



**UNIVERSIDAD DE BURGOS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Interacción de ARN con  
Doxorrubicina. Influencia del  
Ligando y del Metal en la  
Actividad Biológica de Complejos  
Organometálicos.**

Tesis Doctoral

Ana Rosa Rubio Antolín

Burgos, 2019



La **Dra. Begoña García Ruiz**, Catedrática de Química Física, y la **Dra. Natalia Busto Vázquez**, Investigadora posdoctoral, ambas pertenecientes al Departamento de Química de la Universidad de Burgos,

**CERTIFICAN:**

Que la siguiente memoria titulada **“Interacción de ARN con Doxorubicina. Influencia del Ligando y del Metal en la Actividad Biológica de Complejos Organometálicos”** ha sido realizada por Ana Rosa Rubio Antolín, Graduada en Química, en el Departamento de Química de la Universidad de Burgos bajo su dirección, y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral con mención de Doctor Internacional.

En Burgos, a 07 de mayo de 2019

Fdo. Begoña García Ruiz

Directora

Fdo. Natalia Busto Vázquez

Codirectora





## AGRADECIMIENTOS

Dicen que todo lo que empieza, acaba. Y aunque hace algo más de cuatro años parecía que este día no iba a llegar, aquí estoy, escribiendo las últimas líneas de mi tesis. En todo este tiempo, seis años desde que empecé con el TFG, han sido muchas las personas que me han acompañado o me he encontrado por el camino y a las que debo dar las gracias de una manera u otra.

Para comenzar me gustaría agradecer a mi directora de tesis Begoña García todo su tiempo, dedicación y paciencia a lo largo de estos últimos cuatro años para que la presentación de este trabajo haya sido posible. Ella me transmitió el encanto de la investigación desde la pasión y la constancia.

A Natalia Busto, mi codirectora, pero primero compañera. Ella me explicó todas las técnicas del laboratorio, con su amabilidad, paciencia y compañerismo. Y, sobre todo, me enseñó a trabajar en equipo.

A Jose María Leal por su amable atención, disponibilidad y ayuda para cualquier problema durante todos los años que he estado en el grupo.

A Carl Smythe, de la Universidad de Sheffield, por acogerme en su laboratorio durante tres meses.

A Marta Mansilla y demás técnicos del parque científico tecnológico por su ayuda con cada nueva técnica que he necesitado usar.

A todos los compañeros de este laboratorio, que desde fuera parece tan extraño pero que se ha convertido en mi segunda casa: Jesús, por su cajón de azucarillos; Héctor por su incondicional ayuda informática; al equipo italiano que pasó por QuiFis: Matteo, Chiara, Juliana, Sergio y Francesca; a Javi por transmitir esa seguridad que él rebosa; y a Cristina, por dejarme aprender de cada conversación que mantuvimos y por compartir alguna que otra tarde de cañas, vermús e incluso paseos a caballo, gracias.

Al grupo Quimiuvis, con los que la carrera de Químicas no ha sido tan difícil como la gente decía y junto al que he sobrevivido a esos cuatro años de trabajos, exámenes, prácticas, fiestas, viajes y mucho más.

A toda mi familia, en especial, a mis abuelos, que, aunque no hayan llegado a entender muy bien lo que he estado haciendo estos años, cada fin de semana me preguntaban qué tal en clase. A Asier por caminar conmigo. A mis amigas Isabel

y María, por estar a mi lado. Y, sobre todo, a mis padres, por permitir ser todo lo que soy, ayudarme incondicionalmente, estar siempre a mi lado para darme otro empujoncito y demostrarme que cuando se quiere a alguien se hace todo por él.

Finalmente, agradezco la financiación del Fondo Social Europeo, Programa Operativo de Castilla y León, y de la Junta de Castilla y León, a través de la Consejería de Educación.

A todos, Gracias.

## ÍNDICE

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>PRÓLOGO .....</b>	<b>13</b>
<b>I. Introducción .....</b>	<b>17</b>
I.1. EL CÁNCER .....	19
I.1.1. TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER.....	20
I.2. LA CÉLULA.....	24
I.2.1. TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA .....	26
I.2.2. ADN.....	28
I.2.3. ARN .....	32
I.3. ÁCIDOS NUCLEICOS COMO DIANAS BIOLÓGICAS .....	34
I.4. OTRAS DIANAS BIOLÓGICAS.....	36
<b>II. Metodología experimental.....</b>	<b>39</b>
II.1. METODOLOGÍA QUÍMICO FÍSICA .....	41
II.1.1. Reactivos .....	41
II.1.2. Métodos .....	43
II.2. METODOLOGÍA BIOLÓGICA.....	65
II.2.1. Líneas celulares .....	65
II.2.2. ADN plasmídico pUC18.....	65
II.2.3. Seroalbúmina bovina.....	65
II.2.4. Métodos .....	65
<b>III. Doxorubicin binds to duplex RNA with higher affinity than DNA and favours the isothermal denaturation of triplex RNA .....</b>	<b>73</b>
III.1. RESUMEN .....	75
III.2. INTRODUCTION .....	77
III.3. RESULTS AND DISCUSSION.....	79
III.3.1. Equilibria.....	79
III.3.2. Circular dichroism (CD) measurements.....	83
III.3.3. Thermal stability.....	84
III.3.4. Viscosity measurements.....	86

III.3.5. Kinetic reactions (slow and fast) .....	88
III.4. CONCLUSIONS .....	92
<b>IV. Structure-activity relationship study of half sandwich Iridium complexes ...</b>	<b>93</b>
IV.1. RESUMEN .....	95
IV.2. INTRODUCTION .....	97
IV.3. RESULTS AND DISCUSSION .....	99
IV.3.1. Synthesis and characterization.....	99
IV.3.2. Solution studies .....	100
IV.3.3. Cytotoxicity.....	109
IV.3.4. Reactivity against Nucleobases and Nucleotides .....	112
IV.3.5. Interaction with DNA.....	115
IV.3.6. Interaction with BSA.....	126
IV.3.7. Cellular accumulation.....	126
IV.4. CONCLUSIONS .....	127
<b>V. Biological activity of a Naphthyl-Imidazo Phenanthroline (HNAIP) ligand and its [Ir(ppy)<sub>2</sub>(HNAIP)]Cl and Rh(ppy)<sub>2</sub>(HNAIP)]Cl complexes .....</b>	<b>129</b>
V.1. RESUMEN .....	131
V.2. INTRODUCTION .....	133
V.3. RESULTS AND DISCUSSION .....	134
V.3.1. Synthesis.....	134
V.3.2. Stability and solution studies .....	135
V.3.3. Cellular tests in the dark and under irradiation. ....	137
V.3.4. Interaction with DNA.....	138
V.3.5. Interaction with GSH and NADH.....	141
V.3.6. Cellular uptake.....	142
V.3.7. Interaction with BSA.....	145
V.3.8. Hydrophobicity (log P).....	146
V.4. CONCLUSIONS .....	146
<b>VI. Influence of the ancillary ligand and the metal centre on the biological reactivity of chrysin flavonoids .....</b>	<b>149</b>



VI.1. RESUMEN .....	151
VI.2. INTRODUCTION .....	153
VI.3. RESULTS AND DISCUSSION .....	155
VI.3.1. Biological activity .....	155
VI.3.2. Stability in DMSO and aqueous solution .....	157
VI.3.3. Interaction with the nucleotide GMP .....	164
VI.3.4. Interaction with DNA .....	169
VI.3.5. Interaction with glutathione .....	175
VI.4. CONCLUSIONS .....	176
<b>VII. General overview .....</b>	<b>179</b>
<b>VIII. Bibliografía .....</b>	<b>183</b>



## LISTADO DE ABREVIATURAS

[D]	Concentración de ligando en el equilibrio
[P]	Concentración de polinucleótido en el equilibrio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Seroalbúmina bovina
CD	Dicroísmo circular
$C_D$	Concentración analítica de ligando
$C_P$	Concentración analítica de polinucleótido
D	Ligando o droga
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EB	Bromuro de etidio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Suero fetal bovino
GMP	Guanosín monofosfato
GSH	Glutación
HSA	Seroalbúmina humana
I	Fuerza iónica
ICD	Dicroísmo circular inducido
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

ITC	Calorimetría de valoración isotérmica
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCaC	Cacodilato de sodio
NaCl	Cloruro sódico
P	Polinucleótido
PBS	Tampón fosfato salino
RCF	Fuerza centrífuga relativa
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBE	Disolución tampón de Tris, borato y EDTA
TCSPC	Medidas de tiempos de vida de fluorescencia
$T_m$	Temperatura de desnaturalización
UV	Ultravioleta
Vis	Visible

# Prólogo



## PRÓLOGO

Las drogas anticancerígenas y la Química Física se unen en esta tesis al estudiar los modos de interacción entre ellas y los ácidos nucleicos. El objetivo final es comprender algunos de los mecanismos de acción antitumoral.

Para combatir el cáncer se utiliza como principal arma la quimioterapia, campo que se encuentra en constante investigación con el objetivo de mejorar la eficacia de los antitumorales conocidos, disminuir sus efectos nocivos y superar la resistencia adquirida. Muchos de los fármacos utilizados hoy en día en las terapias anticáncer tienen como principal diana biológica el ADN debido a su papel vital en los procesos de replicación y transcripción. Por ello, esta tesis tiene como pilar básico el estudio de la interacción entre moléculas orgánicas e inorgánicas con propiedades antitumorales y moléculas biológicas, tales como ADN, ARN y proteínas similares a las humanas, como es la seroalbúmina bovina.

Dentro de la Química Física, la Termodinámica y Cinética estudian las propiedades de equilibrio y los mecanismos de las reacciones químicas que permiten determinar los tipos de interacción y las fuerzas que los gobiernan. Para el estudio se han empleado técnicas espectrofotométricas, como absorción, fluorescencia y dicroísmo circular (CD); técnicas calorimétricas, como calorimetría diferencial de barrido (DSC) y de titulación isotérmica (ITC); técnicas reológicas como viscosimetría y técnicas singulares como son las de Stopped-Flow y T-Jump, que permiten el seguimiento de reacciones del orden de milisegundos y microsegundos, respectivamente, tiempo en el que se producen muchas reacciones biológicas. Estos estudios se han complementado con ensayos de citotoxicidad y captación celular.

Durante una estancia de tres meses en la Universidad de Sheffield (UK) tuve un primer contacto con cultivos celulares y los estudios de citotoxicidad fueron continuados en la UBU. Esta estancia también me permite optar a la Mención de Doctorado Internacional, que exige la escritura de parte del presente trabajo en una de las lenguas habituales para la comunicación científica distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España. Por ello, los Capítulos I y II se encuentran redactados en español, mientras que los resultados experimentales, discusión y conclusiones se encuentran redactados en lengua inglesa.

Los resultados experimentales se encuentran agrupados en los capítulos III a VI:

- En el Capítulo III se estudia la interacción de la molécula orgánica doxorubicina (DOX) con ARN en doble y triple hélices. DOX es una droga usada como antitumoral cuya acción no está del todo clara pero se asigna a la unión con el ADN y la topoisomerasa II inhibiendo la transcripción. Sin embargo, en este trabajo revelamos que su afinidad por el ARN es mucho mayor que por el ADN, así como la preferencia por la doble frente a la triple hélice de ARN.
- En el Capítulo IV se estudian las diferencias de comportamiento en disolución y características biológicas de una familia de complejos metálicos de Iridio tipo half-sandwich con ligandos benzimidazol, los cuales se diferencian en un átomo o pequeño grupo de átomos. Se demuestra la gran influencia de la estructura química en la citotoxicidad frente a distintas líneas tumorales humanas y en su reactividad frente a diferentes tipos de moléculas biológicas como ADN o la proteína BSA.
- En el Capítulo V se estudia la influencia del centro metálico de tres compuestos con ligando 2-(hydroxy-1-naphtyl)imidazo-[4,5-f][1,10]fenantrolina en la citotoxicidad e interacción con polinucleótidos y la proteína BSA.
- Finalmente, en el Capítulo VI se estudia la influencia de los centros metálicos de Iridio, Rodio y Rutenio, y de los diversos sustituyentes del ligando, cuya estructura base es la crisina, en su reactividad biológica.

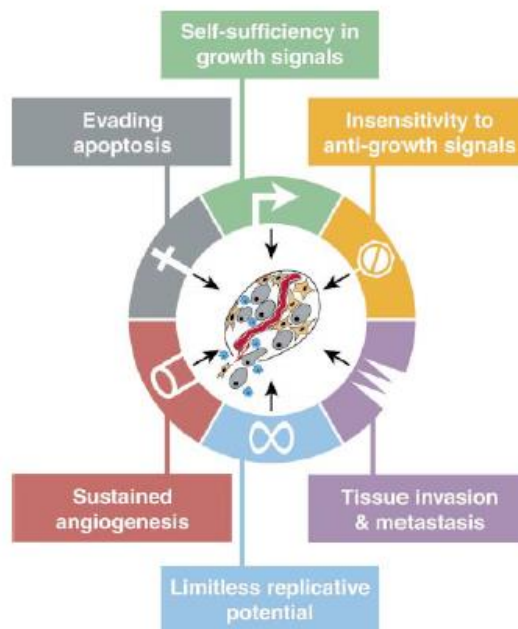


# I. Introducción



## I.1. EL CÁNCER

Según la OMS el cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. Es una enfermedad en la que las células cancerosas, desarrollan un grado de autonomía a las señales que las indican si deben dividirse o morir, siendo el resultado un crecimiento incontrolado. Si esta continua proliferación se expande, la consecuencia es nefasta. De hecho, el 90% de las muertes relacionadas con el cáncer son debidas a la propagación por el organismo, proceso denominado metástasis. La complejidad de esta enfermedad no se reduce al comportamiento anómalo de una única célula, ya que dicho comportamiento está influenciado por el ambiente de sus células vecinas. Hay más de 100 tipos de cáncer y cada órgano puede tener más de un subtipo de tumores, entonces ¿qué cambios se producen en la fisiología de la célula para dar lugar a las células cancerosas? La respuesta a esta pregunta se conoce como los sellos distintivos del cáncer, las seis alteraciones que conducen al crecimiento de las células malignas (Figura 1): autosuficiencia en señales de crecimiento, evasión de la muerte celular, angiogénesis constante, insensibilidad a señales anticrecimiento, capacidad de división ilimitada e invasión de los tejidos, metástasis [1].



**Figura 1.** Sellos distintivos del cáncer [1].

### **I.1.1. TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER**

Hoy en día los principales tratamientos disponibles contra el cáncer son la cirugía, la radioterapia, la terapia hormonal, la inmunoterapia, la terapia dirigida, la terapia fotodinámica y la quimioterapia [2].

La cirugía es la opción que permite extraer el tumor. Es efectiva, pero es arriesgada y no es posible en todos los casos dependiendo de la localización del tumor. Suele ir acompañada de radioterapia y quimioterapia. La radioterapia consiste en administrar radiación ionizante para provocar daños irreparables en el ADN de las células cancerosas. Esa radiación es administrada con gran precisión sobre el tumor de manera que no se daña el tejido sano. La quimioterapia se basa en drogas que disminuyen o detienen el crecimiento de las células malignas, sin embargo, el tejido sano también se ve afectado lo que provoca graves efectos secundarios. Hay distintos tipos de quimioterapia como la terapia hormonal, la inmunoterapia o la terapia fotodinámica. La terapia hormonal se usa en aquellos tumores sensibles a las hormonas, como el de mama o el de próstata, para impedir la estimulación del crecimiento del cáncer. Está destinada a ralentizar, evitar una recaída o paliar sus efectos. En cambio, la inmunoterapia estimula los anticuerpos del sistema inmunitario para destruir las células cancerosas, las cuales poseen unos antígenos específicos [3]. Esta terapia se encuentra en pleno desarrollo en combinación con la cirugía y la quimioterapia. En la terapia dirigida las sustancias empleadas actúan sobre moléculas concretas que participan en el crecimiento, avance o disminución del cáncer, no directamente sobre las células malignas. Las células sanas, de esta manera, no se ven afectadas [4]. En la terapia fotodinámica el medicamento usado es un fotosensibilizador que, al ser expuesto a una longitud de onda específica, genera especies radicales citotóxicas. Este medicamento suele acumularse en mayor medida sobre las células cancerígenas, además, la irradiación solo se ejerce sobre el tumor, de manera que no se produce daño sobre los tejidos sanos [5].

En este trabajo la investigación realizada se enmarca en la quimioterapia, ya que se centra en la búsqueda de nuevos fármacos con potencial antitumoral y se estudia la doxorubicina, un tipo de antraciclina, y agentes alquilantes, como el cisplatino y complejos metálicos de Iridio, Rodio y Rutenio.

### **I.1.1.1. Doxorrubicina**

Las antraciclinas son un grupo de antibióticos antineoplásicos producidos por el hongo *Streptomyces* cuya estructura consiste en un núcleo plano de antraquinona, unido a un aminoazúcar. Son cuatro las antraciclinas aprobadas para uso clínico: doxorrubicina, daunorrubicina, epirrubicina e idarrubicina; siendo la doxorrubicina la más usada en la quimioterapia contra el cáncer, como veremos en el capítulo III de esta tesis.

La actividad anticancerígena de DOX se atribuye a la interacción y daño de la doble hebra de ADN, ya que la parte cromófora de la molécula se intercala, el grupo aminoazúcar se une al surco menor y se forman enlaces de hidrógeno entre los sustituyentes de uno de los anillos y el esqueleto del ADN, lo que impide su replicación [6,7]. En esta unión al ADN la DOX presenta afinidad por las secuencias G-C, lo cual puede explicarse de forma general al considerar que estos pares de bases son más polares que los pares A-T y, por tanto, interactúan más fácilmente con sistemas de anillos polarizables.

Su actividad también se atribuye a la inhibición de la enzima topoisomerasa II (enzima capaz de cambiar el superenrollamiento del ADN) debido a la formación de un complejo ternario DOX-TopoII-ADN [8].

### **I.1.1.2. Cisplatino**

En los últimos años, los complejos metálicos se han alzado como alternativas frente a las moléculas orgánicas para diseñar compuestos con más ventajas, puesto que los metales de transición poseen varios estados de oxidación y geometrías moleculares sobre las cuales se puede diseñar la esfera de coordinación de los ligandos. Por otra parte, teniendo en cuenta que las propiedades termodinámicas y cinéticas de los compuestos metálicos son sensibles a la naturaleza de los ligandos, las terapias basadas en metales se pueden optimizar para encontrar las funciones biológicas deseadas a través de la modificación de los ligandos auxiliares. Además, la preparación de compuestos metálicos es altamente modular, lo cual contrasta favorablemente con la larga síntesis de moléculas orgánicas.

El más utilizado y conocido es el cis-diaminodicloroplatino(II), comúnmente denominado cisplatino, cuyo descubrimiento, de manera fortuita, tuvo lugar en 1965 por Rosenberg mientras investigaba el efecto de los campos eléctricos en el crecimiento de bacterias [9]. Enseguida entró en ensayos clínicos y se aprobó su aplicación médica. Es usado en diversos tipos de cáncer como el de ovario, cabeza, cuello, pulmón, linfomas o sarcomas.

El complejo neutro de platino es activado a través de reacciones de acuación espontáneas en la que se sustituyen los cloros por moléculas de agua. El complejo monosustituido es una especie muy reactiva capaz de interactuar con nucleófilos como el glutatión, la metionina o las proteínas. Así, cuando el cisplatino entra en la célula es vulnerable de ser inactivado por cualquiera de estos y otros componentes intracelulares. Su acción se atribuye a la interacción con el N7 de las bases purinas del ADN formando aductos con el mismo. Estos aductos interfieren en la replicación y transcripción del ADN, lo que desencadena mecanismos de reparación, activación de varias vías de transducción de señales, incluida la señalización de calcio, la señalización de receptores de muerte celular y la activación de vías mitocondriales, los cuales en el intento de reparación del daño provocan rupturas irreversibles de la hélice de ADN e inducen la apoptosis [10,11].

Junto con el uso del cisplatino aparece la resistencia adquirida a este fármaco [12]. La aparición de la resistencia es debida a alteraciones que se producen [13]:

- antes de llegar al ADN, por reducción de la concentración de cisplatino debido al secuestro por proteínas o moléculas como el glutatión.
- cuando se unen al ADN, ya que las células se vuelven capaces de sobrevivir con las lesiones provocadas por el cisplatino y no necesitan mecanismos de reparación.
- relativas a las vías de señalización que aparecen después de la unión al ADN debido a una gran cantidad de alteraciones que incluyen defectos en las vías de transducción de señales que normalmente provocan apoptosis en respuesta al daño provocado en el ADN.
- Y las que afectan a rutas moleculares indirectamente, provocadas por la interrupción de las señales de muerte celular inducidas por el cisplatino.

La resistencia adquirida junto con su baja especificidad y los efectos secundarios del cisplatino hace que la investigación en quimioterapia se centre en el

desarrollo de complejos análogos con mayor eficacia y menores efectos secundarios.

La acción de estas drogas usadas en las terapias actuales contra el cáncer tiene lugar a través de polinucleótidos, y su estructura y tipos de interacción se describen el apartado I.3.

### **I.1.1.3. Otros complejos metálicos**

El rotundo éxito del cisplatino en el tratamiento del cáncer ha impulsado el esfuerzo por diseñar otros complejos metálicos con propiedades antitumorales beneficiosas [14]. Sin embargo, a pesar de la evaluación de sus análogos, solo otros dos agentes antineoplásicos, carboplatin y oxaliplatin, se usan de manera general en el ámbito clínico. Se han cribado miles de complejos de Platino(II) sin éxito y la probabilidad de descubrir nuevas drogas con propiedades terapéuticas se han visto limitadas.

Esta conclusión ha encabezado un creciente interés en las propiedades antimetastásicas y antineoplásicas de complejos con metales distintos al platino. Debido a su similitud en la velocidad de intercambio de ligandos en disolución acuosa [15] y su generalmente baja toxicidad, los compuestos de Rutenio(III) han recibido mucha atención como posibles alternativas al Pt(II) como agentes anticancerígenos [16–19]. En cambio, en el comienzo de esta tesis las investigaciones sobre los efectos biológicos de los compuestos vecinos del grupo 9, Rodio e Iridio, eran escasas.

Debido a la desestabilización de los electrones 5d, el estado de oxidación +3 del metal de transición Ir(III), es un átomo blando y el enlace resultante prefiere los ligandos blandos con átomos dadores, como el sulfuro o los residuos de L- metionina y L- cisteína de péptidos y proteínas, o átomos dadores frontera como el nitrógeno imino endocíclico de las nucleobases. Su equivalente más ligero, el Rh(III), exhibe mejores propiedades ácido-base, por lo tanto, está mejor equipado para acomodar átomos dadores en su esfera de coordinación. Esto significa que los compuestos análogos de Rh(III) e Ir(III) no sólo exhibirán una respuesta cinética gradual, sino que se unirán preferentemente a diferentes moléculas diana en sistemas biológicos. Sus preferencias de unión se pueden modificar por las propiedades ácido-base de sus ligandos en las caras externas.

Desde hace algo más de una década la relación estructura actividad y los efectos celulares citotóxicos de los compuestos de Rodio(III) y sus análogos de Iridio(III) han sido objeto de estudio de muchos grupos de investigación. Existen dos enfoques racionales para diseñar este tipo de complejos, uno implica la introducción de uno o más ligandos con un fuerte efecto trans que mejora significativamente la velocidad de sustitución del ligando haluro opuesto, y el otro, conlleva la coordinación de ligandos citotóxicos por sí mismos, que pueden participar potencialmente en interacciones específicas con dianas biológicas. Este segundo enfoque mejora las propiedades farmacológicas y la biodisponibilidad de los ligandos coordinados a través de factores como la modificación de la carga, la mejora de la solubilidad y la captación celular [20–22].

La reactividad del Rodio(III) e Iridio(III), sus preferencias de enlace y la captación celular son fuertemente dependientes de la combinación de los ligandos y la geometría de coordinación, con lo que se consigue un gran avance en el diseño de drogas.

## **I.2. LA CÉLULA**

Para poder entender la base de los tratamientos anticancer primero debemos adentrarnos en el conocimiento de la unidad básica de la vida, la célula. Ésta es la base de todos los organismos vivos, y todas estas unidades de materia viva comparten el mismo funcionamiento básico. El cuerpo humano, por ejemplo, está formado por más de  $10^{13}$  células. Es el medio en el que viaja la información hereditaria que define las especies, siendo capaz de, a partir de ella misma, generar una nueva célula igual a sí misma con una nueva copia de su información genética.

Las células están formadas por unos orgánulos capaces de realizar las funciones vitales, como son núcleo, retículo endoplasmático, ribosomas, aparato de Golgi, mitocondrias y lisosomas (Figura 2). Estos orgánulos están inmersos en un líquido intracelular llamado citosol, el cual proporciona un ambiente óptimo para los procesos fisiológicos que en él tienen lugar. Los filamentos de proteína (microfilamentos, microtúbulos, filamentos intermedios) integran el citoesqueleto, que organiza y mantiene la forma de la célula, además, mantiene a los orgánulos en su sitio e interviene en la endocitosis (proceso en el que la

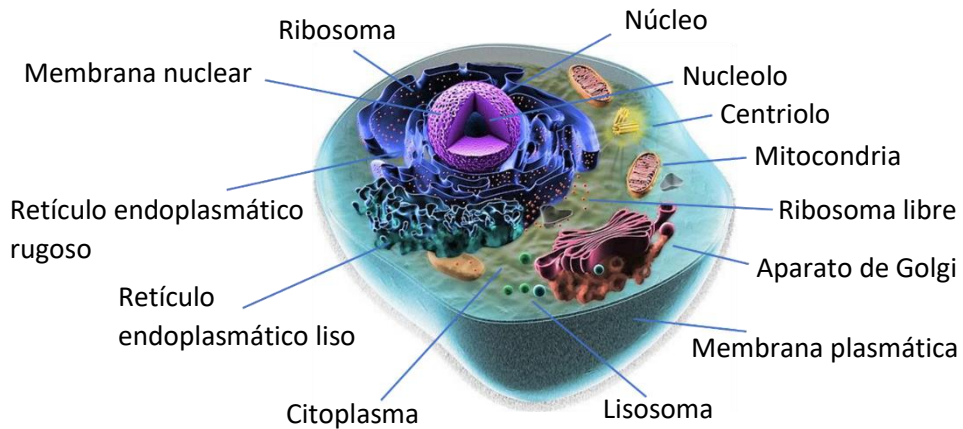


célula capta moléculas del exterior). El núcleo es la sede central de la célula, este orgánulo esférico, contenido en una doble membrana, engloba toda la información genética del organismo en el ADN cromosómico. Incluso la replicación del ADN y la transcripción del ARN se producen en su interior. Allí hay una estructura sin membrana formada por proteínas y ADN condensado (cromatina), llamado nucleolo, donde se ensambla y almacena el ARN.

El núcleo está rodeado por una red de túbulos y vesículas denominada retículo endoplasmático (RE). Éste puede ser liso, donde se produce la síntesis de lípidos y esteroides, o rugoso, donde tiene lugar la síntesis de proteínas. El RE rugoso tiene esparcidos en su exterior pequeñas formaciones llamadas ribosomas, en los que se sintetizan las proteínas a partir de los aminoácidos. Las proteínas fabricadas aquí se dirigen al aparato de Golgi, donde son procesadas para después ser transportadas a su destino.

Toda la energía que utiliza la célula se genera en la mitocondria, donde se producen dos de las tres etapas de la respiración celular (ciclo de Krebs y cadena transportadora de electrones). La energía es producida en la fosforilación del ATP consumiendo el oxígeno generado en la reducción de la glucosa. Sin embargo, el metabolismo de las células cancerosas es diferente y presenta una disminución de la función mitocondrial, de manera que en sus mitocondrias no se produce el ciclo de Krebs ni la cadena transportadora de electrones, obteniendo menos ATP y un rendimiento energético mucho menor [23].

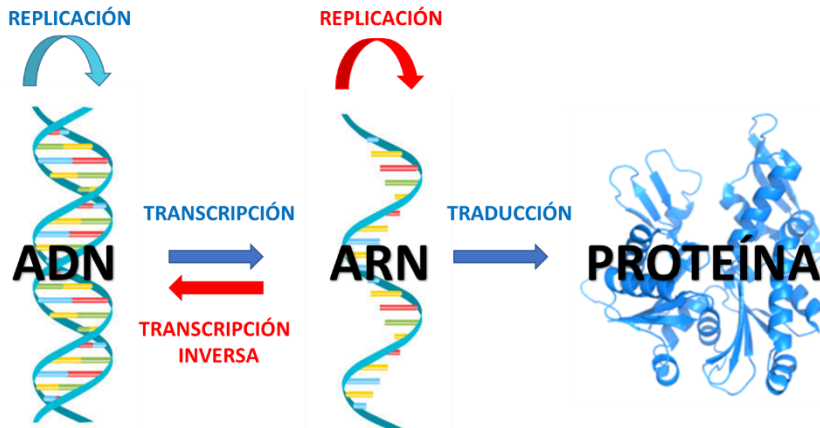
Los lisosomas son pequeños orgánulos que contienen enzimas, las cuales oxidan otros compuestos orgánicos sin producir ATP. El ambiente de su interior es ácido y contiene varias hidrolasas para degradar los productos celulares innecesarios.



**Figura 2.** Esquema de una célula. Adaptada de biologydictionary.net.

### **I.2.1. TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA**

La información hereditaria en todas las células vivas está almacenada en el ADN, el cual es la base del código genético, es decir, contiene toda la información por la que se rigen los procesos que los seres vivos necesitan para desarrollarse, crecer y reproducirse. El flujo de información genética que se produce de los seres vivos adultos a sus descendientes se conoce como dogma central de la biología molecular (Figura 3) [24], en el que el ADN puede duplicarse generando una copia de sí mismo o transcribirse a ARN, de manera que, a su vez, éste se traduce en proteínas. Este esquema fue modificado posteriormente con dos procesos adicionales [25]: la transcripción inversa y la replicación del ARN. La transcripción inversa supuso no sólo un cambio sustancial en el dogma central de la biología sino también una auténtica revolución que hizo que se replantearan algunos principios básicos en el estudio de los sistemas vivos, como es el origen de la vida.



