, *Inorg. Chem.*, 2015, **54**, 10542–10558.
- 47 P. Zhang, A. G. Cheetham, L. L. Lock and H. Cui, *Bioconjugate Chem.*, 2013, **24**, 604–613.
- 48 A. Brieger, G. Plotz, I. Hinrichsen, S. Passmann, R. Adam and S. Zeuzem, *PLoS One*, 2012, **7**, e31863.
- 49 W. Zhang, J. Song, L. Mu, B. Zhang, L. Liu, Y. Xing, K. Wang, Z. Li and R. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 1452–1455.
- 50 A. Grau-Campistany, A. Massaguer, D. Carrion-Salip, F. Barragán, G. Artigas, P. López-Senín, V. Moreno and V. Marchán, *Mol. Pharm.*, 2013, **10**, 1964–1976.
- 51 V. Kuete, T. Eichhorn, B. Wiench, B. Krusche and T. Efferth, *Cell Div.*, 2012, **7**, 16.
- 52 E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger and P. Cook, *Anal. Biochem.*, 1970, **34**, 595–598.