**Figura 3.** Dogma central de la biología molecular (en rojo las adiciones posteriores).

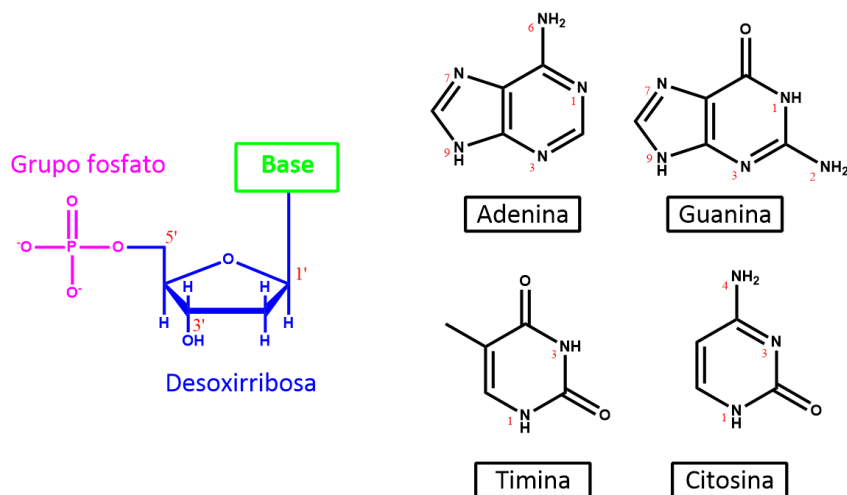
En el proceso de transmisión de la información genética en los seres vivos, el ADN puede resultar dañado. De hecho, el ADN de las células del cuerpo humano recibe miles de lesiones al día. Si estas lesiones no son reparadas, o lo son, pero de manera incorrecta, se pueden producir mutaciones o errores a mayor escala que amenacen la viabilidad celular. Pueden aparecer por errores fortuitos en el apareamiento de bases durante los procesos de replicación y transcripción, o provocadas por agentes físicos o químicos, que a su vez pueden ser naturales o artificiales. Por ejemplo, un fallo en la acción de las topoisomerasas puede producir la rotura de las hebras de ADN. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) originadas como subproductos de la respiración oxidativa o las reacciones en las que intervienen metales, también pueden producir daño al ADN, al igual que las especies de oxígeno y nitrógeno generadas por macrófagos y neutrófilos cuando existen infecciones. También el medio ambiente afecta a la estabilidad del ADN, de hecho, la radiación ultravioleta (UV) es el agente omnipresente más dañino.

Estas alteraciones son el resultado de la combinación de mutaciones genéticas y agentes externos. Las mutaciones de ADN provocan fallos en los ciclos celulares y, como consecuencia, alteran el comportamiento de una célula normal. Las mutaciones relacionadas con los genes que controlan los procesos de crecimiento y división celular hacen que células anómalas crezcan de manera

incontrolada ignorando los órdenes habituales de la división celular y provocando la segunda causa de muerte mundial, el cáncer.

### I.2.2. ADN

Químicamente hablando, la molécula de ADN (ácido desoxirribonucleico) es un polinucleótido, es decir, una larga cadena de unidades más sencillas, los denominados nucleótidos, los cuales están formados por: un monosacárido pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. El monosacárido es la desoxirribosa y las bases nitrogenadas pueden ser de tipo pirimidina (timina, citosina) o de tipo purina (adenina y guanina), esquematizados en la Figura 4.

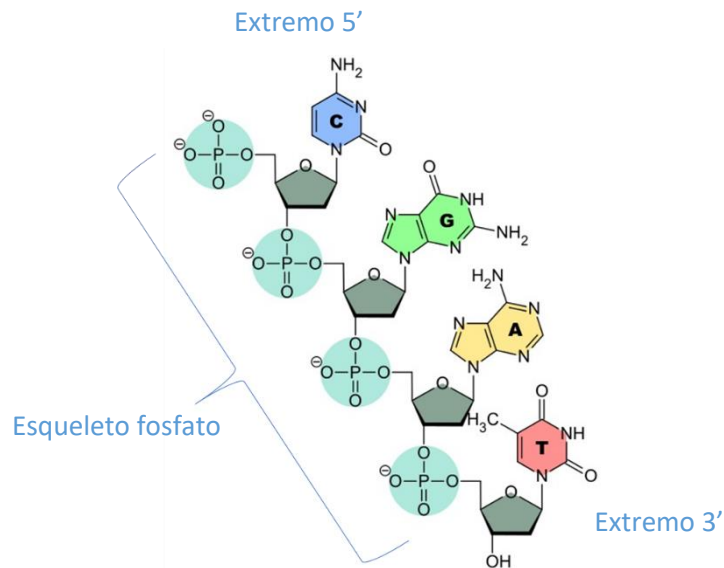


**Figura 4.** A la izquierda, esquema general de un nucleótido. A la derecha, estructura de las bases nitrogenadas.

La desoxirribosa se une por el carbono C1' a las bases nitrogenadas a través de un enlace N-β-glucosídico, y por el C5' al grupo fosfato mediante un enlace éster. Por su lado, las bases nitrogenadas se unen a través de su átomo de nitrógeno N9, si es adenina (A) o guanina (G), o a través del nitrógeno N1, si es timina (T) o citosina (C).

La estructura primaria del ADN es la unión de los sucesivos nucleótidos de forma covalente mediante enlaces fosfodiéster. En estos enlaces el grupo fosfato en el

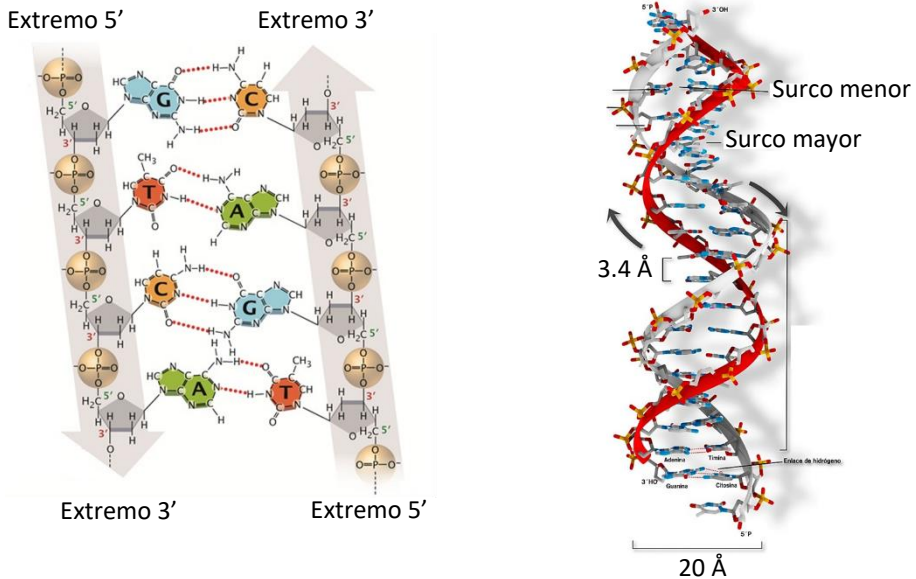
C5' de un nucleótido se une al grupo hidroxilo en el C3' del siguiente dando lugar a una estructura lineal cuyos extremos libres siempre son uno 3' y otro 5', como se representa en la Figura 5. Por convenio, la secuencia nucleotídica se indica en dirección 5'-3'. El esqueleto formado por los residuos alternados de fosfato y pentosa forman el esqueleto covalente que se mantiene constante y del que sobresalen lateralmente las bases nitrogenadas, que son la parte variable.



**Figura 5.** Estructura primaria del ADN.

La estructura secundaria es la distribución espacial de la secuencia nucleotídica. En el ADN la forma más abundante consiste en dos cadenas antiparalelas (una cadena en sentido 5' → 3' y la complementaria en sentido 3' → 5') helicoidales enrolladas alrededor del mismo eje formando una doble hélice dextrógira en la cual los grupos fosfato, cargados negativamente, se orientan hacia el exterior, y las bases, hidrofóbicas y prácticamente planas, se encuentran apiladas en el interior (Figura 6). A esta estructura se le denomina B-ADN. Las bases de ambas cadenas están apiladas en el interior de la doble hélice y situadas con una separación de 3.4 Å entre ellas, en posición perpendicular al eje longitudinal de la hélice. Cada base de una cadena está apareada en el mismo plano con una base de la otra cadena por enlaces de hidrógeno que estabilizan la doble hélice. El apareamiento siempre se produce entre A-T y G-C (apareamientos de Watson

y Crick), existiendo dos puentes de hidrógeno entre las primeras y tres entre las segundas [26]. El resultado es una hélice de 20 Å de diámetro, con 20 pares de bases por vuelta, y con un surco mayor y un surco menor en su superficie, tal y como se representa en la Figura 6.

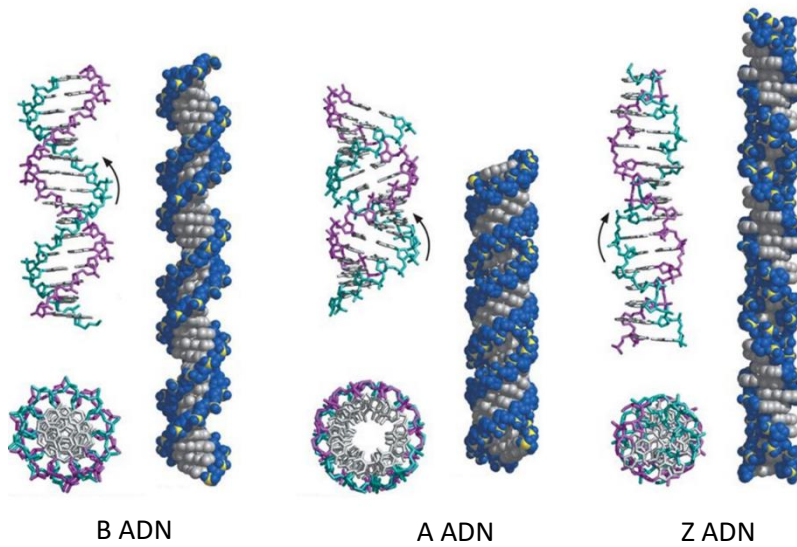


**Figura 6.** A la izquierda estructura secundaria del ADN [27], y a la derecha su estructura terciaria (adaptada de 3Dciencia.com).

Además de la forma B existen la forma A y Z. La forma A es antiparalela y dextrógira pero las bases se aparean hacia el exterior. El empaquetamiento de las bases es mayor, 11 pares de bases por vuelta, al igual que el diámetro, 26 Å, con un surco mayor más estrecho y profundo y un surco menor más ancho y superficial (Figura 7). Esta forma está presente en condiciones de baja hidratación [28].

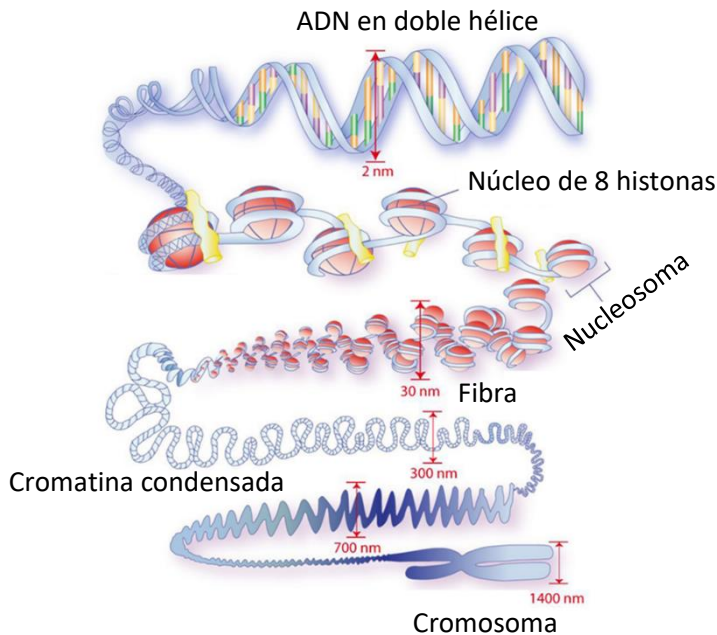
La forma Z es una hélice levógira, con 11.6 pares de bases por vuelta y 18 Å de diámetro. El apilamiento de las bases hace que la cadena de residuos fosfato presente una disposición en zig-zag. Su surco mayor es completamente plano y el menor estrecho y profundo. La forma Z aparece a concentraciones altas de sales o de cationes multivalentes.

Existen otras estructuras secundarias como las de tres o cuatro hebras.



**Figura 7.** Formas A, B y Z del ADN (adaptada de Pearson Education).

El superenrollamiento de la doble hélice sobre sí misma da lugar a la estructura terciaria: los cromosomas (Figura 8). Este superenrollamiento del ADN es diferente en virus, procariontes y eucariotes. En las células eucariotas el ADN está unido a las proteínas histonas, formando núcleos octaméricos denominados nucleosomas, que a su vez se empaquetan en una fibra de 30 nm que, asociada a proteínas de tipo no histona, se empaqueta aún más dando lugar a las fibras de cromatina [29].



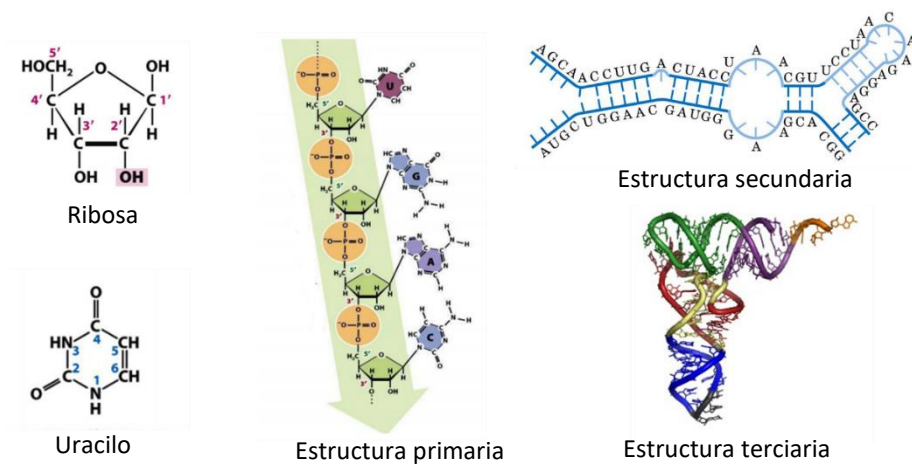
**Figura 8.** Empaquetamiento del ADN en eucariotas. Imagen modificada de dicyt.com.

### I.2.3.ARN

El ARN, ácido ribonucleico, es un polinucleótido análogo al ADN, consta de: un monosacárido pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. La pentosa, en este caso, es la ribosa (de ahí los nombres) y las bases nitrogenadas son guanina, citosina, adenina y uracilo (pirimidínica), es decir, comparte las tres primeras con el ADN.

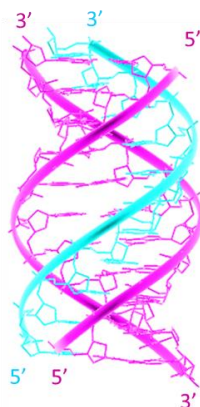
La estructura secundaria del ARN es una hélice sencilla dextrógira, ya que no puede adoptar la conformación de doble hélice tipo B del ADN porque lo impiden las peculiaridades estéricas que le confiere el -OH en posición 2' de la ribosa. Pero también puede replegarse sobre sí mismo y formar una doble hélice con los fragmentos complementarios de máxima estabilidad, en este caso la conformación que adopta es A, con apareamientos Watson-Crick entre A-U y G- C (Figura 9).





**Figura 9.** Componentes del ARN y conformaciones que adopta.

Al igual que en el ADN también existe la estructura secundaria en triple hélice (Figura 10) en la que la tercera hebra se sitúa en el surco mayor uniéndose a través de nuevas interacciones de hidrógeno entre los átomos N7, O6 y N6 de las purinas, denominadas apareamientos de Hoogsteen [30]. Las triples hélices pueden ser intermoleculares, si la tercera hebra proviene de otra cadena de ARN, o intramoleculares, si la tercera hebra proviene de la misma molécula de ARN quedando otra hebra libre [31]. Las triple hélices son los sitios de reconocimiento de muchas proteínas para la regulación de la expresión génica en células eucariotas [32,33].



**Figura 10.** Representación de la triple hélice de ARN.

Gracias a la libertad de rotación del esqueleto de nucleótidos de las regiones de bases desapareadas, el ARN puede adoptar multitud de estructuras terciarias [34], en las que pueden darse apareamientos triples de bases, asociaciones con otras moléculas de ARN o asociaciones con proteínas.

Las estructuras de ADN y ARN se pueden ver modificadas al interactuar con ligandos, el estudio de esa interacción es una de las estrategias más usadas en la investigación de enfermedades infecciosas y del cáncer [35] y se encuentran explicadas a continuación.

### **I.3. ÁCIDOS NUCLEICOS COMO DIANAS BIOLÓGICAS**

Como se ha mencionado, muchas de las terapias anti-cáncer utilizadas hoy en día tienen como objetivo el ADN, por ello las interacciones que tienen lugar entre estos fármacos y los polinucleótidos es objeto de estudio en diversos campos como la química, la biología molecular y la medicina. A continuación, se describen los tipos de interacción ligando-polinucleótido, referido tanto a ADN como a ARN.

#### **I.3.1.1. INTERACCIONES COVALENTES**

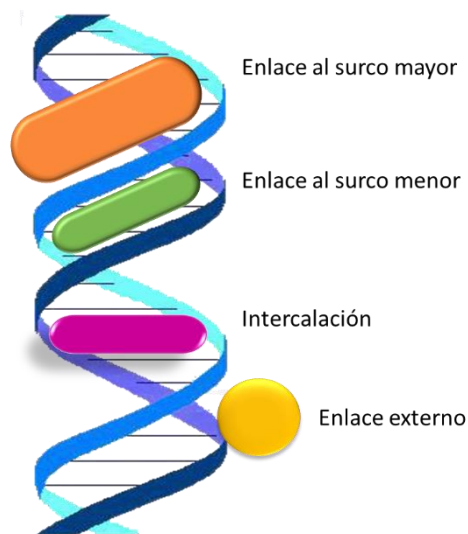
Las interacciones covalentes son irreversibles e impiden los procesos de replicación del ADN, lo que conduce a la muerte celular [36]. El N7 de la guanina es el sitio más accesible para la coordinación de los ligandos pero pueden interactuar por más de un sitio, incluso con ambas cadenas, impidiendo que éstas se desenrollen en el proceso de transcripción y evitando la lectura del ADN para ser duplicado o para sintetizar su correspondiente ARN [37]. A la unión de un ligando con el ADN o ARN a través de más de un sitio se le denomina "crosslinking" [38]. Si los dos sitios son de la misma cadena se denomina intracatenario y si son de distinta cadena, se denomina intercatenario. Este tipo de interacción da lugar a daños en el ADN que provocan la ruptura de la cadena de polinucleótido cuando las enzimas de reparación intentan reemplazar las bases nitrogenadas [39]. Como ocurre en el ya mencionado cisplatino.

### I.3.1.2. INTERACCIONES NO COVALENTES

Los ligandos pueden unirse de forma reversible al polinucleótido a través de distintos tipos de interacciones no covalentes (Figura 11):

- Unión **externa**: es una unión de tipo electrostático entre una molécula y el esqueleto del ADN. La molécula, generalmente cargada positivamente, reemplaza a un ion sodio para interactuar con los grupos fosfato. Es un tipo de unión poco específica y depende intensamente de la fuerza iónica del medio; cuando ésta es alta, los cationes salinos neutralizan la carga negativa del ADN y la atracción por el ligando catiónico se ve disminuida [40]. Este modo de interacción suele coexistir con otros tipos.
- Unión al **surco**: las moléculas se insertan en los surcos del ADN estableciendo enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. Dependiendo de en cuál de los surcos lo haga, hablaremos de uniones al surco mayor o al surco menor. Hay muchos tipos de moléculas que se unen al ADN de esta manera, pero con carácter general, aquellas más pequeñas con anillos aromáticos, estructuras alargadas y algo curvadas interactúan con el surco menor [41,42], y moléculas grandes como proteínas y oligonucleótidos, lo hacen con el surco mayor [32,43]. Es un tipo de interacción más específica que la anterior.
- En la **intercalación**, los ligandos, principalmente con anillos aromáticos y regiones planas [44], se insertan entre dos pares de bases consecutivos del ADN, estabilizándose gracias a interacciones de apilamiento o stacking [45]. La intercalación puede ser total, si se inserta la molécula completamente, o parcial, si es solo una parte la que se intercala. Estas interacciones hacen que los complejos formados sean menos sensibles a los cambios de fuerza iónica que los enlaces externos o las uniones al surco. La intercalación es el modo de interacción que provoca la mayor distorsión en la molécula de ADN, ya que modifica la estructura de la hélice, cambia la conformación, reduce el ángulo de torsión y, por tanto, la hélice se alarga [46]. La intercalación interfiere con numerosos procesos de la célula como la inhibición de enzimas que regulan o intervienen en la replicación, transcripción y reparación del ADN, por lo

que afectan a la traducción y a la expresión génica. Un ejemplo de este tipo de interacción es la que tiene lugar entre la doxorubicina y el ADN.



**Figura 11.** Representación de los tipos de interacción no covalente con ADN/ARN.

#### **I.4. OTRAS DIANAS BIOLÓGICAS**

De todas las moléculas presentes en los organismos vivos, las proteínas son las más abundantes y diversas desde un punto de vista funcional. La albúmina es la proteína más habitual en los organismos de los vertebrados y la proteína plasmática más importante (alrededor del 60% del contenido total de proteínas del plasma).

La investigación sobre la gran capacidad de unión y el mecanismo de interacción de moléculas pequeñas con albúminas del suero es crucial para la comprensión de la farmacodinámica y farmacocinética de medicamentos, ya que la naturaleza y la fuerza de esa interacción tienen una gran influencia en el ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) de medicamentos. Muchos compuestos endógenos y exógenos (incluidos los medicamentos, hormonas, xenobióticos y ácidos grasos), una vez que ingresan en el torrente sanguíneo, se transportan y eliminan como consecuencia de la formación de un complejo con albúminas de suero. Esta clase de proteínas también contribuye a la presión osmótica y al mantenimiento del pH de la sangre, pero una de las propiedades más

importantes de las albúminas es que se unen a diferentes compuestos de manera reversible. La proteína a menudo aumenta la solubilidad aparente de los fármacos hidrófobos en el plasma e influye en la circulación, el metabolismo y la eficacia de éstos.

La albúmina de suero bovino (**BSA**) suele seleccionarse como un modelo de estudio relevante, debido a su similitud estructural en un 76% con la albúmina de suero humano (HSA), su bajo coste y amplia disponibilidad [47].

La molécula de BSA consiste en 583 aminoácidos, unidos en una cadena única reticulada con 17 residuos de cistina (ocho enlaces disulfuro y un grupo tiol libre), y tiene una masa molecular de 66400 Da. La cadena de aminoácidos está formada por tres dominios homólogos, pero estructuralmente distintos, divididos en nueve bucles por los enlaces disulfuro y dispuestos en una molécula en forma de corazón. Cada dominio consta de dos subdominios, A y B. La estructura secundaria de la proteína es principalmente  $\alpha$ -helicoidal [48].

El glutatión (**GSH**) es un tripéptido (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina) con múltiples funciones en los organismos vivos. Al ser portador de un grupo tiol activo en forma de un residuo de cisteína, actúa como un antioxidante ya sea interactuando con especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente) y electrófilos, u operando como un cofactor para varias enzimas.

Las formas reducidas y oxidadas de glutatión (GSH y GSSG) actúan en conjunto con otros compuestos activos redox (por ejemplo, NADH) para regular y mantener el estado redox celular. El ratio de estas dos formas es utilizado como indicador de estrés oxidativo.

La estructura química del GSH determina sus funciones potenciales, su amplia distribución entre todos los organismos vivos y su alta concentración en el citoplasma celular (mM) reflejando su importante papel biológico. La función más destacable de GSH es la protección frente a ROS y RNS, la desintoxicación de toxinas endógenas y exógenas de naturaleza electrofílica y la participación en numerosas reacciones de reparación de ADN.

Dado que GSH participa no solo en los sistemas de defensa antioxidantes, sino también en muchos procesos metabólicos, su función no se puede sobreestimar

y no es sorprendente haya atraído la atención de investigadores, médicos y farmacólogos [49].

La nicotinamida adenina dinucleótido (**NADH**) es un nucleótido piridina esencial que sirve como cofactor y sustrato para una serie de procesos celulares críticos implicados en la fosforilación oxidativa y la producción de ATP, la reparación del ADN, la expresión génica modulada epigenéticamente, la señalización intracelular del calcio y las funciones inmunológicas.

NAD<sup>+</sup> se reduce a NADH en una reacción reversible al unirse a un ion hidruro de un sustrato oxidable. Cuando NADH libera sus electrones, la forma NAD<sup>+</sup> se recupera para comportarse como un cofactor enzimático que desempeña un papel clave en las reacciones de oxidación y reducción durante el metabolismo celular. Es, de hecho, un transportador de electrones universal que produce energía derivada de ATP en el proceso catabólico y, por lo tanto, mantiene la homeostasis celular [50].

# **II. Metodología experimental**





## **II.1. METODOLOGÍA QUÍMICO-FÍSICA**

### **II.1.1. Reactivos**

#### **II.1.1.1. Disolvente**

Todas las disoluciones han sido preparadas en agua bidestilada mediante un equipo Puranity TU+ de VWR. Como disolución tampón se ha utilizado cacodilato sódico 2.5 mM,  $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}$ , abreviado como NaCaC, y para el control de la fuerza iónica cloruro sódico (NaCl). Las disoluciones madre de NaCaC y NaCl han sido preparadas utilizando reactivos comerciales de grado de pureza >99 %.

Los compuestos de síntesis no solubles en agua han sido disueltos primeramente en DMSO y, posteriormente, llevados a disolución acuosa hasta la máxima concentración de agua.

#### **II.1.1.2. Ligandos comerciales**

Los ligandos doxorubicina (DOX), glutatión (GSH) y nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) fueron adquiridos en Sigma Aldrich.

Las disoluciones madre de doxorubicina se ajustaron a fuerza iónica 0.1 M (NaCaC + NaCl) y pH = 7.0 y se conservaron a 4 °C, siempre protegidas de la luz. A partir de éstas, se prepararon las disoluciones necesarias para cada ensayo.

Las disoluciones de GSH y NADH se prepararon a fuerza iónica 2.5 mM NaCaC y se utilizaron siempre frescas.

#### **II.1.1.3. Complejos metálicos**

Los complejos metálicos de Iridio tipo half-sandwich estudiados en el Capítulo IV fueron sintetizados y caracterizados por el grupo del profesor Gustavo A. Espino del área de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos. Los complejos se disolvieron en agua a fuerza iónica 2.5 mM de NaCaC, o en DMSO dependiendo de la solubilidad. Las disoluciones madre que iban a ser utilizadas en el plazo de una semana se conservaron a 4 °C, el resto se congelaron a - 20 °C en alícuotas para ensayos posteriores.

Los complejos metálicos de Iridio y Rodio con ligando 2-(hydroxy-1-naphthyl)imidazo-[4,5-f][1,10]phenantroline (Capítulo V) fueron sintetizados también por el grupo del Prof. Gustavo A. Espino de la Universidad de Burgos. Las disoluciones madres se prepararon por pesada disolviendo el sólido en DMSO, y se guardaron en alícuotas a - 20 °C. Para cada ensayo se descongela un alícuota de la disolución madre y se preparan por dilución las disoluciones necesarias.

Los complejos metálicos con ligandos tipo flavonoides de Iridio, Rodio y Rutenio (Capítulo VI) fueron sintetizados por el grupo de los profesores Blanca R. Manzano y Félix A. Jalón de la Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas de la Universidad de Castilla la Mancha. Al igual que con el resto de los complejos, las disoluciones madres se prepararon por pesada, en DMSO, y se conservaron en alícuotas a - 20 °C. Para realizar cada ensayo se utiliza una alícuota de las congeladas evitando volver a congelarla.

#### **II.1.1.4. Polinucleótidos**

Los siguientes polinucleótidos fueron suministrados por Sigma Aldrich.

La sal de sodio liofilizada del ADN Calf Thymus (extraído del timo de ternera) se disuelve en agua bidestilada y se somete a una homogenización ultrasónica en hielo UP400S (Hielscher, Alemania) para obtener ADN de 1000 pares de bases aproximadamente. El número de pares de bases se confirma por electroforesis en gel de agarosa (20 V/cm, 20 minutos) en presencia de un marcador de talla. La concentración de ADN de las disoluciones stock, expresada en molaridad de pares de bases ( $M_{PB}$ ), se determinó espectrofotométricamente a 260 nm,  $l = 0.1$  M,  $pH = 7.0$  y utilizando  $\epsilon = 13200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [51]. Las disoluciones stock se conservan a - 20 °C.

La sal de potasio liofilizada de Poly(rU) es un ARN sintético de cadena sencilla la cual se disuelve en agua bidestilada y se determina la concentración espectrofotométricamente a 260 nm,  $l = 0.1$  M,  $pH = 7.0$  y utilizando  $\epsilon = 8900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [52]. Se mantiene a 4 °C, durante no más de una semana.

El Poly(rA)·Poly(rU) es un ARN sintético de doble hélice formado por una hebra de ribonucleótidos de adenina y otra de uracilo. Las disoluciones madres se prepararon disolviendo el sólido en agua bidestilada y la concentración,  $M_{PB}$ , se

determinó espectrofotométricamente a 260 nm,  $l = 0.1$  M,  $\text{pH} = 7.0$  y utilizando  $\epsilon = 14900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [52].

El Poly(rA)·2Poly(rU) es una triple hélice de ARN consistente en una hebra de adenina y dos hebras de uracilo. La disolución madre se prepara mezclando cantidades equimolares de Poly(rA)·Poly(rU) y Poly(rU) a  $l = 0.1$  M y  $\text{pH} = 7.0$  e incubándolo durante 24 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad [53,54]. La concentración en este caso se expresa en molaridad de tripletes de bases. Las disoluciones madres de Poly(rA)·2Poly(rU) se mantienen a temperatura ambiente y en la oscuridad durante una semana.

## II.1.2. Métodos

### II.1.2.1. Medidas de pH

Las medidas de pH se han llevado a cabo con un pH-metro Metrohm (Herisau, Suiza) equipado con un microelectrodo de vidrio, un electrodo de referencia y un puente salino de KCl (3M). para ajustar el pH se han utilizado pequeñas cantidades de NaOH, HCl o HClO<sub>4</sub>.

### II.1.2.2. Espectrofotometría de absorción

Un espectro de absorción es la representación de la cantidad de radiación absorbida a las distintas longitudes de onda ( $\lambda$ ) de la radiación. La fracción de radiación absorbida por una sustancia (Abs) depende de la concentración de dicha sustancia ( $c$ ) y de la longitud del camino recorrido por la radiación en el interior de la muestra ( $l$ ). Esta dependencia, a través de una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ), se conoce como la ley de Lambert-Beer (1):

$$\text{Abs} = \log \frac{I_0}{I} = -\log T = \epsilon \times l \times c \quad (1)$$

Donde  $I_0$  es la radiación incidente en la muestra, de la que una parte no es absorbida ( $I$ ) y es capaz de atravesarla, siendo la relación entre éstas la denominada transmitancia ( $T$ ). Esta ley es válida para disoluciones diluidas y muestras homogéneas. Las desviaciones en el cumplimiento de la ley de

Lambert-Beer nos indican la existencia de otros procesos en disolución, como por ejemplo, la existencia de fenómenos de agregación.

#### II.1.2.2.1. Instrumentación

Para las medidas de absorbancia se ha empleado un espectrofotómetro de haz simple, Hewlett-Packard 8453A (Agilent Technologies, Palo Alto, California), equipado con un detector fotodiodo-array para el rango  $\lambda = 190-1100$  nm, y un sistema Peltier termostatazador (HP-89090A) para el control de la temperatura con una precisión de  $\pm 0.1$  °C. Para las mediciones en la región del Visible el equipo cuenta con una lámpara de Tungsteno, mientras que para la región del UV la lámpara es de Xenon. Se utilizan cubetas de cuarzo (Hellma, Mülheim, Alemania) con 1 cm de camino óptico.

#### II.1.2.2.2. Procedimiento experimental

##### - *Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer*

El primer paso en el estudio de una molécula es comprobar el comportamiento de ésta en disolución. Dicho estudio se realiza utilizando un espectrofotómetro UV-Vis, ya que la proporcionalidad entre absorbancia y concentración es la base de la mayoría de los procedimientos utilizados. Se realizan adiciones de una disolución madre de la molécula en estudio. Tras cada adición, se homogeniza la disolución y se registra el espectro a 25 °C.

##### - *Valoraciones espectrofotométricas*

El estudio del equilibrio entre productos y reactivos se comienza recogiendo el blanco, que será el disolvente. Se añaden pequeñas cantidades de polinucleótido (P) sobre una disolución de la molécula o droga a estudiar (D) de volumen y concentración conocidos ( $C_D^0$ ). Tras cada adición la disolución se homogeniza y se mide el espectro a 25 °C.

Para el tratamiento de datos hay que tener en cuenta que durante la valoración la muestra se diluye, y los espectros se deben corregir teniendo en cuenta el

factor de dilución,  $f_d$ , que es la relación entre la concentración inicial de D en la cubeta ( $C_D^0$ ) y la concentración tras cada adición,  $C_D$ :

$$f_d = C_D^0 / C_D \quad (2)$$

Como la interacción entre dos moléculas se traduce en una serie de cambios espectrales, para el análisis de los datos experimentales debe elegirse una longitud de onda en la que estos cambios sean máximos. A la longitud de onda elegida, los valores de absorbancia correspondientes a cada punto de la valoración y las concentraciones de polinucleótido y de droga, nos permitirán el cálculo de los parámetros de la interacción.

Para elegir el método de análisis de la valoración es fundamental conocer el número de bases ocupadas por una molécula de droga,  $n$ . El cálculo de  $n$  se puede realizar a partir de la intersección entre las rectas obtenidas de la extrapolación de los primeros y últimos puntos de la isoterma de la valoración. Si  $n = 1$ , la concentración de sitios disponibles en el polinucleótido,  $S$ , para ser ocupados por la droga, será igual a la concentración de pares de bases del polinucleótido, es decir,  $[S] = [P]$ . En este supuesto la interacción droga-polinucleótido puede definirse como:



Cuya constante de equilibrio,  $K$ , se expresa como:

$$K = \frac{[PD]}{[D] \cdot [P]} \quad (4)$$

Siendo  $[PD]$ ,  $[D]$  y  $[P]$  las concentraciones de PD, D y P respectivamente. Y la concentración analítica de droga,  $C_D$ :

$$C_D = [D] + [PD] \quad (5)$$

Introduciendo (5) en (4):

$$\frac{1}{K} = \frac{(C_D - [PD]) \cdot [P]}{[PD]} \quad (6)$$

que se puede reescribir como:

$$\frac{C_D}{[PD]} = 1 + \frac{1}{K \cdot [P]} \quad (7)$$

Por otro lado, aplicando la ley de Lambert-Beer a una determinada longitud de onda en la que sólo absorbe la droga libre y complejada, la absorbancia viene definida como:

$$\text{Abs} = \varepsilon_D \cdot [D] + \varepsilon_{PD} \cdot [PD] \quad (8)$$

Sustituyendo (5) en (8) tenemos:

$$\text{Abs} - \varepsilon_D \cdot C_D = (\varepsilon_{PD} - \varepsilon_D) \cdot [PD] \quad (9)$$

Definimos:

$$\Delta \text{Abs} = \text{Abs} - \varepsilon_D \cdot C_D \quad (10)$$

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_{PD} - \varepsilon_D \quad (11)$$

Y la ecuación (9) queda:

$$[PD] = \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta \varepsilon} \quad (12)$$

Introduciendo la ecuación (12) en la ecuación (7) se obtiene la ecuación conocida como ecuación de Hildebrand-Benesi sencilla:

$$\frac{C_D}{\Delta \text{Abs}} = \frac{1}{\Delta \varepsilon} + \frac{1}{\Delta \varepsilon \cdot K} \cdot \frac{1}{[P]} \quad (13)$$

Al representar  $C_D/\Delta \text{Abs}$  frente a  $1/[P]$  se obtiene una recta cuya pendiente corresponde con  $1/\Delta \varepsilon \cdot K$  y cuya ordenada con  $1/\Delta \varepsilon$ . Por lo que podemos obtener el valor de  $\Delta \varepsilon$  de la ordenada y el de  $K$  de la pendiente. Dado que  $[P]$  depende de la constante termodinámica  $K$ , es necesario realizar un proceso iterativo para el cálculo de  $K$ .

En muchas ocasiones el ligando no ocupa exactamente un par de bases del polinucleótido, por lo tanto,  $n \neq 1$  y  $[S] \neq [P]$  y la interacción se define como:



La concentración de [S] se puede relacionar con  $C_p$  a través de la ecuación propuesta por McGhee & von Hippel [55] mediante una función,  $f(r)$ , dependiente del grado de saturación del polinucleótido,  $r$ , y del tamaño del sitio,  $n$ :

$$f(r) = \frac{[1-n \cdot r]^n}{[1-(n-1) \cdot r]^{n-1}} = \frac{[S]}{C_p} \quad (15)$$

El grado de saturación del polinucleótido dependerá de la concentración total de polinucleótido,  $C_p$ , y de la cantidad de complejo formado en el equilibrio [SD], así,  $r$  se define como:

$$r = \frac{[DS]}{C_p} = \frac{\Delta Abs}{\Delta \epsilon \cdot C_p} \quad (16)$$

Introduciendo la ecuación 16 en la ecuación de Hildebrand-Benesi (ecuación 13) se obtiene la ecuación de McGhee & von Hippel:

$$\frac{C_D}{\Delta Abs} = \frac{1}{\Delta \epsilon} + \frac{1}{\Delta \epsilon \cdot K} \cdot \frac{1}{C_p \cdot f(r)} \quad (17)$$

Se estima un valor de  $\Delta \epsilon$  a partir de la amplitud de la isoterma de la valoración con el que podemos calcular un valor aproximado de  $r$  y de  $f(r)$ . Representando  $C_D/\Delta Abs$  en función de  $1/C_p \cdot f(r)$  se obtiene una recta de pendiente  $1/\Delta \epsilon \cdot K$  y ordenada  $1/\Delta \epsilon$ . El nuevo valor de  $\Delta \epsilon$  se emplea para recalcular  $r$  y  $f(r)$ , y se itera hasta alcanzar la convergencia para obtener el valor de  $K$ .

- *Reacciones lentas*

La variación de la absorbancia con el tiempo permite seguir la evolución de una reacción. En el caso de reacciones lentas, ésta se puede seguir con un espectrofotómetro convencional.

- *Desnaturalización térmica*

La desnaturalización térmica es el proceso por el cual el polinucleótido pierde su estructura secundaria por efecto de la temperatura. El estudio de la

desnaturalización térmica de un ácido nucleico se basa en el registro de la absorbancia a 260 nm (característica de los ácidos nucleicos) de una disolución de polinucleótido a medida que aumenta la temperatura, a una determinada velocidad de barrido. Los procesos de desnaturalización ocurren con aumento de absorción al aumentar la temperatura debido a la desaparición de las interacciones  $\pi$ -stacking.

Mediante el análisis de los datos podemos comprobar si el ligando estabiliza o no térmicamente al polinucleótido [56]. Para determinar la temperatura de desnaturalización o de melting,  $T_m$ , es decir, la temperatura a la que la fracción entre el ADN nativo y el desnaturalizado es igual a 1, a una relación  $C_D/C_P$  concreta, es conveniente calcular la fracción de hélice sencilla en cada punto,  $\alpha$ :

$$\alpha = \frac{Abs - Abs_D}{Abs_S - Abs_D} \quad (18)$$

Siendo  $Abs_D$ ,  $Abs_S$  y  $Abs$  la absorbancia de la doble, la sencilla y en cada punto. La representación de  $\alpha$  frente a la temperatura da lugar a una curva sigmoidea, cuyo punto de inflexión se corresponde con la temperatura de melting [57]. La velocidad de barrido de los experimentos fue 0.3 °C/min.

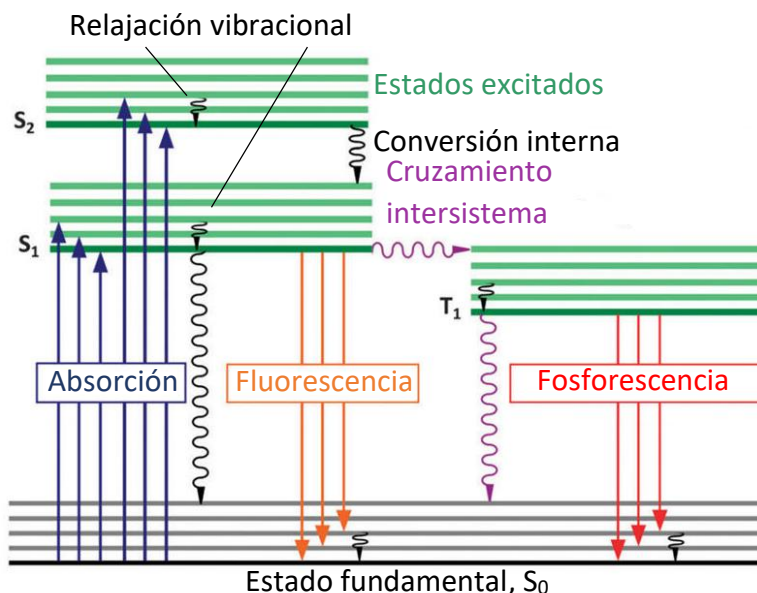
#### - *Coefficiente de reparto*

El coeficiente de reparto fue determinado siguiendo el método “shake flask” [58] entre octanol y agua bidestilada. Se prepara agua saturada en octanol y octanol saturado en agua mediante agitación de la mezcla de ambos disolventes durante 24 horas. Después se deja reposar durante el tiempo necesario hasta la separación de las fases, y a partir de aquí se utilizan en todo momento estos disolventes saturados. Se determina el coeficiente de extinción molar por absorción en ambos disolventes. Una disolución del compuesto disuelto en octanol de concentración conocida se agita durante media hora con un volumen igual de agua. Tras dejar que las fases lleguen al equilibrio, éstas se separan y se mide la concentración de compuesto presente en cada una de las fases según la relación:  $\log P = \log [(complex)_{octanol}/(complex)_{water}]$ . El  $\log P$  es una medida fisicoquímica del grado de lipofilia, a mayor  $\log P$ , mayor carácter lipofílico de la molécula.



### II.1.2.3. Fluorescencia

La fluorescencia es el fenómeno por el cual ciertas sustancias tras recibir una radiación luminosa emiten una radiación de longitud de onda mayor que la longitud de onda de excitación. Corresponde a una transición permitida desde un estado singlete excitado hasta el estado fundamental. La fluorescencia se puede ver representada junto otros posibles procesos de forma esquemática en el diagrama de Jablonski (Figura 1) [59].



**Figura 1.** Diagrama de Jablonski. Adaptada de referencia [59].

Este diagrama representa como un fluoróforo es excitado y pasa del estado fundamental al estado singlete excitado. Puede volver al estado fundamental a través de procesos no radiativos, como la conversión interna y el cruce entre sistemas, o radiativos como la fluorescencia o fosforescencia. Ésta consiste en la emisión de un fotón desde estados triplete excitados, para lo que primeramente se debe dar un cruce entre sistemas. Los procesos desde  $T_1$  son transiciones prohibidas porque el electrón en el orbital excitado tiene la misma orientación de spin que el electrón en el estado fundamental y, por lo tanto, procesos más lentos que las transiciones desde  $S_1$  hasta  $S_0$  (fluorescencia).

Una característica de los fluoróforos que se utilizará en el capítulo III es el tiempo de vida ( $\tau$ ), que se define como el tiempo medio que un fluoróforo permanece en el estado excitado después de la excitación [59]. La emisión producida al volver al estado fundamental es un suceso aleatorio, y cada fluoróforo excitado tiene la misma probabilidad de emitir en un periodo de tiempo dado. El resultado de excitar una muestra con un pulso de luz es un decaimiento exponencial de la población del estado excitado,  $n(t) = n_0 \exp(-t/\tau)$ , donde  $n(t)$  es el número de moléculas excitadas después del pulso de luz, y  $n_0$  es la población inicial de fluoróforos en el estado excitado.

En un experimento de tiempos de vida no se mide el número de moléculas excitadas sino la intensidad de fluorescencia, la cual es proporcional a  $n(t)$ , siendo la expresión habitual utilizada para un único decaimiento:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \tag{19}$$

En la que  $I(t)$  es la intensidad dependiente del tiempo e  $I_0$  es la intensidad a tiempo 0. El tiempo de vida se calcula ajustando los datos a modelos establecidos de decaimiento.

#### II.1.2.3.1. Instrumentación

Las valoraciones de fluorescencia han sido realizadas en un espectrofluorímetro Shimadzu Corporation RF-5301PC, con lámpara de Xenon de 150 W para el rango UV-Vis. El equipo puede registrar tanto espectros de emisión como de excitación. El control de temperatura se realiza mediante un baño termostático externo Julabo, con precisión de  $\pm 0.1$  °C. Las medidas han sido realizadas en cubetas de fluorescencia de alta precisión (Hellma, Mülheim, Alemania) con un camino óptico de 1 cm.

Las medidas de tiempos de vida se realizaron en un espectrómetro modular FLS980 (Edinburgh Instruments, Livingston, Scotland) refrigerado mediante efecto Peltier. Dispone de detectores fotomultiplicadores de UV-Vis (300-900 nm) y fuentes de excitación de Xenon de emisión continua (300 nm) y de láseres pulsados de diodo (ps).

### II.1.2.3.2. Procedimiento experimental

#### - *Valoración espectrofluorométrica*

Las valoraciones por fluorescencia se realizan de manera análoga a las realizadas por absorción.

Para el análisis de los datos experimentales se elige una longitud de onda en la que los cambios espectrales sean máximos y se utilizan las mismas ecuaciones que en el apartado II.1.2.2, sustituyendo  $\Delta\text{Abs}$  por  $\Delta F = F - F^0$ .

#### - *Espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo*

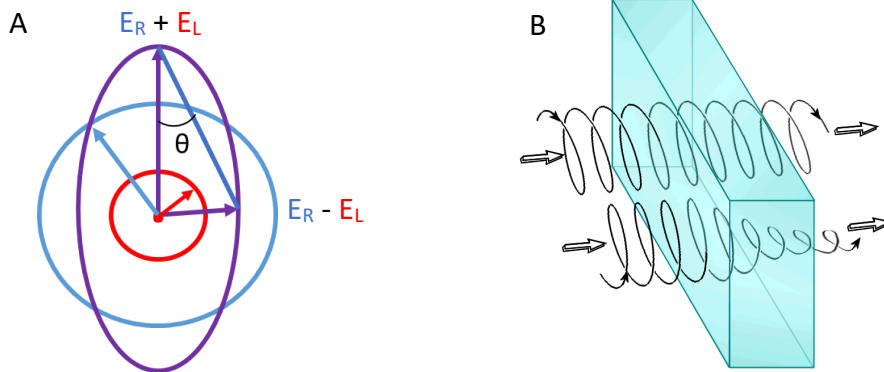
Las muestras de ligando en presencia y ausencia de polinucleótido se preparan en cubeta de cuarzo de fluorescencia. Dependiendo de los máximos de excitación del fluoróforo se elegirá un láser u otro, en el capítulo III se empleó el láser pulsado de  $\lambda = 375$  nm. Así, se excita la muestra con un pulso ultrarrápido del orden de los picosegundos y se cuantifica los fotones emitidos después del pulso en función del tiempo, a una determinada longitud de onda de emisión. Esto permite conocer el tiempo de vida medio,  $\tau_f$ , del estado excitado. Los datos fueron analizados mediante el software FAST 3.4.0.

### II.1.2.4. Dicroísmo circular (CD)

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que involucra luz circularmente polarizada, a izquierda (L) y a derecha (R). El haz de luz se obtiene girando el plano de polarización de forma continua y en un solo sentido alrededor del eje de propagación de la fase luminosa. Esta técnica mide la diferencia de absorción de ambas componentes al incidir el haz de luz circularmente polarizado sobre la muestra [60].

Cuando un haz de luz polarizado incide sobre una muestra en la cual el rayo circularmente polarizado a la derecha es absorbido de una manera distinta al rayo circularmente polarizado a la izquierda, se da el fenómeno de dicroísmo circular:  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_D$ . Únicamente las moléculas ópticamente activas, esto es, las moléculas quirales, son las que producen este fenómeno. Al atravesar un medio quiral la luz circularmente polarizada deja de serlo para definir una elipse con

una rotación del plano de polarización en un ángulo  $\theta$  (Figura 2A), ya que, la velocidad del componente L es diferente a la de R y se produce un desfaseamiento (Figura 2B) y un cambio de magnitud diferencial en ambos componentes originalmente polarizados circularmente.



**Figura 2.** A) En morado: luz polarizada elípticamente, que es la superposición de la luz polarizada hacia la izquierda (roja) y hacia la derecha (azul). B) Desfase de la luz circularmente polarizada al atravesar un medio ópticamente activo.

De forma cuantitativa el dicroísmo circular se puede calcular teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer de manera que la diferencia en la absorción de los dos componentes al atravesar la muestra es [61]:

$$\Delta\varepsilon = \frac{\text{Abs}_L}{C \cdot l} - \frac{\text{Abs}_R}{C \cdot l} = \frac{1}{C \cdot l} \cdot \Delta\text{Abs} \quad (20)$$

La mayor parte de los instrumentos de dicroísmo circular registran los espectros en forma de elipticidad,  $\theta$ , que se relaciona según podemos ver en el triángulo formado por los semiejes mayor y menor de la elipse de la Figura 2 de la siguiente forma:

$$\tan\theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} = \Delta\varepsilon \quad (21)$$

Que en función de la concentración utilizada con los polinucleótidos expresada en  $M_{PB}$  queda definida como:

$$[\theta] = \frac{100 \cdot \theta}{C \cdot l} \text{ (deg} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)} \quad (22)$$

Es una técnica muy utilizada para detectar cambios conformacionales en los ácidos nucleicos provocados, por ejemplo, por la interacción con drogas, ya que las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos son grupos ópticamente activos, cuya actividad óptica aumenta al formar parte de una estructura helicoidal. Los ácidos nucleicos solo presentan dicroísmo circular en la región del UV, su espectro posee dos bandas características: una negativa en torno a 245 nm relacionada con la helicidad, y otra positiva a 260 nm relacionadas con las interacciones de stacking entre las bases [62]. Estas bandas se ven modificadas cuando existe interacción entre el polinucleótido y los ligandos aportando información sobre el tipo de enlace, incluso pueden aparecer bandas nuevas debido a la formación de nuevos complejos ligando/polinucleótido en disolución, conocidas como bandas de dicroísmo circular inducido (ICD) [63].

#### II.1.2.4.1. Instrumentación

Las medidas de dicroísmo circular se han llevado a cabo en un equipo modular MOS-450 BioLogic (Claix, Francia) equipado con lámpara de arco de Xenon. Para obtener la luz polarizada levógira o dextrógira, el instrumento cuenta con un modulador electroóptico, consistente en un cristal sometido a un campo eléctrico alterno, que determina la componente que se transmite, L o R, que se alterna con una frecuencia de 50kHz. Esta luz atraviesa la muestra y un fotomultiplicador recoge la señal transmitida, la cual es transformada en el ordenador en señal de dicroísmo circular mediante el software Biokine 3.2. La temperatura de trabajo se controla mediante un baño Julabo termostatzado externo con precisión de  $\pm 0.1$  °C. La velocidad de barrido en todos los experimentos fue 2 nm/s. Las muestras se colocan en celdas de cuarzo de alta precisión (Hellma, Mülheim, Alemania) con 1 cm de camino óptico.

#### II.1.2.4.2. Procedimiento experimental

Se recoge el espectro del buffer en ausencia de ligando, el cual actúa como blanco. A continuación, se añade una cantidad de polinucleótido para obtener una concentración en cubeta en el rango de 50  $\mu\text{M}$  y se registra su espectro. A

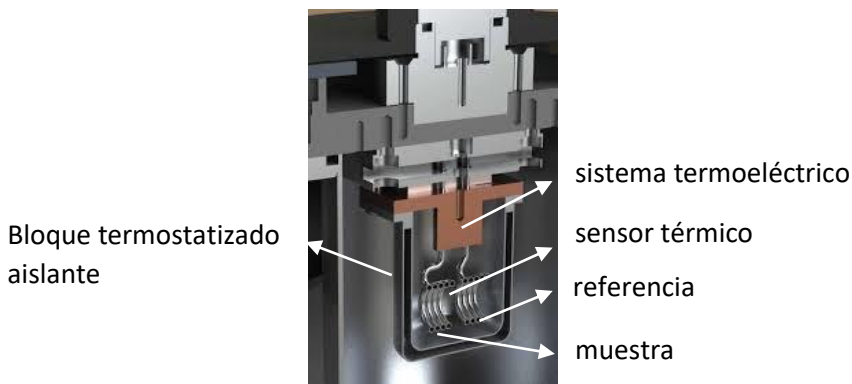
esta disolución se le van añadiendo cantidades crecientes de la droga de concentración conocida y registrando el espectro de cada adicción. Como en el caso de las valoraciones de absorción o fluorescencia, para el análisis de datos, se elige una zona del espectro en el que las variaciones sean máximas frente a la relación de concentraciones de droga/polinucleótido ( $C_D/C_P$ ).

#### **II.1.2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Esta técnica consiste en medir los cambios en la capacidad calorífica ( $C_p$ ) cuando una muestra es calentada o enfriada con respecto a una referencia, así como la temperatura a la que dichos cambios tienen lugar. Los termogramas permiten determinar los parámetros termodinámicos del proceso de desnaturalización ( $\Delta C_p$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ) y la temperatura de desnaturalización [64].

En esta tesis se ha usado esta técnica para determinar la  $T_m$  y a partir de ella mostrar si un ligando dado estabiliza el polinucleótido ( $T_m$  aumenta respecto a su concentración) o desestabiliza ( $T_m$  disminuye) [65].

El equipo de DSC, esquematizado en la Figura 3, consiste en dos celdas, una para la muestra conteniendo el polinucleótido, y otra para la referencia conteniendo el mismo volumen de disolvente en el que se encuentre la muestra. Ambas celdas se encuentran en un bloque termostatzado aislante que evita que haya intercambios de calor con el exterior. Un sistema termoeléctrico realiza los barridos de temperatura a una determinada velocidad dentro del bloque termostatzado. En su interior y entre las dos celdas hay un sensor térmico que mide la diferencia de temperatura entre ambas, y cada una de ellas dispone de un calentador compensatorio para mantener ambas a la misma temperatura en todo momento. El equipo mide el diferente flujo de calor aportado por los dos calentadores a cada celda expresado en W y en función de la temperatura.



**Figura 3.** Vista transversal del interior de un equipo Nano DSC. Fuente: TA instruments.

Este aporte de calor está directamente relacionado con la capacidad calorífica ( $C_p$ ) mediante la siguiente expresión, siendo  $C$  la concentración del polinucleótido y  $V$  el volumen de la disolución:

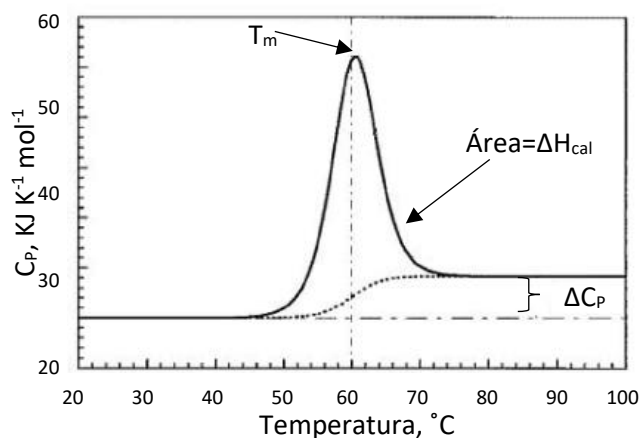
$$C_p = \text{Flujo de calor} \cdot \left( \frac{10^{-6}}{\text{Velocidad de barrido} \cdot C \cdot V} \right) \tag{23}$$

A partir de la capacidad calorífica se pueden determinar otros parámetros termodinámicos como la entalpía,  $\Delta H_{cal}$ , la entropía,  $\Delta S_{cal}$ , y la temperatura de melting,  $T_m$  [66]:

$$\Delta H_{cal} = \int_{T_2}^{T_1} C_p \cdot dT \tag{24}$$

$$\Delta S_{cal} = \int_{T_2}^{T_1} \frac{C_p}{T} \cdot dT \tag{25}$$

Siendo  $T_1$  y  $T_2$  las temperaturas inicial y final de la transición respectivamente.  $T_m$  corresponde al máximo de la transición (Figura 4).



**Figura 4.** Termograma obtenido de un experimento de DSC. Figura adaptada de ref. [67].

#### II.1.2.5.1. Instrumentación

Las medidas se han realizado en un calorímetro nano DSC (TA Instruments, New Castle, USA) diseñado para el estudio de biomoléculas en disolución que permite trabajar en un rango de temperaturas entre  $-10$  y  $130^{\circ}\text{C}$ , con velocidades de barrido comprendidas entre  $0$  y  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y presiones entre  $1$  y  $6$  atmósferas (atm). Las celdas del calorímetro son capilares continuos de platino de  $300\ \mu\text{L}$  de volumen. Todas las muestras son desgasificadas previamente en una unidad de desgasificación de TA instruments. Para el análisis de los resultados se empleó el software NanoAnalyze 2.0 de TA instruments.

#### II.1.2.5.2. Procedimiento experimental

Todas las muestras que se introducen en el DSC deben ser desgasificadas previamente durante  $30$  minutos para evitar la formación de burbujas en el interior durante el experimento. Primeramente, se realiza una línea base con buffer tanto en la celda de referencia como en la celda de la muestra, que posteriormente será restada a los termogramas de las muestras. Después se mide la muestra del polinucleótido sólo y por último las muestras de polinucleótido en presencia del ligando a diferentes relaciones  $C_D/C_P$  manteniendo siempre la misma concentración de  $P$  ( $\sim 5 \times 10^{-4}$  M). Los barridos



se realizan entre 25 y 110 °C a una velocidad de barrido de 1°C/min y a presión constante de 3 atm para que la muestra no hierva.

### II.1.2.6. Calorimetría de valoración isotérmica (ITC)

La calorimetría de valoración isoterma está basada en la medida del calor desprendido o absorbido de una reacción química. Las medidas siempre se realizan con respecto al agua ultra pura. Las celdas de referencia y de muestra se encuentran termostatazadas a 25 °C. La valoración en ITC se realiza añadiendo a un volumen dado del polinucleótido, contenido en la celda de muestra, volúmenes idénticos de ligando mediante un inyector. Cuando la reacción es exotérmica o endotérmica se genera o consume calor modificándose la temperatura de la muestra. El sistema aporta el calor necesario para mantener la celda a 25 °C y éste se registra en cada punto de la valoración, lo cual permite determinar los parámetros termodinámicos de la reacción [68].

El caso más sencillo que se puede dar sería la ecuación (3), cuya constante de enlace, K, se relaciona con los parámetros termodinámicos de variación de entalpía,  $\Delta H$ , y entropía,  $\Delta S$ , a través de la energía libre de Gibbs,  $\Delta G$ :

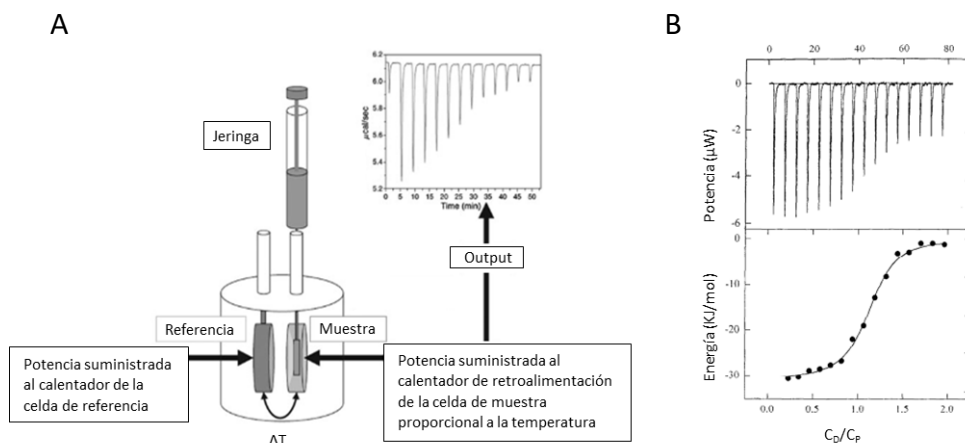
$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (26)$$

Ecuación en la que R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta expresada en grados Kelvin.

En las valoraciones calorimétricas el calor medido es la suma del calor asociado a todos los procesos que tienen lugar tras las adiciones, lo cual incluye el calor de la dilución de la sustancia valorante, pero también el calor asociado a cualquier reacción no deseada como la precipitación, hidrólisis, dimerización o reacciones redox [69].

Los equipos constan de un núcleo térmico aislante en cuyo interior se encuentran dos celdas idénticas de volumen 0.2 - 1.5 mL, una contiene la referencia y la otra la muestra. El núcleo térmico se encarga de mantener las dos celdas a la misma temperatura y se encuentra monitorizado por un termopar. Los sensores de calor detectan las diferencias de temperatura entre las celdas cuando tiene lugar la reacción y los calentadores se encargan de compensar dicha diferencia para que las celdas vuelvan a estar a la misma temperatura. La disolución de ligando se

carga en una jeringa que se coloca en la celda de la muestra (ver Figura 5A) desde la que el equipo realiza las adiciones. Los datos experimentales de la valoración representan potencia frente a tiempo obteniéndose unos picos correspondientes a las adiciones como los representados en la Figura 5B. Mediante la integración de estos picos se obtiene la entalpía asociada a cada inyección, y de la pendiente del ajuste se obtiene la K termodinámica de enlace (Figura 5B) [70].



**Figura 5.** A) Diagrama representativo de un calorímetro de valoración isotérmica [70]. B) Ejemplo de unos datos obtenidos por ITC y la isoterma derivada de la integración de cada adición [71].

#### II.1.2.6.1. Instrumentación

Se ha utilizado un equipo Nano ITC (TA Instruments, Newcastle, USA) cuyas celdas son de oro y de un volumen de 187  $\mu\text{L}$ . La jeringa de inyección es de 50  $\mu\text{L}$  y tiene una capacidad de rotación de 250 rpm para el mezclado. Todas las muestras se desgasifican previamente con la unidad de desgasificación de TA instruments. Para introducir las disoluciones en las celdas se utiliza una jeringa Hamilton de 500  $\mu\text{L}$  de volumen. El software empleado para analizar los datos obtenidos ha sido Launch Nanoanalyze 2.0 (TA Instruments, Newcastle, USA), en el que se pueden analizar diferentes modos de enlace según el sistema estudiado.

### II.1.2.6.2. Procedimiento experimental

Todas las muestras que se introducen en el DSC deben ser desgasificadas previamente durante 30 minutos para evitar la formación de burbujas que pueden influir en el resultado del experimento. La celda de referencia se carga con agua ultra pura, la de la muestra con la disolución de polinucleótido y la jeringa con la disolución de ligando. En un experimento típico se realizan 25 o 50 inyecciones de 2 o 1  $\mu\text{L}$  respectivamente, con 300 segundos de estabilización entre cada una de ellas. En este caso el blanco sería la valoración del ligando sobre el disolvente sin polinucleótido, para restar después el calor de dilución al calor de la valoración.

### II.1.2.7. Viscosidad

Esta técnica permite evaluar la viscosidad de un fluido midiendo el tiempo que tarda 1 mL de muestra en pasar a través de dos enrasos de un tubo capilar. La viscosidad relativa se calcula con la ecuación (27), en la que  $t$  es el tiempo de caída de la disolución del sistema polinucleótido /ligando,  $t_0$  es el tiempo de caída del disolvente, y  $t_{\text{pol}}$  es el tiempo de la disolución de polinucleótido.

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t-t_0}{t_{\text{pol}}-t_0} \quad (27)$$

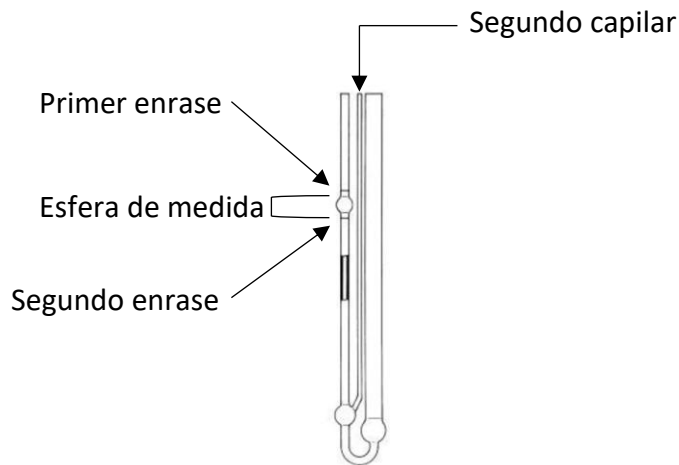
La viscosidad relativa se relaciona con la elongación relativa del polinucleótido de manera dependiente de la relación de concentraciones  $C_D/C_P$  mediante la siguiente expresión, en la que  $\beta$  da idea de la magnitud de la intercalación [72]:

$$\frac{L}{L_0} = \sqrt[3]{\frac{\eta}{\eta_0}} = 1 + \beta \frac{C_D}{C_P} \quad (28)$$

Este estudio es útil para entender la naturaleza de la interacción entre una molécula pequeña y un polinucleótido. De hecho, la variación de la viscosidad de una disolución de ADN está asociada a los cambios conformacionales del sistema. Por ejemplo, la intercalación de moléculas en la doble hélice del ADN provoca un desenrollamiento local y como consecuencia un aumento en la elongación de dicha molécula, que a su vez está directamente relacionada con la viscosidad, la cual aumenta [73].

### II.1.2.7.1. Instrumentación

Para las medidas de viscosidad se ha utilizado un viscosímetro capilar Ubbelohde (Schott-Instruments, Mainz, Alemania) como el de la Figura 6, en el cual se mide el tiempo que la disolución o el disolvente tarda en fluir entre los dos enrrases. El viscosímetro se encuentra inmerso en un baño termostatzado Julabo con una precisión de  $\pm 0.1$  °C. Las medidas se realizan a 25 °C. El tiempo se controla con un cronómetro manual de precisión 0.01 s.



**Figura 6.** Viscosímetro Ubbelohde.

### II.1.2.7.2. Procedimiento experimental

Primeramente, el viscosímetro se llena con 3 mL de polinucleótido y con ayuda de una jeringa se succiona la disolución a través del capilar que contiene la esfera de medida mientras se mantiene tapado el segundo capilar. Después se destapa el segundo capilar y la disolución desciende por el primer capilar, de modo que se mide el tiempo que tarda el líquido en pasar del primer enrrase al segundo. Se realizan adiciones de ligando de concentración conocida, se homogeniza, se deja estabilizar y se vuelve a medir de la misma manera. Cada medida se realiza como mínimo cuatro veces para asegurar la reproducibilidad.

El experimento en blanco consiste en realizar las mismas adiciones de ligando, pero únicamente del disolvente en el que se encontraba disuelto. En los capítulos IV, V y VI los ligandos no son solubles en agua sino en DMSO, en estos casos es

necesario realizar un tercer experimento en el que se mida el tiempo de caída de la mezcla agua-DMSO, realizando las mismas adiciones que en los otros dos.

### II.1.2.8. Relajación por salto de temperatura: T-Jump

La técnica de relajación por salto de temperatura ha sido utilizada para estudiar aquellas reacciones que transcurren entre 0.1 segundos y algunos microsegundos. Consiste en medir la relajación de un sistema, el cual estaba en equilibrio, y ha sido perturbado debido a un cambio súbito de temperatura. Es condición necesaria que los sistemas a estudiar estén en equilibrio. El cambio repentino de temperatura se produce mediante la descarga eléctrica de un condensador. El proceso de relajación se observa a través de las variaciones de absorbancia o fluorescencia a una determinada longitud de onda, siempre y cuando  $\Delta H^0$  sea distinto de cero.

Esta técnica se utiliza en el capítulo III para estudiar las reacciones entre un polinucleótido, P, y el ligando doxorubicina, D. En el caso más sencillo P y D se encontrarán en equilibrio con el complejo PD:



Donde  $k_f$  y  $k_D$  son las constantes cinéticas de formación y disociación del complejo PD respectivamente. Siendo así la constante aparente del equilibrio:

$$K_{ap} = \frac{k_f}{k_d} \quad (30)$$

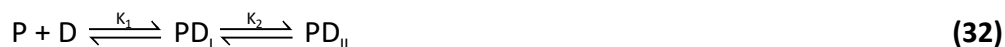
El comportamiento cinético para el mecanismo representado en la ecuación (29) en una etapa se ajusta a la siguiente ecuación, donde [P] y [D] son las concentraciones en el equilibrio:

$$\frac{1}{\tau} = k_d + k_f \cdot ([P] + [D]) \quad (31)$$

Las curvas cinéticas obtenidas a diferentes concentraciones de P y D, en las que se representa potencial a una determinada longitud de onda frente al tiempo, se ajustan a una función monoexponencial o biexponencial de la que se obtiene la

constante de tiempo  $1/\tau$ . La representación de la ecuación 31 permite determinar  $k_f$  y  $k_d$ .

Si el mecanismo de la reacción fuera en dos etapas:



Donde  $PD_I$  es un intermediario de reacción y la constante global se define como  $K = K_1 \cdot (1 + K_2)$ . El comportamiento cinético de esta reacción se expresa como:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{K_1 k_2 F(C)}{1 + K_1 F(C)} + k_{-2} \quad (33)$$

Siendo  $K_1 = k_1/k_{-1}$  y  $K_2 = k_2/k_{-2}$  y  $F(C)$  una función dependiente de la concentración de reactivos y productos.

#### II.1.2.8.1. Instrumentación

El equipo de T-Jump ha sido fabricado de acuerdo al prototipo de Riegler [74]. La fuente es una lámpara de Tungsteno y la señal es recogida por un fotodiodo. La descarga eléctrica se realiza con un condensador que genera una descarga de 30 kV, la cual produce un salto de temperatura de 3 °C, pasando así de 22 a 25 °C. Se utiliza un osciloscopio Agilent 54622A (Santa Clara, CA) para transformar las señales de absorbancia en señales eléctricas tras la descarga. El equipo está termostatizado con un baño externo Julabo con precisión de  $\pm 0.1$  °C. La celda posee dos electrodos de oro a través de los cuales se realiza la descarga, tiene una capacidad aproximada de 1 mL y camino óptico de 1 cm. Se puede usar tanto para las medidas en absorbancia como en fluorescencia.

#### II.1.2.8.2. Procedimiento experimental

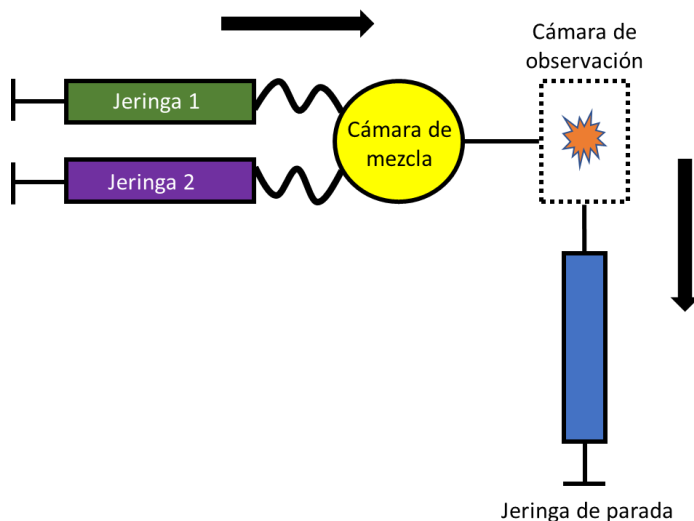
Primeramente, hay que comprobar que el ligando por sí mismo no de señal alguna tras la descarga. Después se introduce en la celda 1 mL de disolución conteniendo cantidades conocidas de ligando y polinucleótido a diferentes valores  $[P] + [D]$ . Las disoluciones deben tener fuerza iónica igual o superior a 0.01 M, ya que el paso de la corriente requiere la presencia de iones en el medio.

Para cada disolución se realizan entre 6 y 10 descargas esperando 10 min entre cada una de ellas con el fin de que el sistema regrese a la temperatura inicial.

Las curvas cinéticas obtenidas se analizan mediante un ajuste a una función exponencial para obtener la constante cinética en cada punto (cada valor de  $[P] + [D]$ ) y la constante termodinámica.

### II.1.2.9. Stopped Flow

La técnica de Stopped Flow se utiliza en el estudio de reacciones que ocurren en la escala de los milisegundos. Consiste en mezclar rápidamente dos disoluciones contenidas en jeringas diferentes, las cuales inyectan su contenido en una cámara de mezcla. Tras la mezcla, la disolución pasa a una cámara de observación y el flujo se detiene cuando se llena una tercera jeringa “de parada” (Figura 7). La reacción se sigue en la cámara de observación registrando la absorción de la mezcla en función del tiempo. El tiempo muerto del instrumento es el tiempo que transcurre desde que comienza el flujo hasta que se para [75].



**Figura 7.** Esquema de un equipo de Stopped Flow.

#### II.1.2.9.1. Instrumentación

Se utilizó un equipo modular SFM-400 con una unidad MPS-60 de BioLogic acoplado a un sistema óptico MOS-450, de la misma casa comercial, equipado

con una lámpara de xenón-mercurio, que permite medidas de absorbancia y fluorescencia.

#### II.1.2.9.2. Procedimiento experimental

Se llenan las jeringas con los reactivos evitando la formación de burbujas. Se buscan las condiciones adecuadas de concentración, proporción de volumen de cada reactivo, y velocidad de flujo. Para cada condición experimental se acumulan 5 espectros y se realiza la media de las curvas obtenidas, las cuales se analizan mediante el software Biokine 3.2.

#### II.1.2.10. RMN

Los experimentos de RMN que aparecen en esta tesis han sido realizados en un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear VARIAN UNITY INOVA 400 MHz, capaz de trabajar a una frecuencia nominal para el núcleo de protón de 400 MHz y que corresponde a un campo magnético de 9,4 Teslas ( $^1\text{H}$ , 399.94 MHz;  $^{31}\text{P}$ , 191.9 MHz).

Los experimentos se han llevado a cabo en disolventes deuterados. Los espectros se han recogido a 25 °C con 32 scans y se han procesado con MestReNova.



## II.2. METODOLOGÍA BIOLÓGICA

### II.2.1. Líneas celulares

Para testar los compuestos o ligandos estudiados en la tesis se han usado las siguientes líneas celulares adherentes de procedencia humana, suministradas por Sigma Aldrich:

- SW480, adenocarcinoma de colon
- A2780, carcinoma de ovario
- A2780CIS, línea resistente al cisplatino de carcinoma de ovario
- A549, carcinoma de pulmón
- IMR90, fibroblastos sanos de pulmón

### II.2.2. ADN plasmídico pUC18

El ADN plasmídico pUC18 es un plásmido artificial de 2686 pares de bases. Se obtuvo de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* empleando el kit comercial "OMEGA plasmid DNA midi kit" (VWR). La concentración de la disolución madre de pUC18 se determinó según las indicaciones del fabricante. Las alícuotas de la disolución madre se mantienen a - 20 °C.

### II.2.3. Seroalbúmina bovina

La seroalbúmina bovina (BSA), albúmina extraída del suero bovino, fue adquirida liofilizada en Sigma Aldrich. El sólido se disolvió en tampón fosfato y la concentración se calculó espectrofotométricamente a 278 nm,  $l = 0.1$  M, pH = 7.0 y utilizando  $\epsilon = 44070 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [76].

### II.2.4. Métodos

#### II.2.4.1. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis horizontal en gel de agarosa permite separar las moléculas de ADN plasmídico de diferente tamaño ya que, el ADN de doble cadena migra a

través del gel de agarosa de manera inversamente proporcional al logaritmo de su masa. Como el ADN es un polianión debido a las cargas negativas de los fosfatos, migra hacia el ánodo. Esta técnica permite comprobar si el ligando que se está estudiando es capaz de interactuar con el ADN, bien porque produzca mellas, aumentando la cantidad de open circular (OC), o de la forma lineal (L), si las mellas se producen a la misma altura en ambas cadenas, o bien porque se sitúa interactuando con él por formación de aductos o intercalándose, en cuyo caso se observan variaciones en el patrón de movilidad de la forma superenrollada (SC). Si produce mellas, la droga tiene actividad química nucleasa. Generalmente esta capacidad se debe a la producción de radicales libres, y pueden identificarse introduciendo agentes secuestradores (scavengers) en la disolución del polinucleótido con la droga.

Las propiedades del gel dependen del contenido en agarosa, polisacárido presente en la composición del agar de las algas marinas, que es la que determina el tamaño del poro. A mayor concentración de agarosa, menor diámetro de poro y menor movilidad [77].

#### II.2.4.1.1. Instrumentación

Para la electroforesis en gel de agarosa se ha utilizado una cuba electroforética horizontal, en cuyos extremos se encuentra un polo positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo); y una fuente de alimentación externa para aplicar el potencial entre ambos electrodos y que las moléculas negativas como el ADN migren hacia el polo positivo (Figura 8 A). Para la visualización del gel se ha utilizado un sistema de imagen Bioblock Scientifics de Fisher.

#### II.2.4.1.2. Procedimiento instrumental

En la electroforesis en gel de agarosa, primeramente, se prepara el gel al 1 % en Tris base 89 mM, ácido bórico 89  $\mu$ M y EDTA 2 mM (TBE), disolviendo la agarosa sólida con ayuda de calor, sin llegar a ebullición. Se añade bromuro de etidio como agente de tinción para la revelación posterior de las bandas, siendo la concentración final en gel 0.05  $\mu$ g/mL. Se espera a que el gel solidifique y se introduce en la cuba electroforética sumergido en TBE. Los pocillos se cargan

con 10  $\mu\text{L}$  de las muestras. Dichas muestras contienen 10-15  $\mu\text{M}$  de plásmido pUC18 incubado durante un tiempo con distintas concentraciones de droga. Es necesario incluir un control negativo con el plásmido solo, y una muestra control de vehículo con el disolvente en el que esté disuelto la droga (DMSO) a la máxima concentración. El gel se corre durante hora y media a 6 V/cm. Por último, se visualiza el gel y se capturan las imágenes.

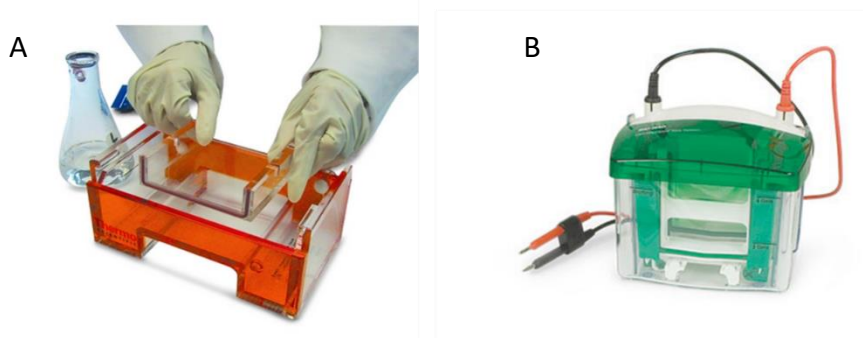
#### **II.2.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)**

Puede ser nativa o desnaturizante, en la que, como su nombre indica, se utilizan agentes desnaturizantes de proteínas, como el SDS, y un agente reductor, como el mercaptoetanol. Como la movilidad de una molécula en el gel depende de la carga y el tamaño, en la electroforesis desnaturizante las muestras se tratan para que tengan una carga uniforme y así, la movilidad únicamente depende del tamaño de la molécula. En la electroforesis nativa, las muestras de proteínas se preparan en un medio no reductor ni desnaturizante en el que se mantiene la estructura de la proteína, y se utiliza un pH adecuado para controlar la carga de la misma.

Se ha estudiado la movilidad electroforética de la seroalbúmina bovina, la cual al pH del medio ( $\approx 8.3$ ) está cargada negativamente en ausencia y presencia de los complejos en estudio. Dado que la movilidad depende, al igual que en la electroforesis de agarosa, de la forma, tamaño y carga de las muestras, cualquier cambio en sus propiedades (cambios conformacionales, agregación, o enlace a moléculas) puede alterar la movilidad. Es una técnica cualitativa que permite dilucidar la existencia de interacción [78].

##### **II.2.4.2.1. Instrumentación**

En el caso de la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida se ha utilizado una cuba vertical en cuyo extremo superior se encuentra el polo negativo y en el inferior el positivo (BioRad) y la misma fuente de alimentación que en el caso anterior (Figura 8B). Los geles se visualizaron mediante un sistema de imagen Gel Doc XR+ de Bio-Rad Laboratories.



**Figura 8.** Equipos de electroforesis A) en gel de agarosa y B) en gel de poliacrilamida.

#### II.2.4.2.2. Procedimiento experimental

En la electroforesis vertical el gel se prepara al 10 % de acrilamida y en presencia de bis-acrilamida (agente entrecruzador), TEMED (agente catalizador) y un agente iniciador (persulfato amónico, APS). Se espera a que finalice la polimerización y se precorren los geles en el buffer (Tris base y glicina). Los pocillos se llenan con 6  $\mu$ L de las disoluciones que contienen BSA (1-15  $\mu$ M) en presencia de distintas concentraciones de droga. La electroforesis se lleva a cabo con un sistema de refrigeración, aproximadamente a 4 °C, para evitar que la proteína se desnaturalice por calentamiento, a 8V/cm durante 4 horas. Para visualizar el gel, éste se tiñe primeramente con Coumassi Brilliant Blue R-250 durante media hora a temperatura ambiente y después se destiñe con metanol y ácido acético glacial hasta que aparezcan las bandas.

#### II.2.4.3. Cultivo celular

El crecimiento de las células depende del ambiente que las rodea, por ello, las líneas celulares se mantienen en frascos de cultivo (VWR) a alta humedad, a 37 °C y bajo una atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub>, de manera que estas variables al ser fijas no condicionen el crecimiento celular, y favorezcan la reproducibilidad de los ensayos [79]. El medio de cultivo usado para las líneas de carcinoma es DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con 10 % de FBS (suero

fetal bovino) y 1 % de antibiótico-antimicótico. Para la línea celular sana el medio se suplementa, además, con MEM, disolución de aminoácidos no esenciales.

Para preparar los ensayos biológicos o para subcultivar las células cuando llegan a un 80-90 % de confluencia del frasco, se retira el medio, se lava con PBS (tampón fosfato salino: NaCl 0.137 M, KCl 0.0027 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 M y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.0018 M), se añade tripsina-EDTA, se deja reposar 5 minutos, se añade medio para paralizar la acción de la tripsina, se recoge toda la muestra y se centrifuga a 250 RCF (Relative Centrifugal Force) durante 5 min. Después se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en medio, para con ello subcultivar o realizar el ensayo deseado.

Todos los reactivos utilizados en cultivo celular fueron suministrados por Sigma Aldrich.

#### **II.2.4.4. Ensayo de proliferación celular MTT**

Es un ensayo de viabilidad colorimétrico basado en la reducción enzimática de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) a formazan cuando se expone a las células vivas. El resultado de la reducción, debida a la actividad deshidrogenasa en mitocondrias activas, son cristales de color azul insolubles en el medio de cultivo. Por tanto, la cantidad de formazan generado, es proporcional al porcentaje de células metabólicamente activas y se puede medir por absorción [80]. El objetivo es conocer la concentración de droga, expresada generalmente en  $\mu\text{M}$ , a la que la población celular se reduce a la mitad, IC<sub>50</sub>.

##### **II.2.4.4.1. Instrumentación**

La lectura de absorbancia de las placas se realizó en el lector de placas Cytation 5 Imaging Reader de BioTek. Este equipo dispone de tres modos: absorbancia, fluorescencia e imagen. Para leer absorción utiliza un monocromador el cual permite seleccionar la longitud de onda desde 230 nm hasta 999 nm a intervalos de 1 nm. Dispone de una lámpara de Xenon para ambas medidas UV y visible. Además, está equipado con cuatro zonas de control de temperatura desde 4 °C hasta 65 °C, controlado mediante un gradiente ajustable por software. El

Cytation 5 permite la lectura de placas de 6, 12, 24, 48, 96 y 384 pocillos de dimensiones 128 x 86 mm.

Las curvas obtenidas se analizan mediante el software GraphPad Prism 6.07.

#### II.2.4.4.2. Procedimiento experimental

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos mediante el ensayo MTT, se utilizaron placas de fondo plano de 96 pocillos en las que se sembraron  $1 \times 10^4$  células por pocillo para las líneas SW480, A2780, A2780CIS o IMR90, y  $5 \times 10^4$  células por pocillo para la línea A549. Para el conteo de las células se utiliza un contador automático de Biorad. Tras 24 horas de incubación, se realiza el tratamiento con diferentes concentraciones de los complejos o ligandos y se incuban 24-48 horas más. Con fines comparativos se incluye el cisplatino como control positivo en todos los ensayos. Después se retira el tratamiento, se añaden 100  $\mu$ L de MTT 0.5 mg/mL y se incuba durante 4 horas. Finalmente se añaden 100  $\mu$ L a cada pocillo de disolución 10 % SDS y 0.01 M HCl para solubilizar los cristales de formazan originados y se mantiene toda la noche a 37 °C. La lectura de la absorbancia se realiza a 590 nm y se relaciona con la supervivencia celular mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ supervivencia} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{trat}} - \text{Abs}_{\text{medio}}}{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{medio}}} \right) \times 100 \quad (36)$$

Siendo  $\text{Abs}_{\text{trat}}$  la absorbancia a una determinada concentración de compuesto,  $\text{Abs}_{\text{medio}}$  la absorbancia del medio solo (sin células) y  $\text{Abs}_{\text{control}}$  la absorbancia del control negativo (absorbancia de células sin compuesto). Así obtenemos las curvas de supervivencia celular que nos relacionan el % de supervivencia con la concentración. La concentración a la que el crecimiento se inhibe al 50 % se denomina  $\text{IC}_{50}$ . El valor final de  $\text{IC}_{50}$  para cada compuesto testado, es la media del resultado de tres experimentos independientes con cuadruplicados de cada condición.

En los capítulos V y VI se realiza, además, el ensayo MTT bajo irradiación con luz ultravioleta ( $\lambda = 365$  nm) y visible ( $\lambda = 460$  nm) durante 5 y 15 minutos respectivamente. Se irradian las células tras añadir el tratamiento y se calcula el  $\text{IC}_{50}$  como se ha descrito anteriormente.

#### **II.2.4.5. Localización celular por visualización**

En el caso de que las drogas en estudio sean fluorescentes se puede visualizar su localización celular y comprobar así, de forma cualitativa, si son capaces de atravesar la membrana celular, si son capaces de entrar en el núcleo o si se quedan en los orgánulos del citoplasma.

##### **II.2.4.5.1. Instrumentación**

Se utilizó Cytation 5 Imaging Reader de BioTek equipado con dos objetivos de 4x y 20x, con cuatro cubos LED, cuatro filtros y una cámara digital CCD, la cual se controla desde el software Gen 5 para enfocar, ajustar el control de exposición y capturar las imágenes. Se pueden ajustar las características de la imagen en modo manual o automático. También dispone de toma de imágenes en campo claro.

##### **II.2.4.5.2. Procedimiento experimental**

Se siembran 10.000 células por pocillo en placas con fondo plano y paredes negras (para evitar la retrodispersión lumínica) de 96 pocillos (costar). Se utiliza medio sin fenol-red para que no interfiera en la fluorescencia. A las 24 horas se tratan con los compuestos y se incuban durante 1 hora más a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Finalmente se toman las imágenes.

#### **II.2.4.6. Internalización celular por ICP-MS**

La espectrometría de masas es una técnica en la que las moléculas son separadas según su relación masa/carga, es altamente sensible y capaz de detectar de forma cuantitativa casi todos los elementos de la tabla periódica [81]. Para ello, se introduce la muestra en forma líquida, la cual es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador, donde es transformada en aerosol empleando un flujo de gas argón. Este aerosol pasa a ser ionizado en el interior de un plasma, generado al someter un flujo de gas argón a la acción de un campo magnético oscilante inducido por una corriente de alta frecuencia. En el interior de este plasma se llegan a alcanzar temperaturas de 8000 kelvin. Los

iones generados pasan a un filtro cuadrupolar donde son separados según su relación masa/carga. Cada una de las masas llega al detector donde se evalúa la abundancia en la muestra.

Para evaluar si las drogas que se utilizan como agentes terapéuticos son capaces de atravesar la membrana celular y llegar a su diana biológica para ser efectivas, se ha empleado la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente. En el caso de los complejos metálicos es sencillo medir mediante esta técnica la cantidad de metal que las células han logrado internalizar tras un periodo de incubación [82,83].

#### II.2.4.6.1. Instrumentación

El análisis se ha realizado en el parque científico de la Universidad de Burgos con un equipo Agilent 8900 cuadrupolo equipado con un nebulizador MicroMist, un detector multiplicador de electrones y una celda de colisión y reacción con 4 líneas de gases.

#### II.2.4.6.2. Procedimiento experimental

En placas de 12 pocillos se siembran  $1.5 \times 10^5$  células por pocillo. A las 24 horas se realiza el tratamiento con las concentraciones adecuadas, normalmente por debajo del  $IC_{50}$ , de los ligandos en estudio y se incuban otras 24 horas. Después se retira el medio, se lavan con PBS, se tripsinizan y se centrifugan (250 RCF durante 5 minutos). A continuación, se resuspende el pellet en 0.5 mL de PBS y se cuentan. Por último, se digieren con  $HNO_3$  al 2 % en volumen para ser analizadas por ICP-MS. Los datos obtenidos son la cantidad total de metal presente en cada muestra, por ello, los resultados finales se expresan como cantidad de metal por cada  $10^6$  células. Se incluye en cada experimento, un control negativo (solo células) y uno positivo (tratamiento con cisplatino).



**III. Doxorubicin binds  
to duplex RNA with  
higher affinity than  
DNA and favours the  
isothermal  
denaturation of triplex  
RNA**



### III.1. RESUMEN

Doxorrubicina (DOX), antibiótico antraquinónico perteneciente al grupo de las antraciclinas, es un anticancerígeno en uso clínico desde 1974. Su efectividad se asigna a la unión con ADN evitando su replicación y la síntesis de ARN, pero también está relacionado con mecanismos de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y alteración de la membrana celular.

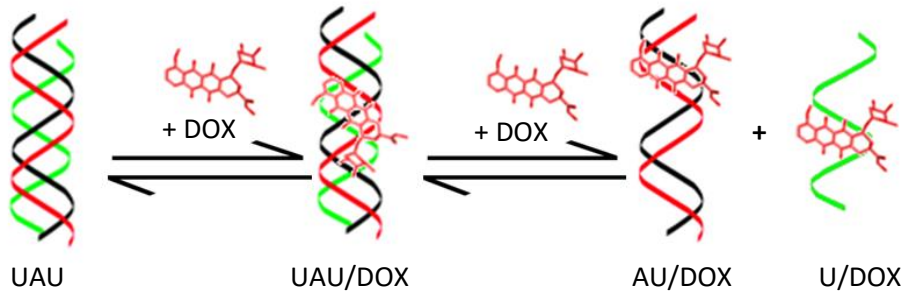
En este capítulo se ha estudiado la interacción de DOX con ARN en triple hélice, doble y hélices sencillas: Poly(rA)·2Poly(rU), Poly(rA)·Poly(rU), Poly(rA) y Poly(rU) respectivamente, mediante fluorimetría, dicroísmo circular, viscosimetría, DSC, ITC, T-Jump y tiempos de vida. El trabajo ha sido publicado en RSC Adv., 2016, 6, 101142-101152.

La valoración por fluorescencia e ITC revelan que la afinidad de DOX por la doble hélice es mayor que por la hebra sencilla de Poly(rA), seguida por la triple y por Poly(rU). El dicroísmo muestra como DOX modifica cada estructura de ARN de diferente manera. Los estudios de estabilidad térmica de la doble hélice de ARN muestran dos temperaturas de desnaturalización, una de ellas muy próxima a la de Poly(rA)·Poly(rU) libre que no varía, y otra que aumenta al aumentar la concentración de DOX, es decir se produce estabilización del ARN. Por otro lado, en la triple hélice son tres las transiciones observadas, coincidiendo una de ellas con la de la dúplex, otra con la triple hélice libre, y la tercera con la desestabilización de Poly(rA)·2Poly(rU). Sin embargo, con las hebras sencillas de Poly(rA) y Poly(rU) no se observa ninguna transición. Se puede concluir así que DOX estabiliza la doble hélice, mientras que desestabiliza la triple.

La viscosidad de Poly(rA)·Poly(rU) aumenta al aumentar la concentración de DOX, lo que evidencia que DOX intercala en la doble hélice, como sugería el aumento de temperatura de desnaturalización. Sin embargo, la viscosidad de Poly(rA)·2Poly(rU) revela dos tendencias: primero disminuye, lo que es compatible con un enlace al surco de la triple hélice, y después aumenta, efecto relacionado con la intercalación en la doble hélice, lo que sugiere que la triple hélice en presencia de DOX se disocia dando lugar a una hebra de Poly(rU) y otra de Poly(rA)·Poly(rU).

Este comportamiento queda respaldado por la mayor constante de afinidad de DOX hacia la doble que hacia la triple. Los estudios cinéticos realizados con

T-Jump confirman el mecanismo propuesto al obtener la misma constante cinética partiendo del sistema Poly(rA)·Poly(rU)/DOX que del sistema Poly(rA)·2Poly(rU)/DOX, lo que pone de manifiesto que la triple hélice de ARN en presencia de DOX sufre una reacción de desproporción para dar los complejos Poly(rU)/DOX y Poly(rA)·Poly(rU)/DOX, como se esquematiza en la siguiente Figura:

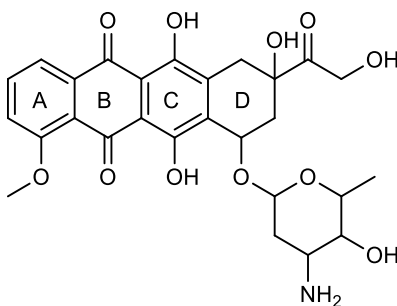


**Figura.** Desproporción de Poly(rA)·2Poly(rU) en presencia de doxorubicina.

Por otro lado, en el trabajo se compara la afinidad de la doble hélice de ARN con la de ADN obteniéndose que la afinidad de DOX por la doble de ARN es 3 veces mayor que por la de ADN, resultado muy importante dado su uso como antitumoral e inhibidor de las topoisomerasas I y II.

### III.2. INTRODUCTION

Doxorubicin (DOX), also known as hydroxydaunorubicin, is the trade name of the antibiotic adriamycin discovered in 1969 [84]. This anthracycline ranks among the most effective anticancer drugs used in the treatment of a wide variety of cancers such as breast, ovarian, prostate, lung, neuroblastoma, gastric, liver, sarcomas and haematological [85]. However, the clinical use of doxorubicin is limited due to the appearance of chemo resistance and side effects, especially cardiotoxicity [86,87]. DOX intercalates into DNA and inhibits Topoisomerase II, causing the inhibition of DNA and RNA syntheses [88]. Concerning its metabolism, harmful free radicals such as reactive oxygen species (ROS) can be released. DNA oxidative damage, DNA adducts and crosslinking, lipids peroxidation and perturbation of cellular membranes are also caused by DOX [89,90]. Three main functional moieties of DOX (Figure 1) have been identified: the intercalative region (A, B, C rings), an anchoring function (ring D) and the amino sugar moiety.



**Figure 1.** Structure of doxorubicin.

Much is known about DOX/DNA interaction. Recently, we have reported the formation of two different complexes at low ionic strength as a function of the drug/DNA ratio [91]. However, less is known regarding the interaction of DOX with RNA, a key process involved in a number of biological events, from gene expression regulation to synthesis of proteins, and plays an important role in a variety of diseases such as myotonic muscular dystrophy, HIV, AIDS, SARS and hepatitis C viral infections [92]. Synthetic fluorescent probes capable of binding to RNA structures have been used as powerful tools for the study of RNA

functions. These probes, in principle, can recognize single-stranded regions of target RNAs, accompanying the fluorescence light-up response. Meanwhile, targeting double stranded RNA structures by fluorescent probes has been a challenging task.

RNA molecules can adopt a number of structures and conformations able to modulate the cell functions [93,94], thus rendering RNA an attractive target for the design of drugs [95]. In addition to duplex hybridization and sequence-specific protein binding, formation of triplex helices represents a plausible mechanism for the cell to target nucleic acid sequences. Importantly, it enables the single-stranded nucleic acid (presumably RNA) to bind the targeted duplex structure (RNA or DNA) without prior unwinding. This peculiar ability meets considerable biotechnological potential and has been extensively studied in applications such as modulation of transcription and site-directed recombination as well as mutagen delivery [96].

Abundant literature is available on the interaction of small molecules with triplex DNA, however reliable information on the interaction with triplex RNA is scarce and ample consensus on the real influence of the type of interaction is lacking. Noncovalent interactions can either stabilize [97,98], destabilize [99,100] the triplex structure or remain the triplex unaltered [101] compared to the duplex. Even isothermal denaturation and disproportionation are also feasible, as observed in the presence of thionine [102] and coralyne [103,104], respectively. These features reveal that small molecules that may affect the stabilization of triplex RNA is an issue more complicated than initially thought.

Anthracyclines have been shown to be able to bind the iron responsive element mRNAs [105] and reducing the mRNA-binding activity of the iron regulatory proteins in tumour cells [106]. In addition, the translational inhibition activity exerted by DOX seems to be due to its interaction with rRNA [107]. Moreover, the binding of DOX to the tRNA [108] and RNA aptamers [109] have been reported. Bulges seem to be key for DOX intercalation, even if there are also weakly interactions with the HIV-1 RNA helical termini [106]. However, the binding mode of DOX with single, double and triple stranded RNAs and the thermodynamic aspects of the interaction still remain to be elucidated.

In this work, we address the interaction of DOX with single poly(rA) and poly(rU), double poly(rA)·poly(rU) and triplex poly(rA)·2poly(rU) of RNA. The

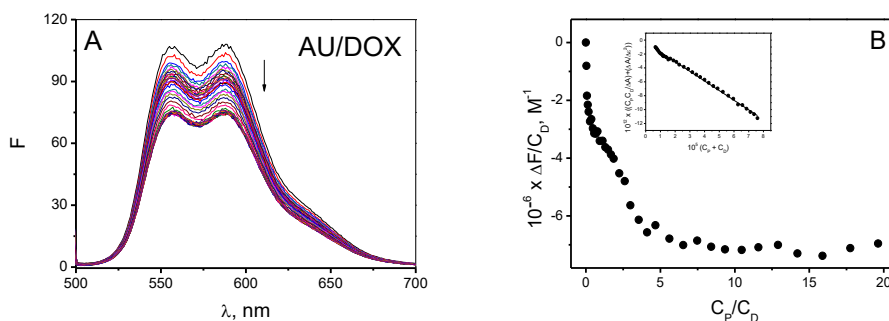
homopolymer poly(rA)·poly(rU) consists of two chains, poly(rA) and poly(rU), attached to yield a secondary A-duplex structure. The poly(rA)·2Poly(rU) triple helix is formed by binding of poly(rA)·poly(rU), joined through Watson-Crick base pairing, with another poly(rU) chain, joined through Hoogsteen base pairing, running parallel the major groove [53]. The thermodynamics of the interaction of DOX with poly(rA), poly(rU), poly(rA)·poly(rU) and poly(rA)·2poly(rU) (from now on A, U, AU and UAU, respectively), is studied by Fluorescence, Circular Dichroism (CD), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Isothermal Titration Calorimetry (ITC), Viscosity, T-Jump kinetic relaxation technique and Fluorescence lifetime measurements.

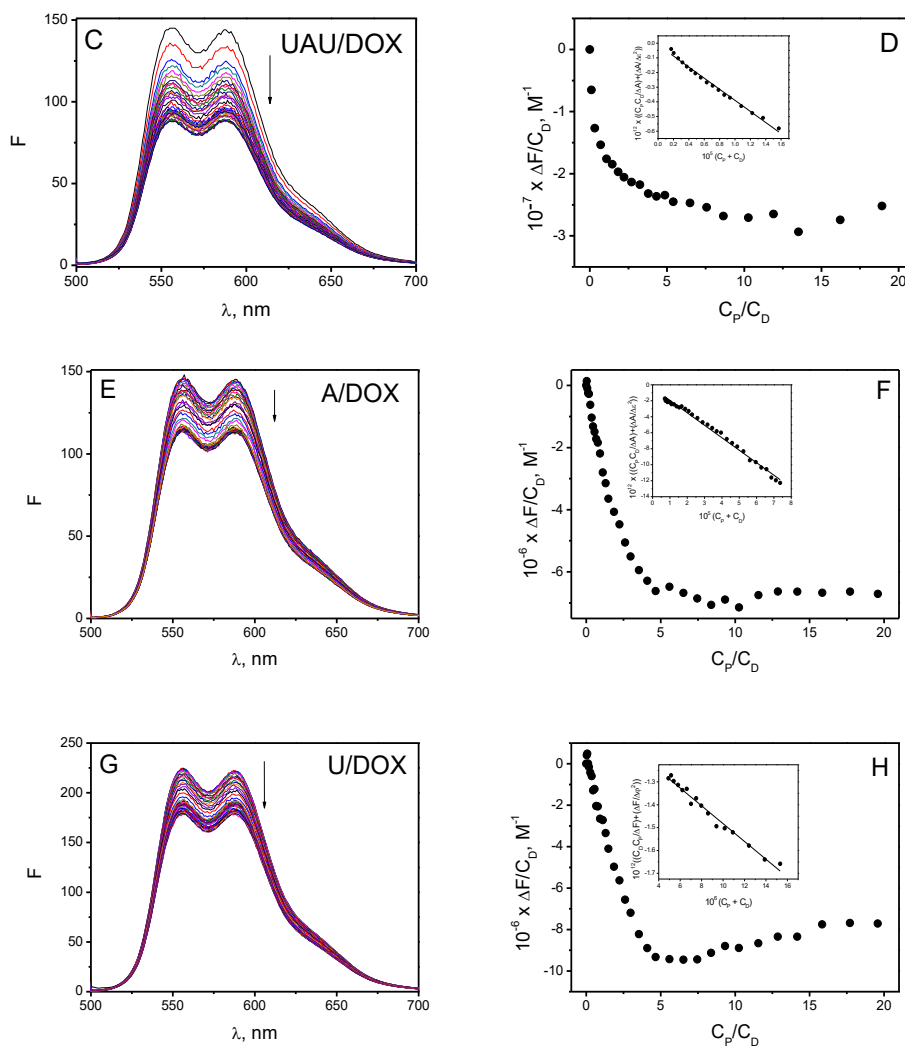
### III.3. RESULTS AND DISCUSSION

#### III.3.1. Equilibria

*Spectrofluorometric titration.*

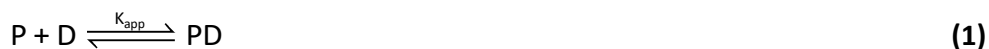
The fluorescence spectra recorded for the AU/DOX, UAU/DOX, A/DOX and U/DOX systems are plotted in Figures 2A, 2C, 2E and 2G, showing the quenching of the fluorescence of DOX upon interaction with the duplex, triplex and single strands.





**Figure 2.** Fluorimetric spectra and binding isotherms for the titration of DOX with AU (A and B), UAU (C and D), A (E and F) and U (G and H).  $C_D^0 = 4.6 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $\lambda = 558 \text{ nm}$ ,  $I = 0.1 \text{ M}$  (NaCl),  $\text{pH} = 7.0$  and  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Insets: linear analysis according to equation 2.

The binding of DOX to RNA can be represented by the apparent reaction:





where P stands for the polynucleotide, D denotes the free DOX and PD is the complex formed. The apparent binding constants ( $K_{app}$ ) are evaluated by iteration using the Hildebrand and Benesi equation [110]:

$$\frac{C_D}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta\phi^2} + \frac{1}{K_{app}\Delta\phi} \cdot \frac{1}{[P]} \quad (2)$$

where  $\Delta F = F - \phi_D C_D$  and  $\Delta\phi = \phi_{PD} - \phi_D$  and [P] stands for the equilibrium polynucleotide concentration calculated from the expression  $[P] = C_P \cdot f(r)$ , where  $f(r) = (1 - nr)^n / [1 - (n - 1) - r]^{(1-n)}$ . In this expression, r is the ratio between the bound and the free polynucleotide and n, the site size, that is, the number of base pairs occupied by a single dye molecule upon binding. Isotherms at 558 nm and data analysis according to equation 2 are shown in Figures and insets 2B, 2D, 2F and 2H. The values achieved are collected in Table 1.

**Table 1.** Apparent binding constants,  $K_{app}$ , obtained by fluorescence measurements for RNAs/DOX systems. Thermodynamic constant, K, and molar enthalpy,  $\Delta H$ , obtained for DNA/DOX and RNAs/DOX from ITC measurements.

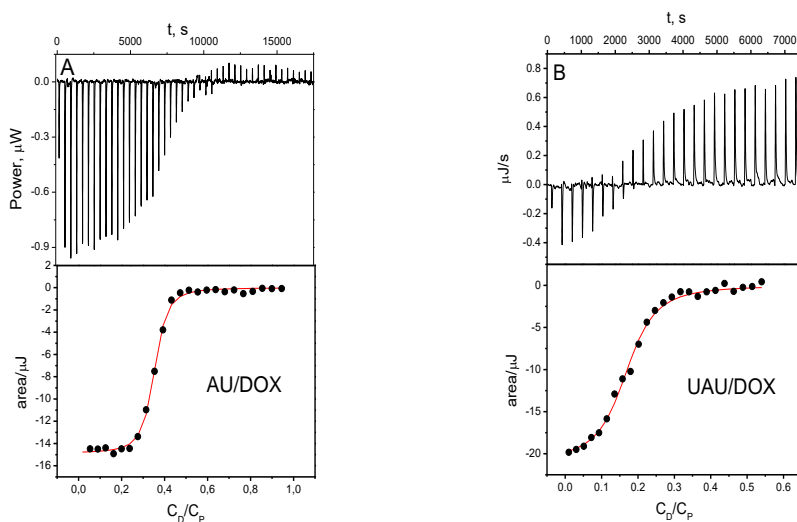
I = 0.1M (NaCl), pH = 7.0 and T = 25 °C.

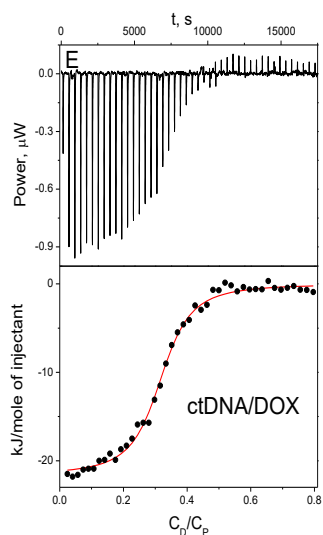
	$10^{-5} K_{app} (M^{-1})$	$10^{-5} K (M^{-1})$	$\Delta H (kJ mol^{-1})$
	<i>Fluorescence</i>	<i>ITC</i>	
<b>DNA/DOX</b>		$3.40 \pm 0.61$	$-21.6 \pm 0.4$
<b>AU/DOX</b>	$12.7 \pm 0.1$	$11.4 \pm 2.1$	$-9.40 \pm 0.12$
<b>UAU/DOX</b>	$0.77 \pm 0.16$	$1.05 \pm 0.27$	$-10.16 \pm 0.31$
<b>A/DOX</b>	$2.96 \pm 0.07$	$2.34 \pm 0.61$	$-11.65 \pm 0.64$
<b>U/DOX</b>	$0.36 \pm 0.01$	$0.58 \pm 0.09$	$-15.30 \pm 2.73$

### *Isothermal Calorimetry Titrations.*

The equilibrium interaction of DOX with RNAs was characterized thermodynamically by ITC. RNA solutions at  $I = 0.1$  M were titrated with increasing amounts of DOX. Figure 3 shows the binding isotherms of the studied systems. The thermodynamic molar enthalpy ( $\Delta H$ ) values obtained for these systems are summarized in Table 1. The binding constant values obtained from Fluorescence and ITC were very close.

To stand fair comparison, Figure 3 also shows the binding isotherm and Table 1 the  $K$  and  $\Delta H$  values for the DNA/DOX system. Under similar conditions, DOX displays greater affinity with the duplex AU than with DNA; the latter is a strongly exothermic reaction, indicating that the entropy term is related to hydration effects. In pure water, the counterions in the vicinity of AU retain only ( $34 \pm 21$ ) % solvation sphere, whereas those in the vicinity of DNA are fully solvated [111] and, in consequence,  $\Delta S_{\text{RNA}} > \Delta S_{\text{DNA}}$ . The greater affinity with AU relative to DNA is quite an interesting result, in view that DOX is a very effective type of anticancer drug currently in use [85,88,90]. Our results with AU are in fairly good agreement with the binding constants reported by Marcheschi et al. with the bulge of HIV-1 RNA [106] and the  $K$  value is one order higher than for tRNA/DOX system [107]. Regarding RNA, the binding constants show greater affinity of DOX with AU, followed by A, UAU and U.

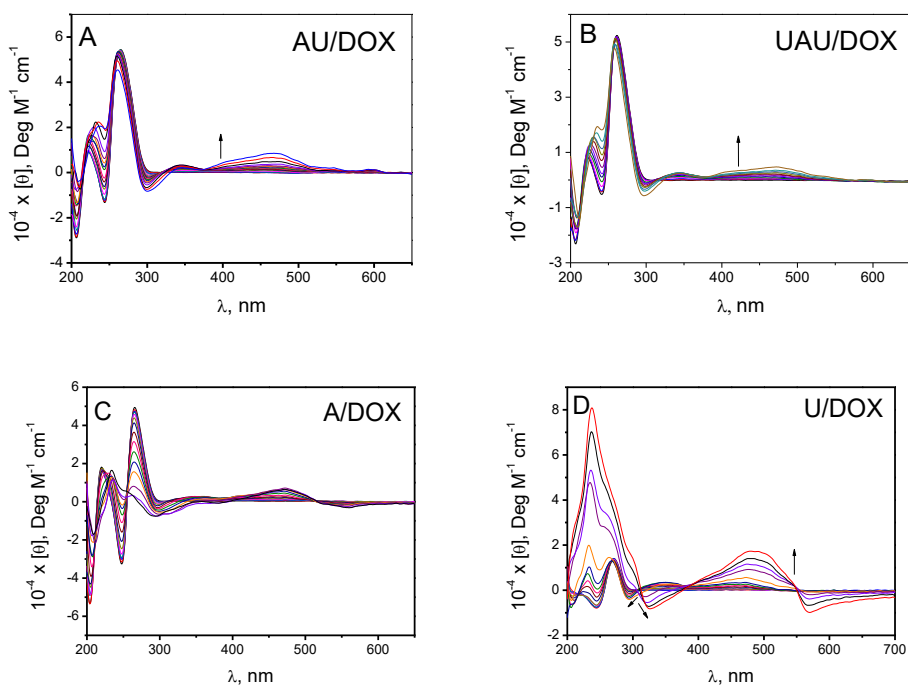




**Figure 3.** ITC titration of DOX with (A) AU, (B) UAU, (C) A, (D) U and (E) DNA,  $C_P^0$  between 0.4 and 0.8 mM,  $I = 0.1$  M (NaCl),  $\text{pH} = 7.0$  and  $T = 25$  °C.

### III.3.2. Circular dichroism (CD) measurements

CD titrations were performed by adding increasing amounts of DOX to AU, UAU, A and U solutions. Figure 4 shows the CD spectra recorded. Different behaviours can be distinguished for the duplex, triplex and single strands. For AU (Figure 4A), the intensity of the characteristic negative DOX band at 300 nm increased and the positive band at 270 nm underwent a slight decrease. A new band in the induced circular dichroism (ICD) region rose at 460 nm. The same bands (though with lower intensity) are observed with UAU (Figure 4C). A new negative ICD band emerged at 570 nm for the RNA/DOX single stranded systems. The positive band at 270 nm decreased, showing hypsochromic shift for A, whereas for U it increased and shifted to blue (Figure 4E and G). The CD variation observed with U was larger.



**Figure 4.** CD spectrograms recorded between  $C_D/C_P$  0 and 1.5, for AU/DOX (A), UAU/DOX (B), A/DOX (C) and U/DOX (D);  $C_D = 0.9$  mM,  $I = 0.1$  M (NaCl), pH = 7.0 and  $T = 25$  °C.

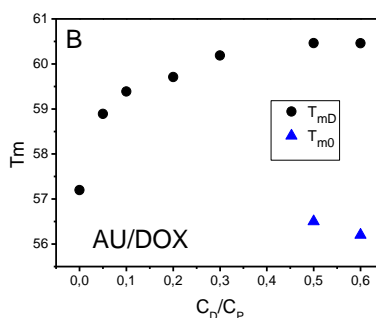
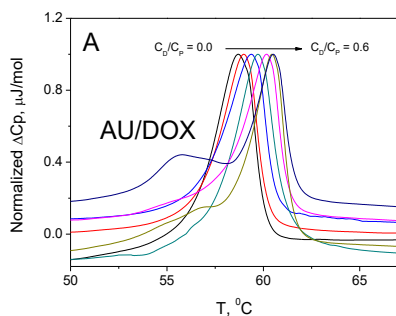
### III.3.3. Thermal stability

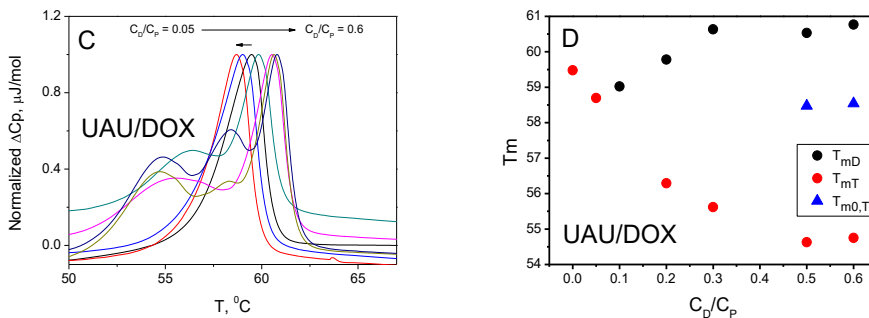
The effect of DOX on the thermal stability of the AU and UAU was evaluated by DSC measurements. In the presence of single helices (A and U), no transitions were observed. Figures 5A and 5C show the evolution of the calorimetric curves for AU/DOX and UAU/DOX systems at  $C_D/C_P$  ratios from 0.0 to 0.6. For the AU/DOX, only one peak corresponding to the double to single helix transition was observed for low  $C_D/C_P$  ratio. However, as the  $C_D/C_P$  ratio was raised ( $C_D/C_P \geq 0.5$ ), the denaturation process yielded two peaks corresponding to two different thermal transitions, whose maxima temperatures were  $T_{m0}$  and  $T_{mD}$ , with  $T_{m0} < T_{mD}$  (Figure 5A). Also is observed that  $T_{m0}$  is very close to  $T_m$  for AU alone (Figure 5B), therefore, according to equations 3 and 4,  $T_{m0}$  and  $T_{mD}$  are assigned to the denaturation reaction to free duplex and the bound AU/DOX complex transitions, respectively. The  $T_{mD}$  value increased by 4 °C between  $C_D/C_P$  0 and

0.4 and reached a plateau, which is a typical feature of intercalation reactions that entail thermal stabilization [100].



Regarding the UAU/DOX system, Figures 5C and 5D show the denaturation transitions and  $T_m$  values, respectively, obtained as a function of the  $C_D/C_P$  ratio; these figures indicate quite a different behaviour compared to the AU/DOX. At  $C_D/C_P = 0.5$  and  $0.6$ , three peaks are observed ( $T_{mT}$ ,  $T_{m0}$  and  $T_{mD}$ ), in sequence  $T_{mT} < T_{m0} < T_{mD}$ . Figure 5D shows that  $T_{m0,T}$  is close to the denaturation of UAU at  $C_D/C_P = 0$ , thereby such transition is assigned to denaturation of the free UAU present in the solution of UAU/DOX. The difference between the  $T_{m0}$  for free UAU ( $C_D/C_P = 0$ ) and UAU at equilibrium can be due to a concentration effect. By contrast,  $T_{mT}$  should correspond to denaturation of UAU/DOX, according to reaction 5, whose reaction product, AU/DOX, undergoes the following up denaturation process at  $T_{mD}$ , according to reaction 4. Inspection of Figures 5B and 5D reveals that the values of  $T_{mD}$  at  $C_D/C_P \geq 0.1$  from AU/DOX and from UAU/DOX are nearly identical; this outcome indicates that the two temperatures correspond to denaturation of the duplex. From the slopes of  $T_{mD}$  (and  $T_{mT}$ ) versus  $C_D/C_P$  it follows that DOX does stabilize AU (positive slope) and strongly destabilizes UAU (negative slope). The different behaviours observed reveal intercalation of DOX into AU and formation of an external complex in UAU, most likely linked to the groove [100].





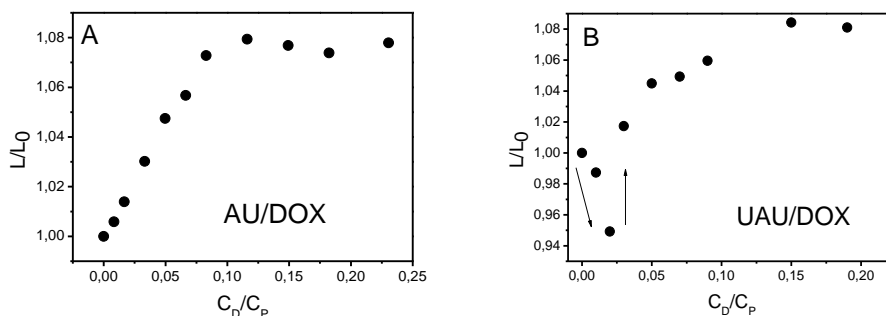
**Figure 5.** DSC melting curves for AU/DOX (A),  $T_m$  versus  $C_D/C_P$  ratio for AU/DOX (B), DSC melting curves for UAU/DOX (C) and  $T_m$  versus  $C_D/C_P$  ratio for UAU/DOX system (D).  $C_P = 5 \times 10^{-4}M$ ;  $P = 3$  atm;  $I = 0.1$  M (NaCl),  $pH = 7.0$  and  $T = 20-95$  °C.

### III.3.4. Viscosity measurements

Viscosity measurements were carried out for the AU and UAU systems at different  $C_D/C_P$  concentrations. The relative viscosity  $\eta/\eta_0$  is related to the polymer elongation by equation (6) [112]:

$$\frac{L}{L_0} = \sqrt[3]{\frac{\eta}{\eta_0}} = 1 + \beta \frac{C_D}{C_P} \quad (6)$$

where  $L$  is the contour length of the polynucleotide/drug system,  $L_0$  is that of the free polynucleotide, and  $\beta$  is the slope. For the A/DOX and U/DOX systems, no viscosity variations were observed. Figure 6A and 6B show the  $L/L_0$  versus  $C_D/C_P$  ratio plot for AU/DOX and UAU/DOX systems, respectively.



**Figure 6.** Relative polymer elongation  $L/L_0$  versus  $C_D/C_P$  ratio for: AU/DOX system (A) and UAU/DOX system (B).  $C_P^0 = 2.1 \times 10^{-4}$  M,  $I = 0.1$  M (NaCl),  $\text{pH} = 7.0$ ,  $T = 25$  °C.

The binding isotherm described for AU/DOX plot, consists of a sharp increase in the relative contour length when the drug content was raised up to  $\sim 0.12$ , followed by a plateau. The slope of the first linear stretch is  $\beta = 0.9$ . This behaviour is characteristic of intercalation binding, concurrent with the DSC results. However, for the UAU/DOX system,  $L/L_0$  exhibits a minimum with further increase up to a plateau for values close to those of AU/DOX. In both cases, precipitation occurs for high  $C_D/C_P$  ratio. For  $C_D > 0.02$ , the viscosity increases, an effect that could, in principle, be ascribed to formation of an intercalated UAU/DOX. However, this explanation is not fully reasonable as long as the amount of DOX bound to the groove so far would prevent new DOX units from intercalation. The observed viscosity enhancement can be ascribed to formation of the intercalated complex UA/DOX as a consequence of the isothermal denaturation of groove binder UAU/DOX in presence of DOX. In other words, for each  $C_D/C_P$  ratio the  $L/L_0$  ratio is the outcome of two opposed effects: first, a negative effect related to the groove binder UAU/DOX complex and, secondly, a positive effect related to the intercalated AU/DOX complex. This behaviour is consistent with the DSC observations for the UAU/DOX system, which shows simultaneous decreasing  $T_{mT}$  and increasing  $T_{mD}$  melting temperature profiles (Figure 5D).

The viscosity and DSC measurements performed at 25 °C show that in the UAU/DOX solution, depending on the DOX concentration, predominates either UAU/DOX or AU/DOX according to isothermal denaturation process (equation 7):



where  $K_D$  stands for the equilibrium constant. This equilibrium shifts to right upon increasing the DOX content. This behaviour is supported by the rather large formation constant obtained for AU/DOX relative to UAU/DOX (Table 1); the binding of DOX to the groove of UAU can favour the rupture of Hoogsteen-type binding, promoting further intercalation of DOX into AU. From the formation constants of the different complexes (Table 1),  $K_1 = 7.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  for UAU/DOX,  $K_2 = 1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  for AU/DOX and  $K_3 = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  for U/DOX, it follows that  $K_D = 460$ , calculated as  $(K_2 \times K_3) / (K_1 \times K_{f,T})$ , the formation constant of UAU from AU and U being  $K_{f,T} = 1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . The  $K_{f,T}$  value deduced from kinetic measurements [113] at 0.011M (NaCl) ionic strength was corrected for 0.1M (NaCl) [114]. The denaturation process at constant temperature, also has been reported for the RNA/thionine system [102].

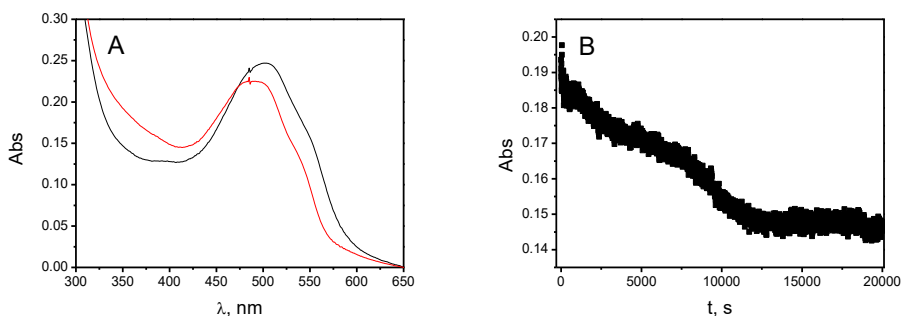
The behaviour of the DOX system with RNA (AU and UAU) is quite different from that displayed by ethidium bromide (EB) with DNA (duplex poly(dA)\*poly(dT) and triplex poly(dA)\*2pol-y(dT)) (1) the DOX fluorescence decreases upon interaction with RNA, whereas the EB fluorescence increases when either the duplex or the triplex form is present; (2) the binding of EB to the triple helical form is substantially stronger than that of the duplex, in contrast to the observations with DOX/RNA; (3) EB intercalates into the duplex and triplex DNA, similar to the observations with berberine derivatives with RNA while DOX intercalates only into the duplex and binds to the groove with triplex RNA; (4) EB does stabilize the DNA triple helix, while DOX destabilizes the RNA triplex helices. Destabilization of triple RNA and stabilization of its Watson–Crick strands has also been observed with aristololactam-b-D-glucoside, whereas triplex RNA is stabilized by 9-O-(vamino) Alkyl Ether Berberine Analogs. In summary, a general type of behaviour cannot be established when comparing helix multiplicity (duplex and triplex), because this issue also depends on the particular ligand and the polynucleotide (DNA or RNA).

### III.3.5. Kinetic reactions (slow and fast)

The formation of AU/DOX from UAU/DOX according to reaction 7 is corroborated kinetically. Figure 7A shows the variation of the spectra of UAU/DOX and



UA/DOX with freshly prepared samples at same concentration,  $C_{\text{DOX}}/C_{\text{RNA}} = 0.1$ . The kinetic trace indicates that isothermal denaturation occurs by a slow reaction (Figure 7B) whose mechanism is not straightforward, because the denaturation implies several steps, such as the dissociation of DOX from the groove of UAU/DOX system, unwinding, release of U from UAU by a cooperative process and intercalation of DOX into AU. Though dissociation and intercalation are fast processes, this is not the case for unwinding and denaturation by rupture of Hoogsteen binding.



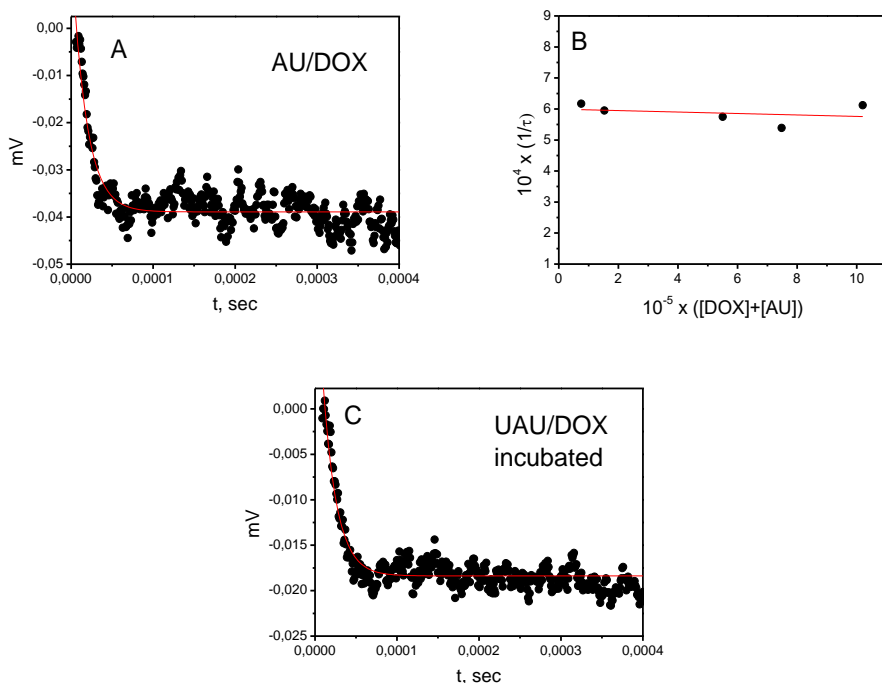
**Figure 7.** A) Variation of absorbance of UAU/DOX (red) and AU/DOX (black) at same concentration ratio,  $C_{\text{DOX}}/C_{\text{RNA}} = 0.1$ . B) Kinetic trace recorded at  $\lambda = 359 \text{ nm}$ .  $I = 0.1 \text{ M (NaCl)}$ ,  $\text{pH} = 7.0$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Figure 8A shows the T-Jump fast kinetic reaction trace corresponding to intercalation of DOX into AU; the data pairs were fitted by a monoexponential function, yielding the rate constant value independent of the DOX concentration, the average value being  $k = 5.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (Figure 8B). This outcome can be interpreted if the intercalation is preceded by an even faster step, not observable by T-Jump. In a similar way as in the presence of DNA [91], we can surmise here two types of complexes. Firstly, the sugar moiety of DOX binds to the groove faster than microseconds to give the  $(\text{AU}/\text{DOX})'$  complex and, from this groove complex, the aromatic moiety of DOX intercalates monomolecularly to yield the intercalated AU/DOX (equation 8).



The formation of UAU/DOX or U/DOX (for which the binding to the groove and external binding have been put forward above) cannot be observed by T-Jump

measurements from freshly prepared solutions; both types of interaction are faster than intercalation. However, when the triplex helix is incubated for 6 h, a kinetic trace is observed exactly alike that of AU/DOX (Figure 8C), that is, the rate constant is the same when one starts with either AU (Figure 8A) or UAU (Figure 8C), which corroborates the denaturation of UAU/DOX according to reaction 7.



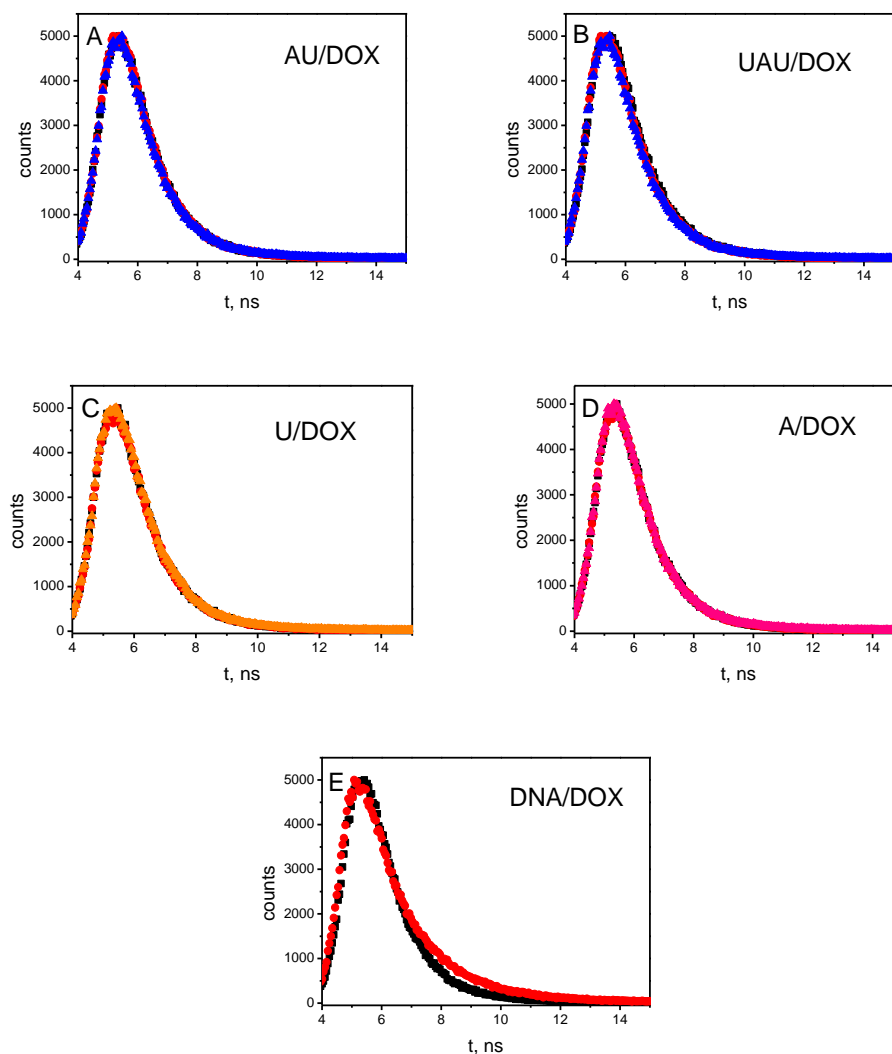
**Figure 8.** A) T-Jump kinetic curve and fitting of the data-pairs by a monoexponential function (continuous line) for the AU/DOX system; B) variation of the time constant,  $1/\tau$ , with the sum of DOX and AU concentrations in equilibrium. C) T-Jump curve and fitting of the data-pairs by a monoexponential function (continuous line) for the UAU/DOX system after 6 h incubation time.  $C_D = 2.14 \times 10^{-5}$  M.  $C_D/C_P = 1.0$ .

### Fluorescence lifetime measurements

TCSPC measurements were carried out for fluorescence decay of DOX in the absence and in the presence of increasing concentration of U, AU and UAU. Within the  $0.05 < C_{DOX}/C_{RNA} < 0.6$  concentration range, only a single, identical lifetime was observed ( $\tau = 1.01$  ns) in all cases corresponding to free DOX (Figures

9A to 9D); this feature indicates that the complexes RNA/DOX are not fluorescent. By contrast, the kinetic trace of DOX/DNA for  $C_{\text{DOX}}/C_{\text{DNA}} = 0.6$  is a biexponential function (equation 9), with  $\tau_1 = 1.21$  ns and  $\tau_2 = 2.28$  ns (Figure 9E).

$$F(t) = \sum \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (9)$$



**Figure 9.** TCSPC measurements for: AU/DOX (A), UAU/DOX (B), U/DOX (C) and A/DOX (D). In all systems  $0 < C_{\text{DOX}}/C_{\text{RNA}} < 0.6$ .  $C_{\text{D}} = 4.6 \times 10^{-6}$  M. DNA/DOX: black line  $C_{\text{DOX}}/C_{\text{DNA}} = 0$  and red line  $C_{\text{DOX}}/C_{\text{DNA}} = 0.6$  (E).

### III.4. CONCLUSIONS

Thermodynamic and kinetic experiments have shown that interaction of DOX with AU gives rise to an intercalated complex, whereas with UAU it gives a groove binding complex, and external complexes with U and A. Similar behaviour was observed in the presence of thionine [101], in both cases followed by isothermal denaturation of UAU/ligand. Common features in both types of interactions are: 1) intercalation of the ligand into the AU and binding to the groove in the UAU, 2) greater affinity with the AU than with UAU, 3) reaction of the ligand with the U and A single strands.

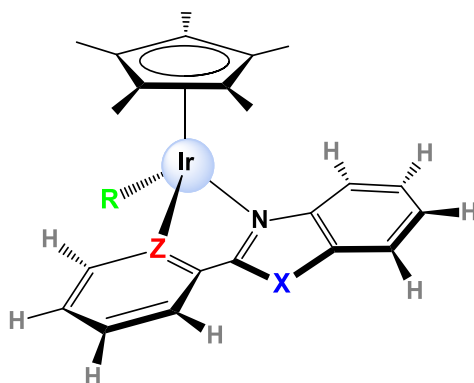
It follows that the binding of the ligand to the groove favours the dissociation of the uracil strand bound by Hoogsteen-type binding. The affinity of DOX with RNA in double and triple helices differs by a factor of nearly 15. The higher affinity of DOX with AU reinforces the assumption of disproportionation of the UAU/DOX to give rise to the AU/DOX and the U/DOX complexes at 25 °C. Moreover, in near physiological conditions, the affinity of DOX with the AU is 3 times greater than with DNA, a relevant feature in view of the interest aroused by DOX as antitumor and inhibitor agent of topoisomerases I and II.

# **IV. Structure-activity relationship study of half sandwich Iridium complexes**



## IV.1. RESUMEN

En este capítulo se ha estudiado la influencia que tiene la sustitución de un átomo o un pequeño grupo de átomos en complejos del tipo half-sandwich con ligandos benzimidazol, sobre la interacción con ADN, BSA, citotoxicidad e internalización en células de cáncer de colon. Los ocho complejos estudiados para establecer una relación estructura-actividad, según la notación **[Z,X-R]** (véase la Figura), han sido: **1[C,NH-Cl]**, **2[C,NMe-Cl]**, **3[N,NH-Cl]Cl**, **4[N,NMe-Cl]Cl**, **5[CNH<sub>2</sub>,NH-Cl]Cl**, **6[CNH<sub>2</sub>,S-Cl]Cl**, **7[CO,NH-Cl]** y **8[CO,S-Cl]**.



**Figura.** Estructura general de los compuestos estudiados en este capítulo.

El estudio en disolución reveló que aquellos complejos con  $Z = N$  y  $CNH_2$  son solubles en agua mientras que los que presentan  $Z = C$  y  $CO$  son solubles en DMSO, además en todos ellos se produce la sustitución del grupo saliente R, formándose el correspondiente aquo-complejo.

Los compuestos más citotóxicos en líneas de cáncer de colon (SW480) y ovario (A2780) y en una línea resistente al cisplatino (A2780CIS) son aquellos con  $Z = C$  y  $CO$ , y con  $X = NH$ . Para conocer si el ADN es la diana de estos compuestos, así como sus diferentes modos de enlace según la composición de su estructura, se realizaron estudios de RMN (por la Dra. Marta Martínez Alonso), espectroscopía, dicroísmo circular, viscosidad y DSC. Todos los compuestos forman enlace covalente con el ADN, excepto los dos con enlace  $Z = C$ , que no interaccionan.

La interacción con ADN no explica completamente las diferencias en la citotoxicidad de los compuestos, por lo que se estudió su interacción con la proteína BSA mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, comprobando que aquellos que no interaccionaban con el ADN tampoco lo hacían con BSA. Se midió

por ICP-MS la cantidad de complejo capaz de entrar en las células, concluyendo que los más citotóxicos son los que más se acumulan en el interior celular.

Sorprendentemente los dos compuestos que no interaccionan con ADN ni BSA son los más citotóxicos, por lo que la doctora Maria Isabel Acuña está realizando experimentos biológicos de detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) y ciclo celular en el CIMUS (Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas) para poder dilucidar su mecanismo de acción biológica. También ha realizado estudios *in vivo* con **1[C,NH-Cl]**.

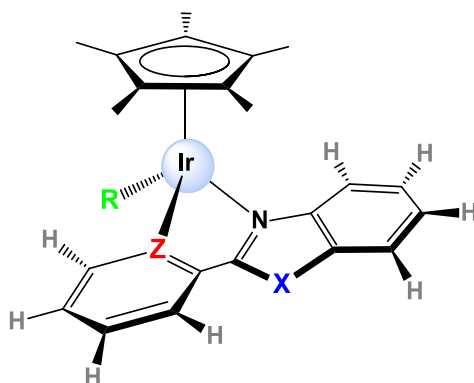


## IV.2. INTRODUCTION

Different molecules have been investigated as possible targets for chemotherapeutics treatments [115] however, DNA is still the most effective, and molecules targeting DNA are exhaustively designed. Although a big effort in developing new metal drugs is carrying out, only few platinum complexes such as cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, nedaplatin, and lobaplatin have been approved for current tumour therapy [116–119]. Cisplatin binds to N7 reactive centre on purine bases of the DNA; interfering with DNA repair mechanisms, causing DNA damage, and subsequently inducing apoptosis in cancer cells [120].

The research of new prodrugs in order to decrease the side effects of cisplatin, overcome the resistance, increase the efficiency and modulate pharmacological properties has stimulated variations in the substituents coordinated to the metal centre [121]. Nowadays there are some non-platinum metal anticancer drugs validated for cancer chemotherapy, a variety of transition-metal drug candidates are currently under consideration for coming development [122–124]. Organometallic compounds have properties between inorganic and organic classical drugs, so they have turn into promising alternatives for rational drug design. The last efforts have been dedicated to develop Iridium metallodrugs which exhibit positive antiproliferative activities against malignant cells [125,126] and inhibit kinase enzymes [127], some of them, mainly cyclometallated, are responsible for the loss of mitochondrial functionality leading to the activation of apoptotic cell death pathways [128]. Furthermore, the very well-known inertness of Iridium(III) is a desirable property to drug design because it allows the complex to get its target without alterations. An increasing interest in new half-sandwich Iridium complexes has been recently shown [21,129,130]. The presence of pentamethylcyclopentadienyl substituent (Cp\*) in half-sandwich Iridium molecules provides stability and hydrophobicity, which improve cell uptake [131]; besides, promotes the chloride leaving by increasing the positive charge on the metal, standing for the hydrolysis or the coordination of nucleobases to the metal centre. Furthermore benzimidazole and its derivatives exhibits a wide range of pharmacological properties as antihypertensive, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antiviral, antioxidant, antiulcer, antiproliferative and antitumor activity including anticancer and HIV-1 integrase inhibition [132,133]. So, these interesting characteristics prompted us to explore the biological behaviour differences in a family of benzimidazole Iridium complexes which only differ in three atoms.

Previous works have studied the relation structure-activity of Iridium(III) families compounds varying the quelating substituents [134], in combination with monodentate ligands [135] and bidentate C,N- [136], N,N- [137,138], N,O- [139], P,O- [140], P,P- [141], P,S- [142], and C,S-ligands[143] or changing the substituents on Cp\* [144], but from our knowledge this is the first time in which it is brought to light that every atom of ancillary ligand plays a specific role in the reactivity. Eight half sandwich Iridium complexes have been studied in order to clarify the differences in their biological behaviour and in the mode of binding with DNA and BSA. A structure-activity relationship owing to a single atom was established and **1**[C,NH-Cl], **2**[C,NMe-Cl], **3**[N,NH-Cl]Cl, **3**[N,NH-H<sub>2</sub>O](OTf)<sub>2</sub>, **3**[N,N-Cl], **4**[N,NMe-Cl]Cl, **5**[CNH<sub>2</sub>,NH-Cl]Cl, **6**[CNH<sub>2</sub>,S-Cl]Cl, **7**[CO,NH-Cl] and **8**[CO,S-Cl] were the synthesized complexes according to the notation **[Z,X-R]** (Figure 1). In aqueous solution, the leaving group (R) was replaced (directly or indirectly) by water molecules, leading to aqua-complexes. That is why this study has enabled us to determine the influence of the atom, or group of atoms, in the Z and X positions over the chemical and biological behaviour of half-sandwich Iridium complexes, as well as to prove that small differences in the structure, produce critical changes in their properties.



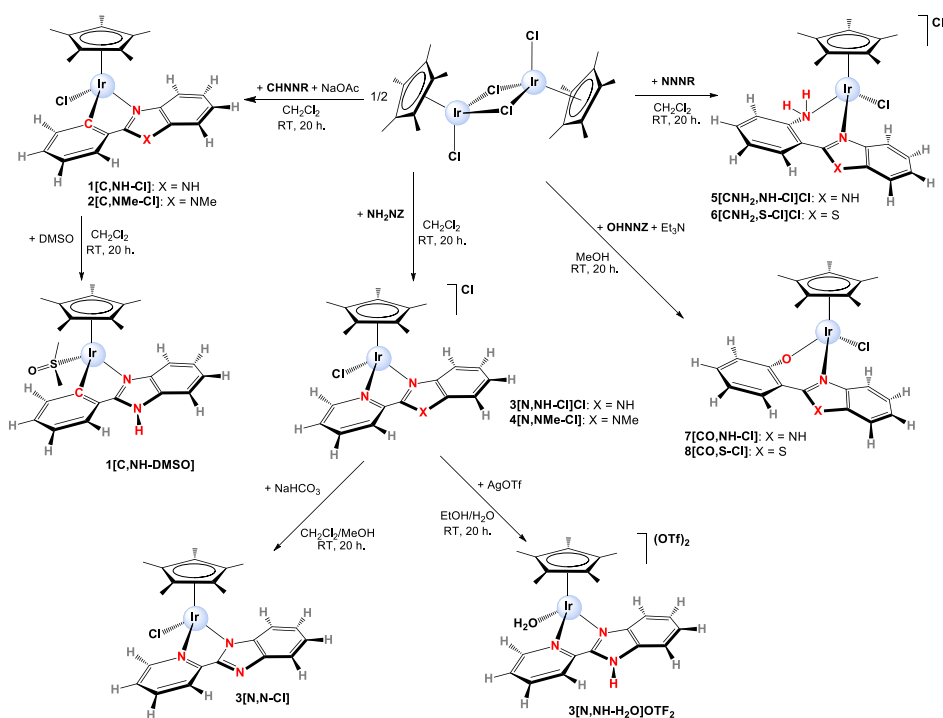
**Figure 1.** Schematic variable atoms in the complexes studied in this work.

The design concepts looked over in this chapter can be applied to structure-activity relationships for other organometallic anticancer complexes.

## IV.3. RESULTS AND DISCUSSION

## IV.3.1. Synthesis and characterization

The Iridium chlorido-bridged dimer  $[\text{Ir}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ , was used as the starting product and prepared by reaction of the Iridium chloride salt ( $\text{IrCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) with 1,2,3,4,5-pentamethylcyclopentadiene ( $\text{Cp}^*$ ) according to literature procedures [145]. All complexes were synthesised by reacting the chloro-bridged dimer with the corresponding ligand, in the presence of a base (NaOAc or  $\text{Et}_3\text{N}$ ) when necessary, at room temperature for 20 hours, in dichloromethane or methanol. A detailed synthesis scheme is shown in Figure 2. All complexes, isolated in moderate-to-good yields (from 38% to 98%) as the corresponding racemates ( $R_{\text{Ir}}$  or  $S_{\text{Ir}}$ ) in the form of yellow, orange or brown powders, were fully characterised by NMR spectroscopy, IR spectroscopy, positive fast atom bombardment ( $\text{FAB}^+$ ) mass spectrometry, molar conductivity and elemental analysis. Single crystals suitable for X-ray diffraction analysis were obtained for **1**[C,NH-Cl], **3**[N,NH-Cl] $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , **4**[N,NMe-H<sub>2</sub>O], **5**[CNH<sub>2</sub>,NH] $\cdot \text{H}_2\text{O}$  and **8**[CO,S-Cl].



**Figure 2.** Schematic synthesis of the half-sandwich Iridium(III) complexes.

### IV.3.2. Solution studies

Before tackling chemical or biological studies, it is mandatory knowing the solution behaviour of the compounds for a possible use of Iridium complexes as anticancer drugs.

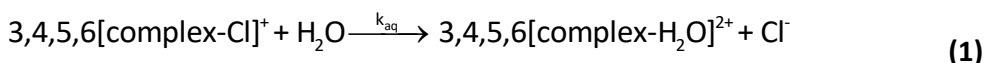
#### *Solubility and Aquation-anation equilibria.*

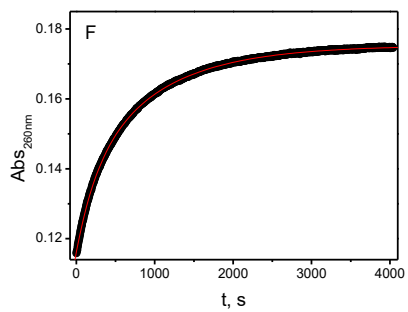
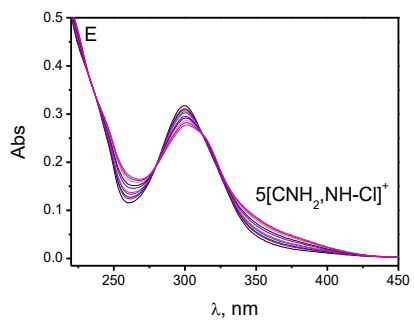
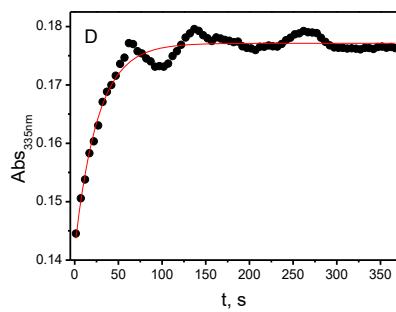
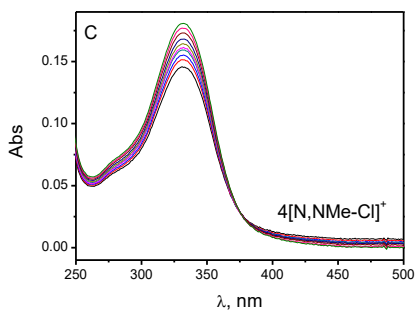
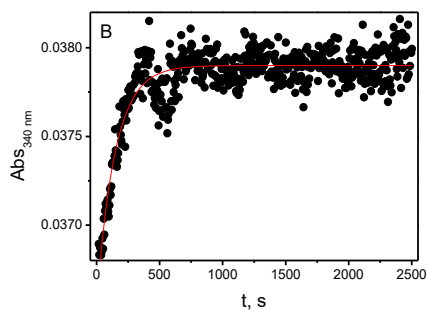
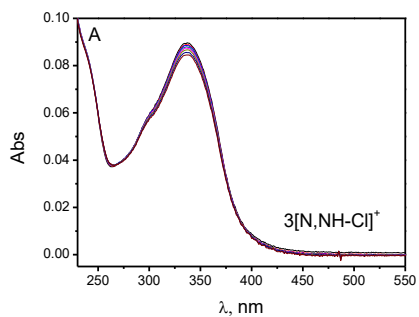
The solubility strongly depends on the atom directly linked to Iridium centre as well as the charge of the complex. In this way, the N-Ir and CNH<sub>2</sub>-Ir are monocationic complexes in water, **3**[N,NH-Cl]<sup>+</sup>, **4**[N,NMe-Cl]<sup>+</sup>, **5**[CNH<sub>2</sub>,NH-Cl]<sup>+</sup> and **6**[CNH<sub>2</sub>,S-Cl]<sup>+</sup> whereas when the binding is C-Ir, **1**[C,NH-Cl] and **2**[C,NMe-Cl], or CO-Ir, **7**[CO,NH-Cl] and **8**[CO,S-Cl], the complexes are neutral and they are soluble in DMSO and in mixtures DMSO:water, but not in pure water.

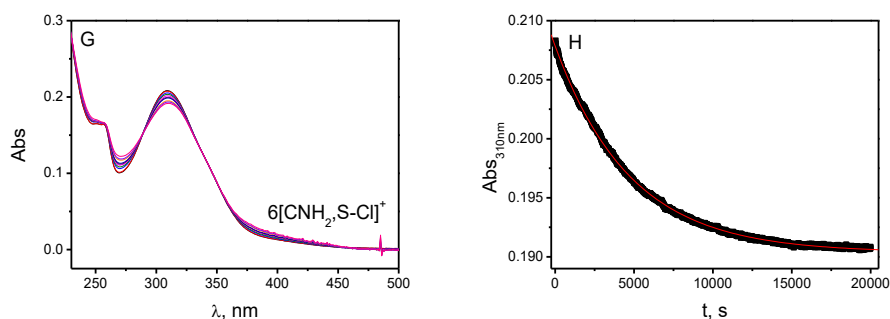
As far as stability is concerned the aquation reaction, substitution of chloride by a water molecule, takes place directly on the aqua soluble complexes to give **3**[N,NH-H<sub>2</sub>O]<sup>2+</sup>, **4**[N,NMe-H<sub>2</sub>O]<sup>2+</sup>, **5**[CNH<sub>2</sub>,NH-H<sub>2</sub>O]<sup>2+</sup> and **6**[CNH<sub>2</sub>,S-H<sub>2</sub>O]<sup>2+</sup> according to reaction represented in equation 1. Figure 3 shows the kinetic spectrograms and the data pairs absorbance-time at a fixed wavelength, corresponding to the aquation. The curves were fitted to the monoexponential function to obtain the rate constants k<sub>aq</sub> (see table 1).

To find out the influence of X group on the rate constants (see Figure 1), it is convenient compare **3** with **4** and **5** with **6**. Thus, the speed of the aquation process is five times higher for **4** than **3**, and seven times higher for **5** than **6**, that is, the order in the reactivity according to X group is: NMe > NH > S.

If we compare **3** with **5**: the aquation process on **3** is three times higher than **5**. Finally, k<sub>aq</sub> is 190 times greater in **4** than in **6**. Therefore, regarding the influence of Z group, N is more reactive than C, being Z = N y X = NMe the most reactive substituents.



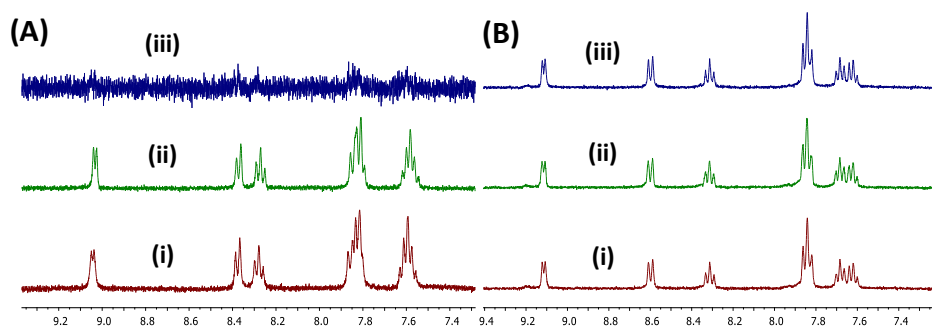




**Figure 3.** Spectral profiles of aquation processes and corresponding representation of absorbance *versus* time pairs at a fixed  $\lambda$ ; monoexponential fitting curves (red lines): A) and B)  $3[\text{N,NH-Cl}]^+$ , C) and D)  $4[\text{N,NMe-Cl}]^+$ , E) and F)  $5[\text{CNH}_2, \text{NH-Cl}]^+$ , G) and H)  $6[\text{CNH}_2, \text{S-Cl}]^+$ .  $C_D = 1.5 \times 10^{-5}$  M.

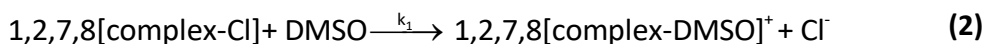
The aquation-anation reaction was also studied for  $3[\text{N,NH-Cl}]^+$  and  $4[\text{N,NMe-Cl}]^+$  under pseudopharmacological conditions by recording the corresponding  $^1\text{H}$  NMR spectra of a 5 mM solution in  $\text{D}_2\text{O}$  at 25 °C, in the absence of NaCl and then in the presence of NaCl (100 mM as model concentrations for blood plasma conditions) and only for  $3[\text{N,NH-Cl}]^+$ .

When the complexes were dissolved in water the signals did not shift (see Figure 4), so only two interpretations are possible: either the aquation process is fast or the aquation reaction does not occur. The first hypothesis seems correct if  $3[\text{N,NH-H}_2\text{O}]^{2+}$  and  $4[\text{N,NMe-H}_2\text{O}]^{2+}$  aquation reactions finish before the NMR experiments are conducted (see Figures 3B and 3D). However, addition of NaCl to  $3[\text{N,NH-H}_2\text{O}]^{2+}$  caused no shift in the signals either (Figure 4A), which a priori it would confirm the second hypothesis, the aquation reaction does not occur in  $3[\text{N,NH-Cl}]^+$ . On the other hand, some solid precipitate was observed even in the initial step, completing the whole precipitation after 23 h. This fact would be compatible with formation of  $3[\text{N,NH-Cl}]^+$  from  $3[\text{N,NH-H}_2\text{O}]^{2+}$ , which is insoluble in the presence of 100 mM NaCl due to the common-ion effect.



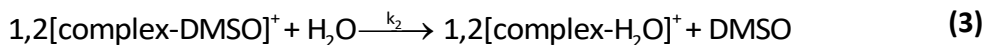
**Figure 4.** (A) Aquation-anation equilibrium for Cl-complex **3[N,NH-Cl]<sup>+</sup>** : (i) spectrum of **3[N,NH-Cl]<sup>+</sup>** in D<sub>2</sub>O after 30 min, (ii) spectrum after addition of NaCl 100 mM and (iii) after 23 h. (B) Aquation process for **4[N,NMe-Cl]** after (i) 5 min, (ii) 15 min and (iii) 30 min.

In addition, neutral complexes **1[C,NH-Cl]**, **2[C,NMe-Cl]**, **7[CO,NH-Cl]** and **8[CO,S-Cl]** underwent substitution of the chloride, when dissolved in DMSO. The substitution of Cl by DMSO according to the equation (2) was observed by UV- vis.

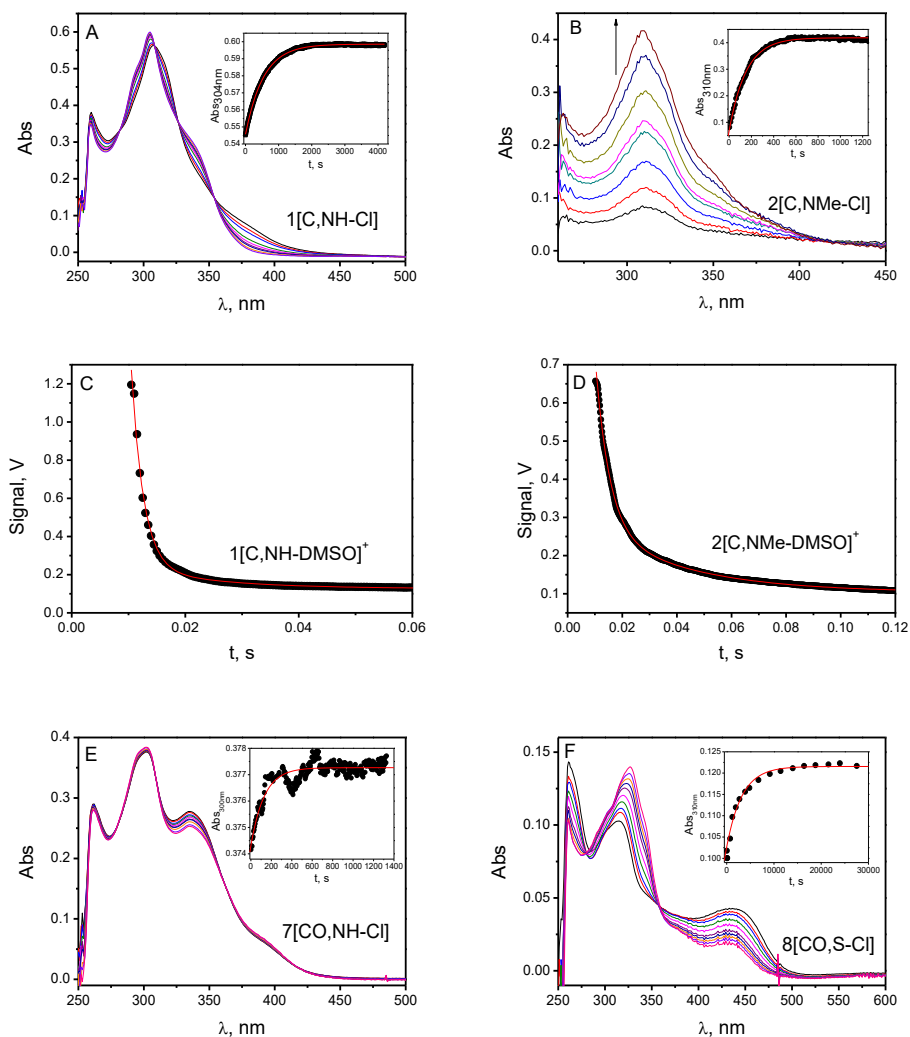


The great changes observed with time in the spectral profiles, resulting from the chloride replacement by a DMSO molecule are shown in Figures 5A, 5B, 5E and 5F. The  $k_1$  rate constants were obtained (see table 1) from the fitting of monoexponential function to Abs-time data pairs. As the rate of aquation process depends on Z and X groups, the  $k_1$  values of **1** can be compared with **2** and **7** with **8**, obtaining that the rate according to X group is NMe > NH > S, similar to the aquation process. Regarding the Z group effect,  $k_1$  of **1** can be compared with **7**, being four times higher Z = CO than Z = C. It should be underlined that  $k_{\text{aq}}$  and  $k_1$  are same order constants, which demonstrates that Cl dissociation is the determining step.

Lastly, the exchange of the DMSO by a H<sub>2</sub>O molecule would be considered. Interestingly, only in the case of **1[C,NH-DMSO]<sup>+</sup>** and **2[C,NMe-DMSO]<sup>+</sup>**, the fast reactions from DMSO-complex to form H<sub>2</sub>O-complex were observed, according to equation 3. They have been studied by stopped flow (Figures 5C and 5D).



The reaction of **1** is seven times quicker than **2** one, as it can be seen the  $k_2$  in table 1. Regarding  $k_1$  and  $k_2$  values, it can be concluded that the DMSO substitution by  $\text{H}_2\text{O}$  is quicker than Cl substitution by DMSO, being  $k_2$  approximately 100.000 times higher than  $k_{\text{aq}}$ . ESI-MS and NMR also confirmed this fact (data not shown).



**Figure 5.** Spectral profiles over time of the [complex-DMSO]<sup>+</sup> formation according to reaction 2 for A) **1[C,NH-Cl]** B) **2[C,NMe-Cl]** E) **7[CO,NH-Cl]**, F) **8[CO,S-Cl]**. Stopped flow experiment for C) **1[C,NH-DMSO]<sup>+</sup>** and D) **2[C,NMe-DMSO]<sup>+</sup>**.  $\lambda = 304\text{nm}$ ,  $\text{pH} = 7.0$ .

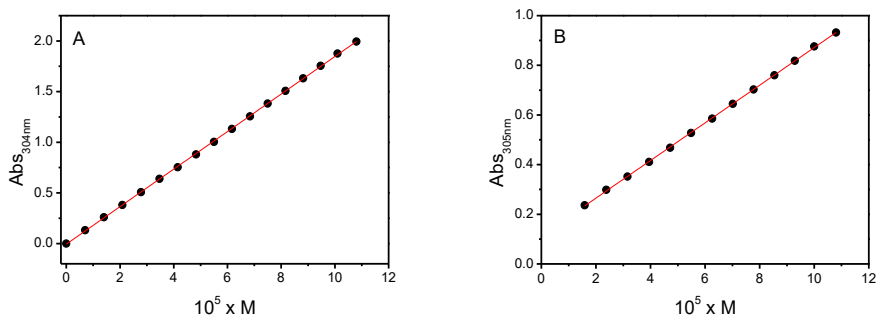


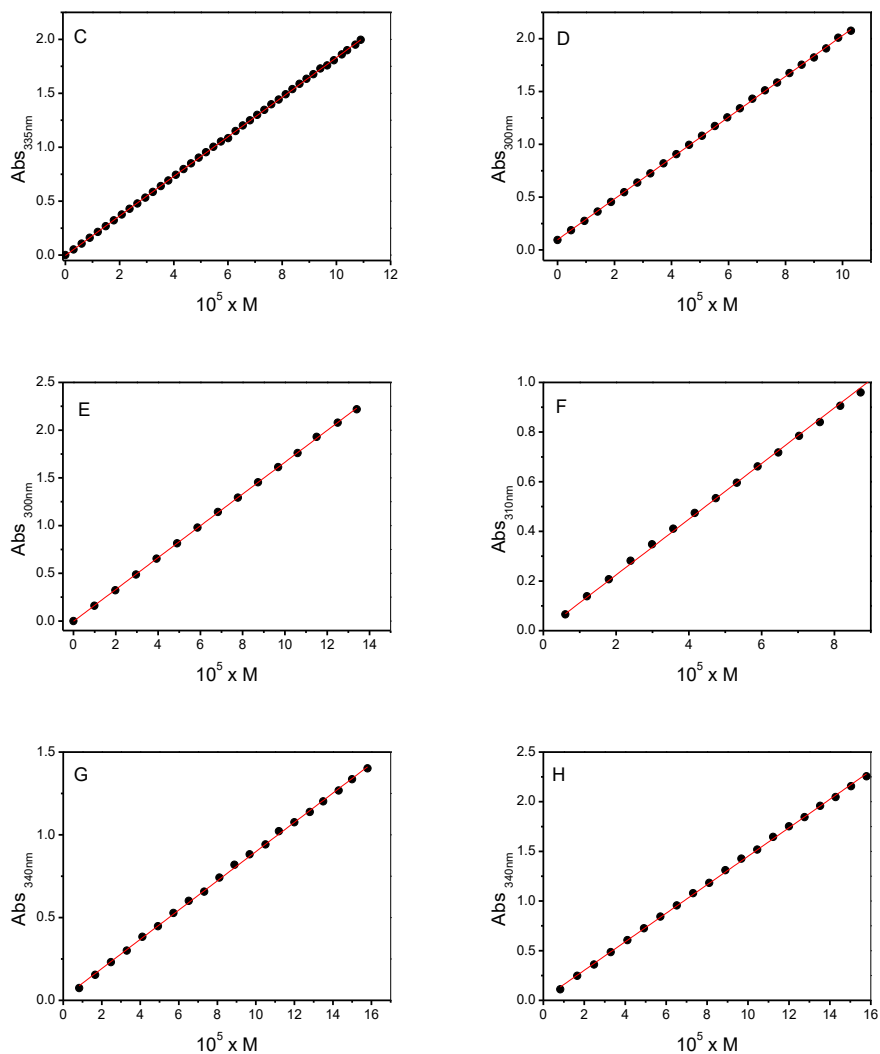
**Table 1.** Rate constants related to the Cl-complexes reaction to form H<sub>2</sub>O-complexes ( $k_{aq}$ ) or DMSO-complexes ( $k_1$ ), and H<sub>2</sub>O-complexes from DMSO-complexes ( $k_2$ ), according to the reactions (1-3).

Complex	$k_{aq}, s^{-1}$	$k_1, s^{-1}$	$k_2, s^{-1}$
<b>1[C,NH-Cl]</b>	-	$(1.79 \pm 0.04) \times 10^{-3}$	$726 \pm 14$
<b>2[C,NMe-Cl]</b>	-	$(6.63 \pm 0.01) \times 10^{-3}$	$109 \pm 1$
<b>3[N,NH-Cl]<sup>+</sup></b>	$(7.11 \pm 0.32) \times 10^{-3}$	-	-
<b>4[N,NMe-Cl]<sup>+</sup></b>	$(3.81 \pm 0.19) \times 10^{-2}$	-	-
<b>5[CNH<sub>2</sub>,NH-Cl]<sup>+</sup></b>	$(1.47 \pm 0.01) \times 10^{-3}$	-	-
<b>6[CNH<sub>2</sub>,S-Cl]<sup>+</sup></b>	$(2.12 \pm 0.01) \times 10^{-4}$	-	-
<b>7[CO,NH-Cl]</b>	-	$(7.67 \pm 0.51) \times 10^{-3}$	-
<b>8[CO,S-Cl]</b>	-	$(3.11 \pm 0.25) \times 10^{-4}$	-

With all this in mind, we can conclude that the decisive step of the reaction in all cases is the outgoing group, DMSO or Cl, dissociation. The substitution of DMSO by H<sub>2</sub>O was not observed by stopped flow in **7[CO,NH-DMSO]<sup>+</sup>** and **8[CO,S-DMSO]<sup>+</sup>**, however, it is not sufficient to discard the formation of aqua-complex by a faster millisecond reaction, which could not be monitored with the available techniques. The acid-base behaviour will suggest the formation of **7[CO,NH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>** and **8[CO,S-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>** (see below).

It is also necessary to know if the complexes could aggregate in the working conditions, so the Lambert-Beer law was tested, and all complexes fulfil it (Figure 6).



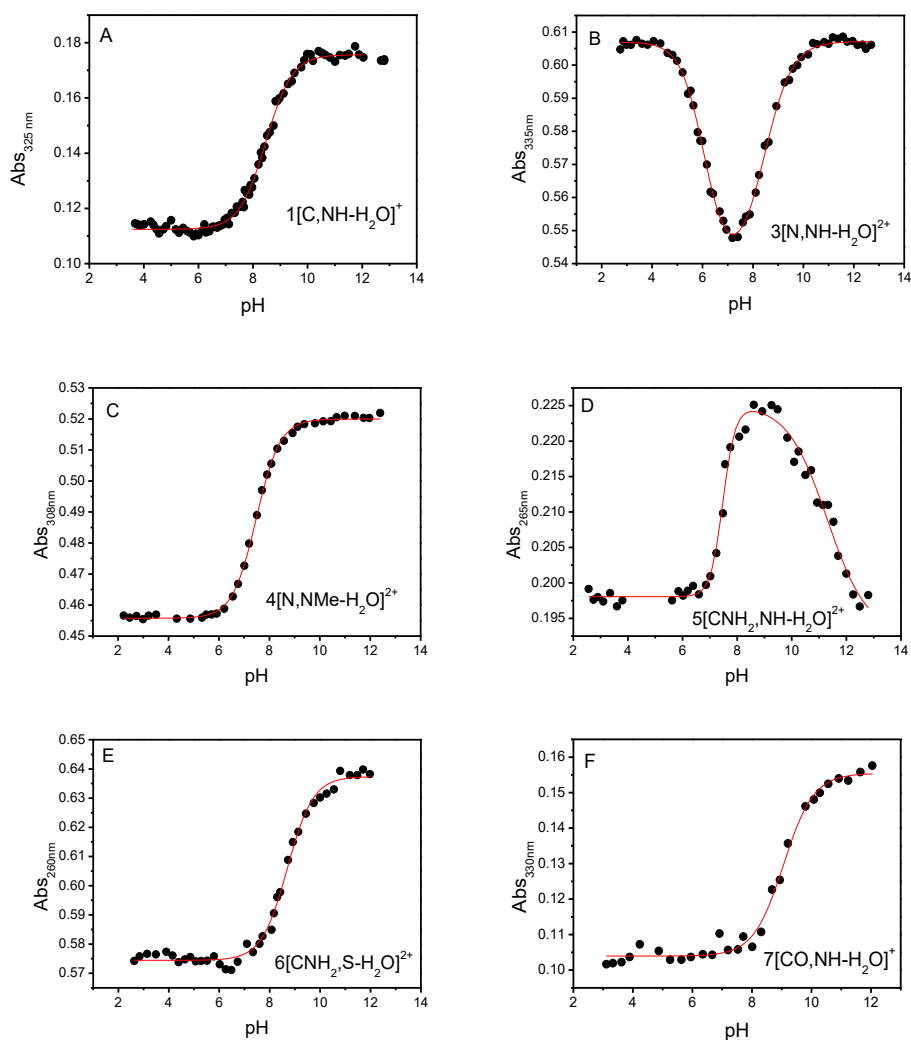


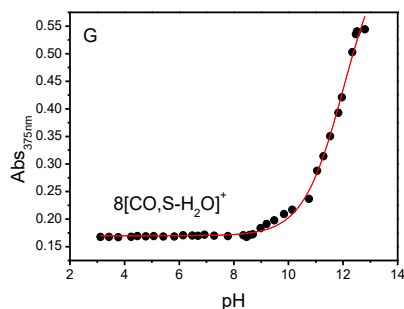
**Figure 6.** Lambert-Beer law in 2.5mM NaCaC buffer: A)  $1[\text{C,NH-H}_2\text{O}]^+$ , B)  $2[\text{C,NMe-H}_2\text{O}]^+$ , C)  $3[\text{N,NH-H}_2\text{O}]^{2+}$ , D)  $4[\text{N,NMe-H}_2\text{O}]^{2+}$ , E)  $5[\text{CNH}_2,\text{NH-H}_2\text{O}]^{2+}$ , F)  $6[\text{CNH}_2,\text{S-H}_2\text{O}]^{2+}$ , G)  $7[\text{CO,NH-H}_2\text{O}]^+$  and H)  $8[\text{CO,S-H}_2\text{O}]^+$ .

### *Acid-base behaviour*

To determine the acid-base behaviour, acid dissociation constants were calculated recording the absorbance spectra at different pH. Data pairs absorbance-pH are shown in Figure 7. Data were analysed according to the Henderson-Hasselbalch [146] equation for the complexes that exhibit one

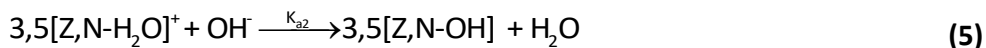
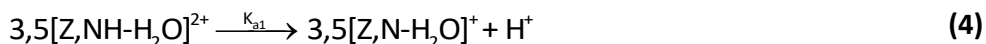
equilibria, **1**, **4**, **6**, **7** and **8**, and according to the Ang equation [147] for the complexes **3** and **5** that show two equilibria. Complex **2** does not exhibit acid-base equilibria. The obtained  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  values are shown in table 2. After the representation of *Abs versus pH* for  $3[N, NH-H_2O]^{2+}$  and  $5[CNH_2, NH-H_2O]^{2+}$  a maximum was obtained at  $pH = 7.2$  for the first complex (Figure 7B) and another maximum at  $pH \approx 9$  for the second one (Figure 7D), denoting in both cases two consecutive acid-base equilibria, the first one corresponding to deprotonation of -NH group according to equation 4 and the second one with formation of the hydroxide specie from the aqua-complex (equation 5).





**Figure 7.** Absorbance of studied complexes as a function of pH.

Regarding the values in Table 2, it can be deduced that the predominant species at pH = 7 are  $3[\text{N,N-H}_2\text{O}]^+$  and  $5[\text{CNH}_2,\text{NH-H}_2\text{O}]^{2+}$ . It is interesting emphasizing the acidity of NH and H<sub>2</sub>O groups in  $3[\text{N,NH-H}_2\text{O}]^{2+}$  and  $5[\text{CNH}_2,\text{NH-H}_2\text{O}]^{2+}$ , since they are more acidic in **3** than in **5**, showing the large influence of the groups in Z position. Moreover, the high value of pK<sub>a,2</sub> (11.30) in **5** justifies that no acid-base equilibrium has been observed in  $2[\text{C,NMe-H}_2\text{O}]^+$  and only pK<sub>a,1</sub> in  $1[\text{C,NH-H}_2\text{O}]^+$ .



Given that **4** and **6** in aqueous solution are aqua-complexes,  $4[\text{N,NMe-H}_2\text{O}]^{2+}$  and  $6[\text{CNH}_2,\text{S-H}_2\text{O}]^{2+}$ , respectively, the pK values agree with dissociation of H<sub>2</sub>O. **7** and **8** also have a unique constant; the equilibria of  $8[\text{CO,S-H}_2\text{O}]^+$  only have the possibility of H<sub>2</sub>O dissociation, so it can be concluded that this form is the specie in aqueous solution at experimental conditions. The constant observed for **7** matches with NH dissociation, pK<sub>a1</sub> = 9.06. To discern if the leaving group is H<sub>2</sub>O or DMSO, we focus on **3** and **5**, and noticed that both differ largely in their pK values. For example,  $5[\text{CNH}_2,\text{NH-H}_2\text{O}]^{2+}$  have a  $\Delta\text{pK} = \text{pK}_{a,2} - \text{pK}_{a,1} = 3.82$ , if this difference was the same between two pK of **7**, the result would be pK<sub>a2</sub> ≈ 13 for H<sub>2</sub>O dissociation, and this is impossible to determine in our experimental conditions. Now, we compare pK<sub>a2</sub> values of **5** with **6**, observing that substitution of S by NH in X position increases by 2.6 units; moving this feature to **7** and **8** we can accept that pK<sub>a2</sub> of  $7[\text{CO,NH-H}_2\text{O}]^+$  should be much higher than 12. Thus, we

cannot discard the formation of  $7[\text{CO,NH-H}_2\text{O}]^+$  and, just like the other compounds studied, **7** is an aqua-complex in aqueous solution.

The substitution of Cl by  $\text{H}_2\text{O}$  occurs directly for water soluble complexes **3**, **4**, **5**, and **6**, however, it occurs through DMSO-complexes for those which are not water soluble **1**, **2**, **7** and **8**. As observed in Table 2 for  $\text{pK}_{\text{a}1}$  values, the group  $\text{X} = \text{NH}$  is more acidic when  $\text{Z} = \text{N} > \text{CNH}_2 > \text{C} > \text{CO}$ . In a similar way, for  $\text{pK}_{\text{a}2}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ligand acidity decreases sharply when  $\text{Z} = \text{CNH}_2 > \text{CO} > \text{C}$ , while it increases when  $\text{Z} = \text{N}$ .

In addition, the replacement of  $\text{X} = \text{NH}$  in **3**, **5** and **7** by  $\text{X} = \text{Me}$  in **4**, and by  $\text{X} = \text{S}$  in **6** and **8** decreases the  $\text{H}_2\text{O}$  acidity. That is, X and Z play an essential role on the acid-base behaviour of different functional groups.

**Table 2.** Dissociation acidity constants,  $\text{pK}_{\text{a}1}$  and  $\text{pK}_{\text{a}2}$  of the studied of Iridium complexes.

Complex	$\text{pK}_{\text{a}1}$	$\text{pK}_{\text{a}2}$
<b>1</b> $[\text{C,NH-H}_2\text{O}]^+$	$8.44 \pm 0.03$	-
<b>2</b> $[\text{C,NMe-H}_2\text{O}]^+$	-	-
<b>3</b> $[\text{N,NH-H}_2\text{O}]^{2+}$	$6.08 \pm 0.04$	$8.44 \pm 0.06$
<b>4</b> $[\text{N,NMe-H}_2\text{O}]^{2+}$	-	$7.48 \pm 0.01$
<b>5</b> $[\text{CNH}_2,\text{NH-H}_2\text{O}]^{2+}$	$7.48 \pm 0.04$	$11.30 \pm 0.17$
<b>6</b> $[\text{CNH}_2,\text{S-H}_2\text{O}]^{2+}$	-	$8.70 \pm 0.04$
<b>7</b> $[\text{CO,NH-H}_2\text{O}]^+$	$9.06 \pm 0.06$	-
<b>8</b> $[\text{CO,S-H}_2\text{O}]^+$	-	$>12.0$

### IV.3.3. Cytotoxicity

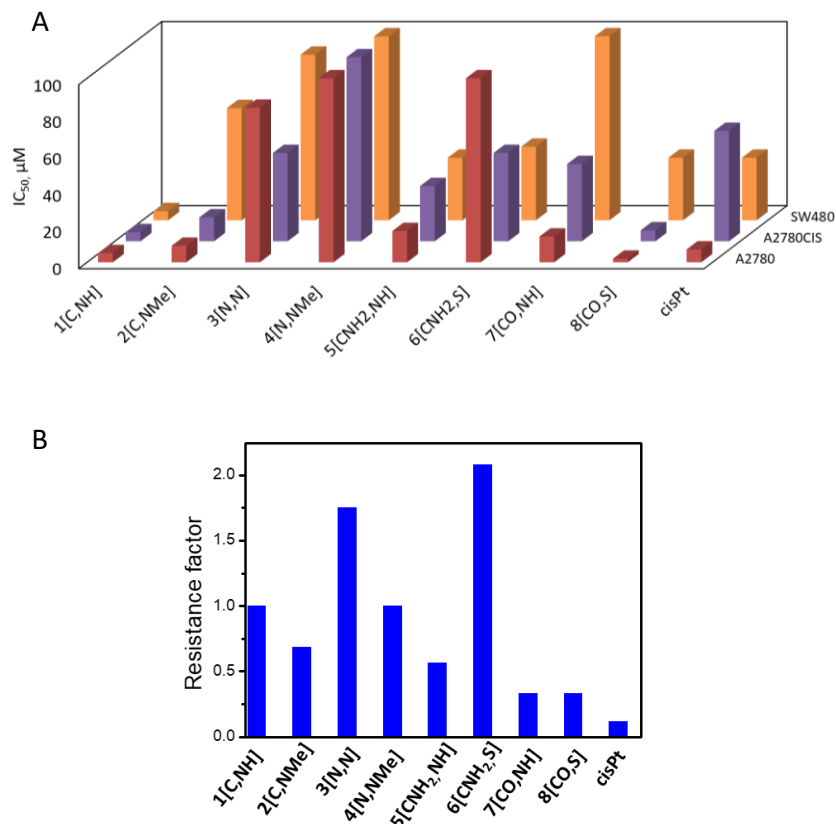
From now on, with the purpose of simplifying the notation, the complexes will be denoted with ordinal number follow the  $[\text{Z,X}]$  structure without  $\text{H}_2\text{O}$  group because it is common to all of them.

The cytotoxicity of all the compounds was evaluated after 48h of incubation time toward human cancer cell lines representative of epithelial ovarian carcinoma,

A2780 and A2780CIS (acquired resistance to cisplatin), and colon cancer, SW480. For testing by a criterion, the cytotoxicity of cisplatin was also evaluated. As depicted in Figure 8A, the replacement of X = NH in **1[C,NH]** and **3[N,NH]** by X = NMe in **2[C,NMe]** and **4[N,NMe]** respectively, leads to a remarkable decrease of the activity. Moreover, **6[CNH<sub>2</sub>,S]** is less cytotoxic than its Z = CNH<sub>2</sub> analogous **5[CNH<sub>2</sub>,NH]**. On the other hand, substitution of Z = C of **1[C,NH]**, by CO, **7[CO,NH]**, notably decrease the cytotoxicity. It can be observed that, although it depends on the cell line, overall less cytotoxic complex is **4[N,NMe]**, whereas the most cytotoxic are **1[C,NH]** and **8[CO,S]**.

**1[C,NH]** is more cytotoxic than cisplatin on the three studied cancer cell lines. The most cytotoxic complex on A2780 is **8[CO,S]** followed by **1[C,NH]** and **2[C,NMe]**, and all three are more toxic than cisplatin. On A2780CIS cell line, these three complexes also are the most toxic complexes in sequence **1[C,NH] > 8[CO,S] > 2[C,NMe]**. Lastly, only **1[C,NH]** is more toxic than cisplatin on SW480. On the other hand, all complexes display higher resistance factor than cisplatin being **3[N,N]** and **6[CNH<sub>2</sub>,S]** able to circumvent cisplatin acquired resistance (Figure 8B).

From the cytotoxic results we can conclude: the atom in Z position plays an essential role in the cytotoxicity, the complexes with Z = C and CO (**1[C,NH]**, **2[C,NMe]**, **5[CNH<sub>2</sub>,NH]** **7[CO,NH]** and **8[CO,S]**) are more cytotoxic than those with Z = N (**3[N,N]**, **4[N,NMe]**, and **6[CNH<sub>2</sub>,S]**), only with the exception of **7[CO,NH]** in SW480 cell line. The influence of X atom is relevant too, comparing **1[C,NH]** with **2[C,NMe]**, **3[N,N]** with **4[N,NMe]**, **5[CNH<sub>2</sub>,NH]** with **6[CNH<sub>2</sub>,S]** and **7[CO,NH]** with **8[CO,S]**, it is evident that N and NH groups are more cytotoxic than NMe. On the other hand, the substitution of NH by S increases the cytotoxic in **8[CO,S]** but not in **6[CNH<sub>2</sub>,S]**. We can conclude that Z and X can modulate the cytotoxicity of benzimidazole Iridium complexes, being **1[C,NH]** the most cytotoxic complex and **4[N,NMe]** the less one.



**Figure 8.** A) Cytotoxic activity in ovarian A2780, A2780CIS and colon SW480 cancer cells of the **1** to **8** complexes at 48h, expressed in  $\mu\text{M}$  as  $\text{IC}_{50}$  values. B) Ratio of the  $\text{IC}_{50}$  values of the treatments on A2780 respecting those on A2780CIS.

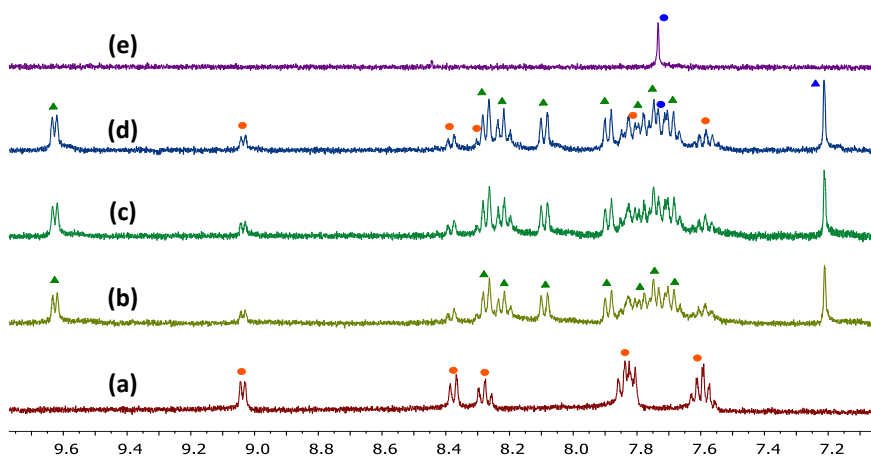
The mechanism of action of half-sandwich Ir(III) anticancer complexes may involve both an attack on DNA [131,148] and a perturbation of the redox status of cells [134]. In order to know if DNA is the target of these compounds, and clarify the differences in the cytotoxicity, reactivity against nucleobases, nucleotides, DNA and BSA, NMR, UV-Vis spectrometry, circular dichroism (CD), viscosity and DSC experiments, were carried out.

#### IV.3.4. Reactivity against Nucleobases and Nucleotides

The reactivity of selected complexes versus 9MeG nucleobase and 5'-GMP nucleotide was studied by  $^1\text{H}$  NMR at 25 °C and pH 7, or pH 5 in case of precipitation.

The qualitative interaction of complex **1[C,NH]** with 9MeG was followed by  $^1\text{H}$  NMR in DMSO- $d_6$  at 25 °C. A sample of **1[C,NH]** in DMSO- $d_6$  was left to evolve overnight, to assure the complete substitution of  $\text{Cl}^-$  by DMSO. 9MeG was then added and some spectra were recorded over time. However, no reaction seemed to occur, since the signals of both the complex and the 9MeG did not shift or change.

The reaction between 9MeG and aquo complex **3[N,NH-Cl]Cl** was studied by  $^1\text{H}$  NMR in  $\text{D}_2\text{O}$  at 25 °C (Figure 9). A 10 mM solution of **3[N,N]Cl** (250  $\mu\text{L}$ ) was prepared in  $\text{D}_2\text{O}$  and the pH adjusted to 5, as a solid precipitated at pH 7. A spectrum was recorded and then, a 10 mM solution of 9MeG (250  $\mu\text{L}$ ) at pH 7 was added. The sample contained a final concentration 5 mM of both the complex and the nucleobase (1:1). Various spectra were recorded during 30 minutes.



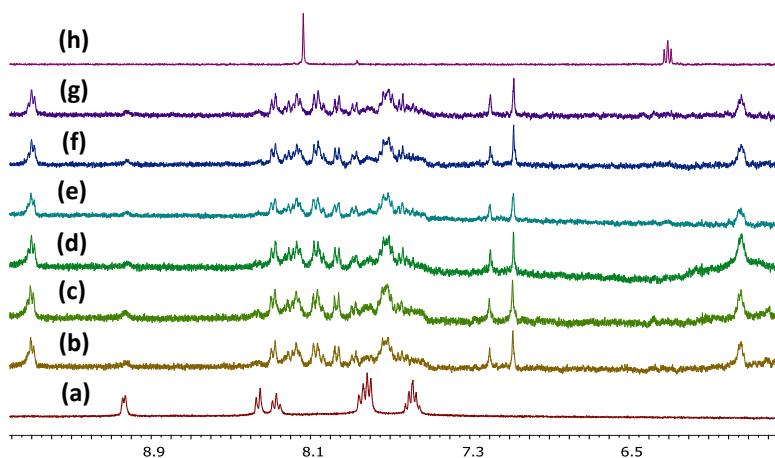
**Figure 9.** Evolution of the aromatic region in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **3[N,NH]** with 9MeG in  $\text{D}_2\text{O}$  at 25 °C. The orange spots (•) refer to the complex **3[N,NH]**, the blue ones (•) to the free 9MeG, the green triangles (▲) refer to the new product **3[N,N-G]<sup>+</sup>** and the blue triangle (▲) to the coordinated 9MeG. (a) Spectrum of the complex at  $t=0$ , (b) at  $t=5$  min, (c) at  $t=10$  min, (d) at  $t=30$  min and (e) spectrum of free 9MeG at pH 7.



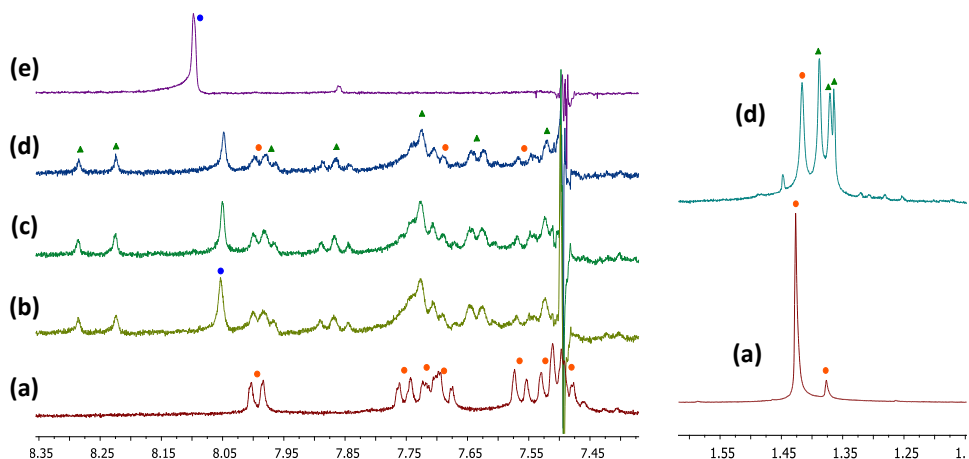
Since the signal H8 of the 9MeG shifts 0.52 ppm and a set of new peaks for the ligand appear (Figure 9), the coordination of 9MeG to **3[N,NH]** clearly occurs and probably through N7. Therefore, we propose that the H<sub>2</sub>O ligand is directly replaced with 9MeG on **3[N,NH]** to give **3[N,NH-G]<sup>+</sup>**.

Regarding the nucleotide/complexes interaction, the reaction between 5'-GMP and **3[N,NH]** or **5[CNH<sub>2</sub>,NH]** was studied by <sup>1</sup>H NMR in D<sub>2</sub>O at 25 °C. At pH = 5 (as a solid precipitated at pH = 7) 10 mM solution of **3[N,NH]Cl** was prepared and to pH = 6.5 for **5[CNH<sub>2</sub>,NH]Cl**. After recording spectra for the complexes, a 10 mM solution of 5'-GMP (250 μL) at pH = 7 for **3[N,NH]** and pH = 6.5 for **5[CNH<sub>2</sub>,NH]** was added. The samples contained a final concentration 5 mM of both the complex and the nucleotide (1:1).

The reaction evolved really fast for **3[N,NH]** and it was almost finished in 5 minutes. The spectra showed two different sets of signals, since two singlets appeared for the H8 proton of the 5'-GMP (see Figure 10), as well as two singlets for the Cp\*.

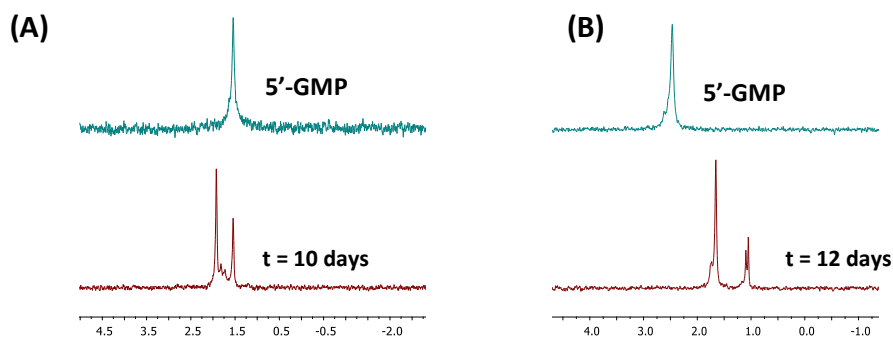


**Figure 10.** Evolution of the aromatic region of **3[N,NH]** with 5'-GMP in D<sub>2</sub>O at 25 °C. (a) Spectrum at t=0, (b) at t=5 min, (c) at t=25 min, (d) at t=1 h, (e) at t=4 h, (f) at t=22 h and (g) at t= 48 h. (h) Spectrum of 5'-GMP.



**Figure 11.** Evolution of the aromatic and aliphatic regions of  $5[\text{NH}_2,\text{NH}]\text{Cl}$  with  $5'$ -GMP in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . The orange spots illustrate the complex  $5[\text{CNH}_2,\text{NH}]^+$ , the blue ones the free  $5'$ -GMP and the green triangles refer to the new product  $5[\text{CNH}_2,\text{NH-GMP}]^{2+}$ . (a) Spectrum at  $t=0$ , (b) at  $t=5\text{ min}$ , (c) at  $t=20\text{ min}$ , (d) at  $t=1\text{ h}$ . (e) Spectrum of  $5'$ -GMP.

Regarding the reaction with  $5[\text{CNH}_2,\text{NH}]$ , the evolution of the spectra displayed apparently two sets of peaks (apart from those for the initial compound), although the aliphatic region showed a complex signal related to even four different products. However, one of them likely corresponds to the initial complex (Figure 11).



**Figure 12.**  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra for the reaction of  $5'$ -GMP with complexes  $3[\text{N},\text{NH}]$  (A) and  $5[\text{CNH}_2,\text{NH}]$  (B) recorded after 10 and 12 days, respectively.

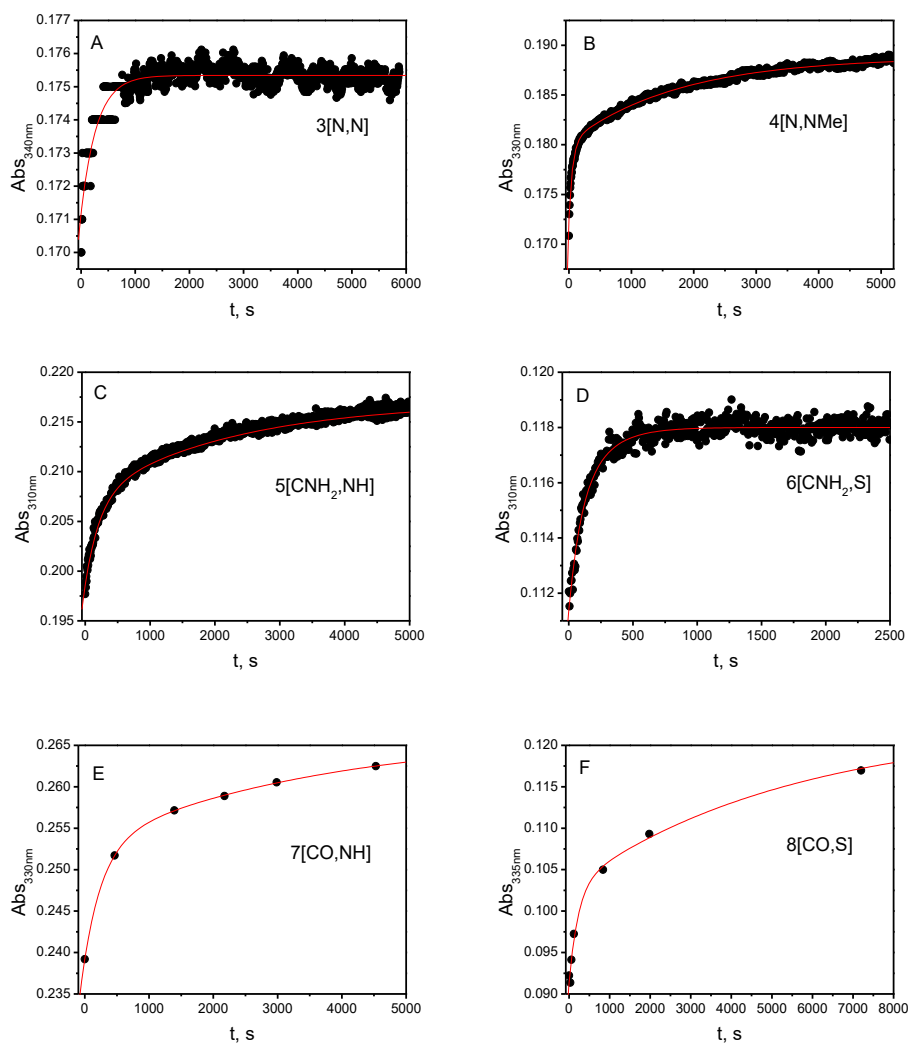
The  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR showed two intense peaks and two weaker signals among them (Figure 12A), being the most shielded the free 5'-GMP. In light of the previous results with 9MeG, and both the  $^1\text{H}$  and the  $^{31}\text{P}$  NMR experiments, we can conclude that the coordination of 5'-GMP to the metallic fragment of **3[N,NH]** occurs initially through the phosphate and then, through the N7 of the nucleobases.

#### IV.3.5. Interaction with DNA

From this point on all experiments were carried out, except the text mentions other conditions, at 25 °C, I = 2.5 mM and pH between 6.0 and 7.1.

##### *Kinetics*

The binding of some metal centres of aqua complexes to N7 of DNA are faster than those of the chloride complexes [149], and it is established that aqua-complexes are more reactive than their chloride analogous [150], hence, all complexes were incubated overnight until aquation process take place. No water-soluble compounds were firstly dissolved in DMSO and then in water.



**Figure 13.** Biexponential kinetic curves of DNA with A) **3[N,N]**  $C_D = 1.03 \times 10^{-5}$  M, B) **4[N,NMe]**  $C_D = 9.44 \times 10^{-6}$  M, C) **5[CNH<sub>2</sub>,NH]**  $C_D = 1.13 \times 10^{-5}$  M, D) **6[CNH<sub>2</sub>,S]**  $C_D = 1.22 \times 10^{-5}$  M, E) **7[CO,NH]**  $C_D = 2.36 \times 10^{-5}$  M, F) **8[CO,S]**  $C_D = 9.40 \times 10^{-6}$  M.  $C_P/C_D = 20$ .

In agreement with NMR results on nucleotides and nucleobases, covalent binding between the Iridium metal centre and DNA residues was observed by UV-Vis spectroscopy in **3[N,N]**, **4[N,NMe]**, **5[CNH<sub>2</sub>,NH]**, **6[CNH<sub>2</sub>,S]**, **7[CO,NH]** and **8[CO,S]** (Figure 13), while **1[C,NH]** and **2[C,NMe]** do not form a covalent binding.

From the fitting of absorbance-time values to biexponential analysis, two rate constants were obtained. The fast reaction corresponds to the covalent binding, being  $1/\tau$  the time constant, while the slow reaction does not follow any pattern and it is associated to DNA/Ir-complex rearrangements, so it was disregarded.

The formation of covalent DNA/Ir-complex bond, can be represented according to the following reaction:



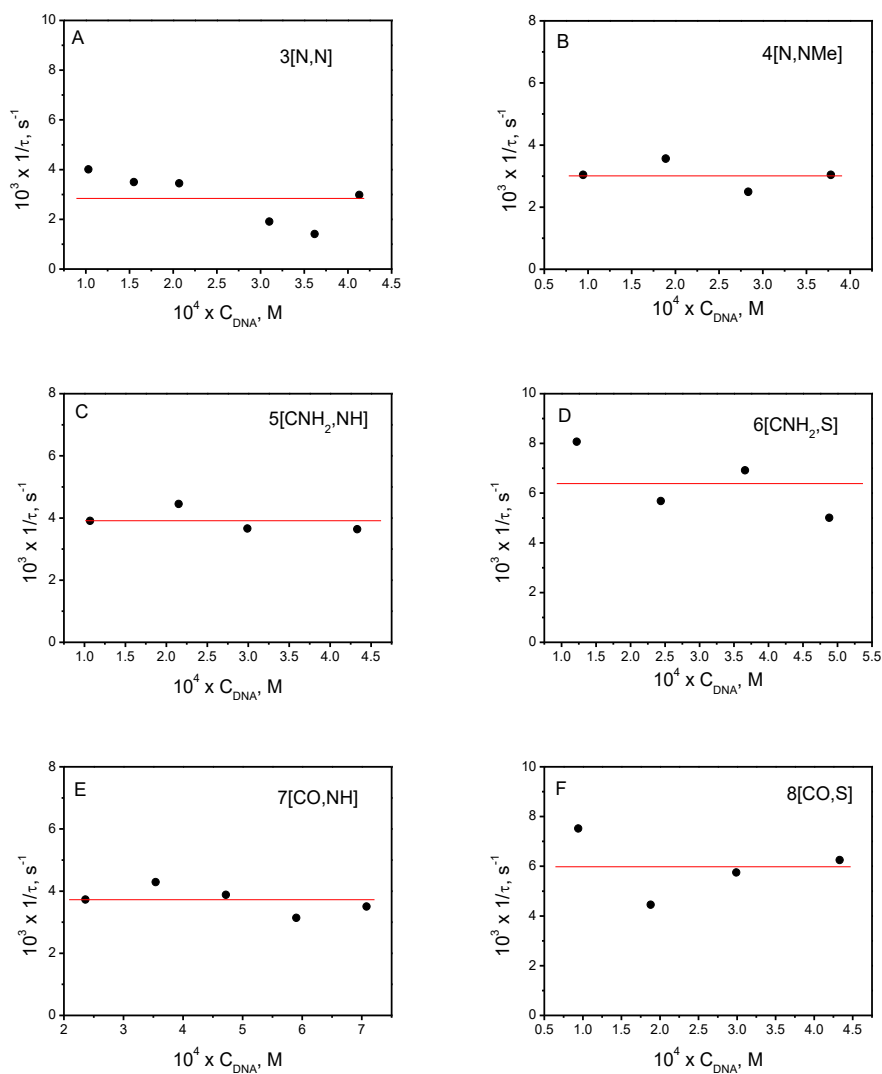
where P represents the polynucleotide DNA, D the metal complexes, and PD stands for the drug/DNA complex. Henceforth,  $C_D$  and  $C_P$  stand for the analytical drug and DNA concentrations, respectively.

It was observed that for each Ir-complex, the  $1/\tau$  values remain essentially constant when  $C_P$  is raised (see Figure 14). This feature proves that the reaction is monomolecular, therefore PD on equation 6 cannot be obtained in a unique step, because in that case the reaction would be bimolecular and  $1/\tau$  would be  $C_P$  dependent. These results can be interpreted assuming the mechanism represented in equation 7: (i) the reaction between P and D gives as a result  $PD_i$ , being  $K_1$  the equilibrium constant of this step, (ii) the  $PD_i$  complex converts into PD in a second irreversible and unimolecular step with rate constant,  $k_c$ , being the covalent rate-determining constant.



On this basis, the  $1/\tau$  versus  $C_P$  data-pairs should adjust to equation 8.

$$1/\tau = K_1 \times k_c C_P / (1 + K_1 C_P) \quad (8)$$



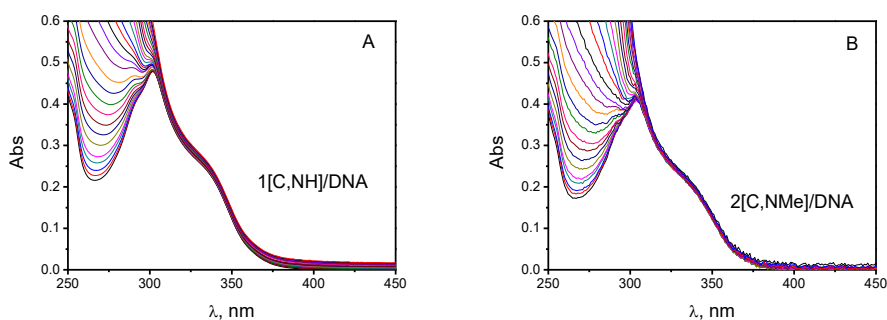
**Figure 14.**  $1/\tau$  versus  $C_{DNA}$  plot corresponding to formation of the DNA covalent binding with: A) **3[N,N]**  $C_D = 1.03 \times 10^{-5}$  M, B) **4[N,NMe]**  $C_D = 9.44 \times 10^{-6}$  M, C) **5[CNH<sub>2</sub>,NH]**  $C_D = 1.13 \times 10^{-5}$  M, D) **6[CNH<sub>2</sub>,S]**  $C_D = 1.22 \times 10^{-5}$  M, E) **7[CO,NH]**  $C_D = 2.36 \times 10^{-5}$  M, F) **8[CO,S]**  $C_D = 9.40 \times 10^{-6}$  M.

Figure 14 denotes that the covalent rate constant is not dependent on  $C_p$ , that is,  $1/\tau = k_c =$  rate constant, since  $K_1 \times C_p \gg 1$ . It follows that the first step is the formation equilibrium of the non-covalent  $PD_i$  complex, followed by the covalent complex  $PD$ . Formation of the bifunctional complex will be deduced from  $CD$ ,

viscosity and melting experiments.  $k_c$  values are shown in table 3. They follow the sequence **4[N,NMe] > 3[N,N] > 6[CNH<sub>2</sub>,S] ~ 8[CO,S] > 5[CNH<sub>2</sub>,NH] ~ 7[CO,NH]**, that is, covalent binding formation is faster when Z = N than Z = CO or CNH<sub>2</sub>. It seems clear that Z = C decreases the reactivity up to the point of being absent when C binds directly to the metal centre, like **1[C,NH]** and **2[C,NMe]**. As the **1** and **2** complexes do not form covalent binding, an absorbance titration was performed (Figure 15) to know if a noncovalent interaction could be at work. As a result, we can rule out any type of DNA binding with these two complexes.

**Table 3.** Rate constants for the covalent binding between the complexes and DNA.

Complex	$k_c \times 10^3 \text{ s}^{-1}$
<b>3[N,NH]</b>	$20 \pm 2$
<b>4[N,NMe]</b>	$16 \pm 1$
<b>5[CNH<sub>2</sub>,NH]</b>	$3.9 \pm 0.1$
<b>6[CNH<sub>2</sub>,S]</b>	$6.4 \pm 0.2$
<b>7[CO,NH]</b>	$3.7 \pm 0.1$
<b>8[CO,S]</b>	$6.0 \pm 0.2$



**Figure 15.** Absorbance titration for the A) **1[C,NH]/DNA** and B) **2[C,NMe]/DNA** systems.

### *Circular Dichroism*

Circular dichroism shows how each complex can modify the DNA structure in a different way (Figure 16). Spectrograms were recorded after overnight incubation to allow the covalent Ir-complex/DNA bond formation. The evolution of CD bands gives a final spectrum showing important variations. This is a surprising behaviour considering the slight differences in the structure of the complexes.

New induced circular dichroism (ICD) bands, positives and negatives, demonstrate the formation of the **Ir-complex**/DNA adducts [151]. One more time, it is confirmed that **1[C,NH]** does not bind to DNA, and the observed variations in **2[C,NMe]** are insignificant, which might be compatible with an external binding [152].

The prominent variation in the DNA spectrum is caused by the covalent complexes **3[N,N]**, **4[N,NMe]**, **5[CNH<sub>2</sub>,NH]**, **6[CNH<sub>2</sub>,S]**, **7[CO,NH]** and **8[CO,S]**. Great variations in CD spectrograms, as shown in Figure 16, are compatible with intercalation [153], therefore, with bifunctional intercalative-covalent complexes.

In **3[N,N]**, **5[CNH<sub>2</sub>,NH]** and **6[CNH<sub>2</sub>,S]** the intensity of the characteristic negative band of DNA at  $\lambda = 245\text{nm}$  decreased as the  $C_D/C_P$  ratio was raised, whereas the intensity of the positive band at  $\lambda = 275\text{nm}$  not only decreased but also underwent a bathochromic shift of 10nm in **3[N,N]** and 15nm in **5[CNH<sub>2</sub>,NH]**. Even in the case of **6[CNH<sub>2</sub>,S]** two ICD bands were emerged (Figure 16F). Spectrograms of **7[CO,NH]** and **8[CO,S]** display -S group causes more variation in the DNA structure than -NH.

The lack of a well-defined isodichroic point in the visible CD spectra of **3**, **4**, **5**, **6**, **7** and **8**/DNA systems suggests that more than a single complex could be formed during titration. Binding isotherms at a selected wavelength (Figure 16, insets) display different sections representative of two or more products depending on  $C_D/C_P$  ratio. In all cases there is a maximum, except in **4[N,NMe]** where there is a minimum and in **8[CO,S]** where the isotherm does not reach the plateau.

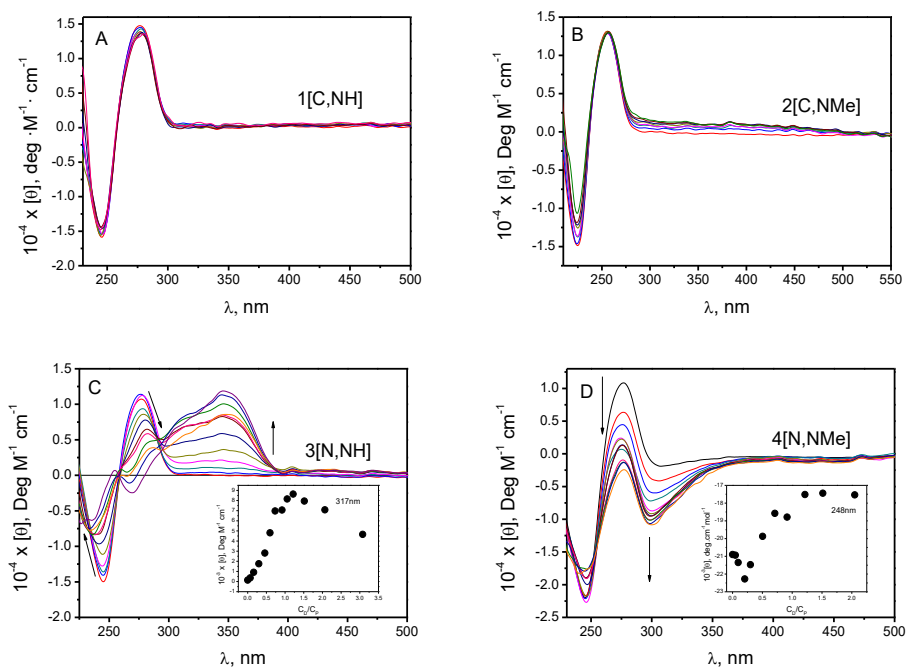
Hence, the variation of  $[\theta]$  with  $C_D/C_P$  reveals that two different complexes get formed, the first one is covalent-intercalated, PD, at low  $C_D/C_P$  ratios, and the second, PD<sub>II</sub>, when  $C_D/C_P$  increases. In this way, the suggested mechanism in

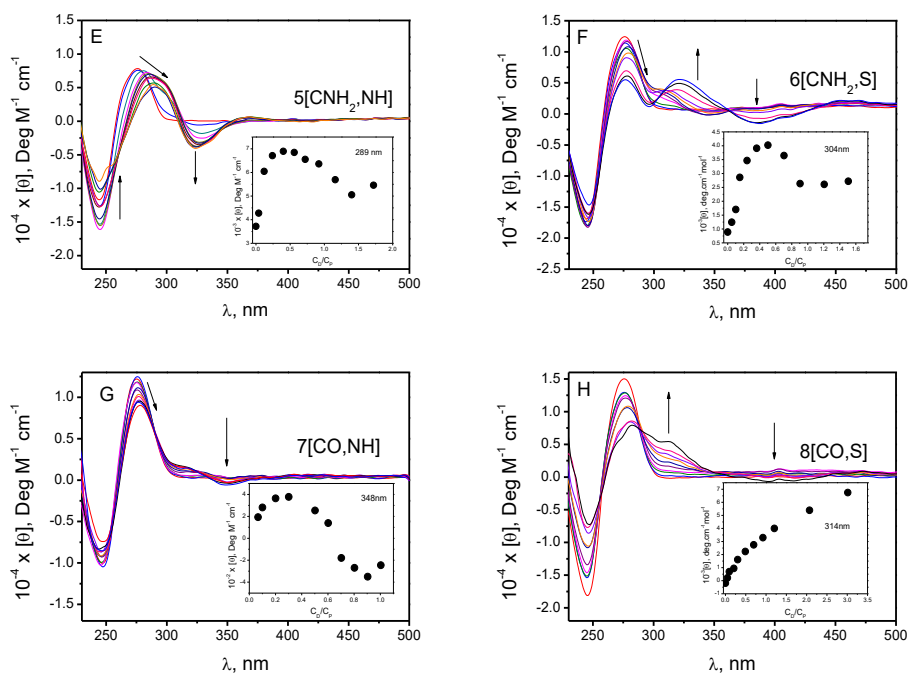


equation 7 can be completed according to equation 9. Actually, site occupation by Ir-complex first leads to formation of the covalent-intercalated complex PD and, once all intercalation sites are occupied, another class of sites (off-slot) commence to be occupied to give PD<sub>II</sub>.



The elucidation of the nature of PD<sub>II</sub> is rather troublesome. The results of the present investigation show that PD<sub>II</sub> contains complex molecules located out of the DNA slots. These “off-slot” molecules can interact with the polymer by external stacking or groove binding. The CD spectra, viscosity and melting experiments trend highlight in the best way the evolution of the binding modes.



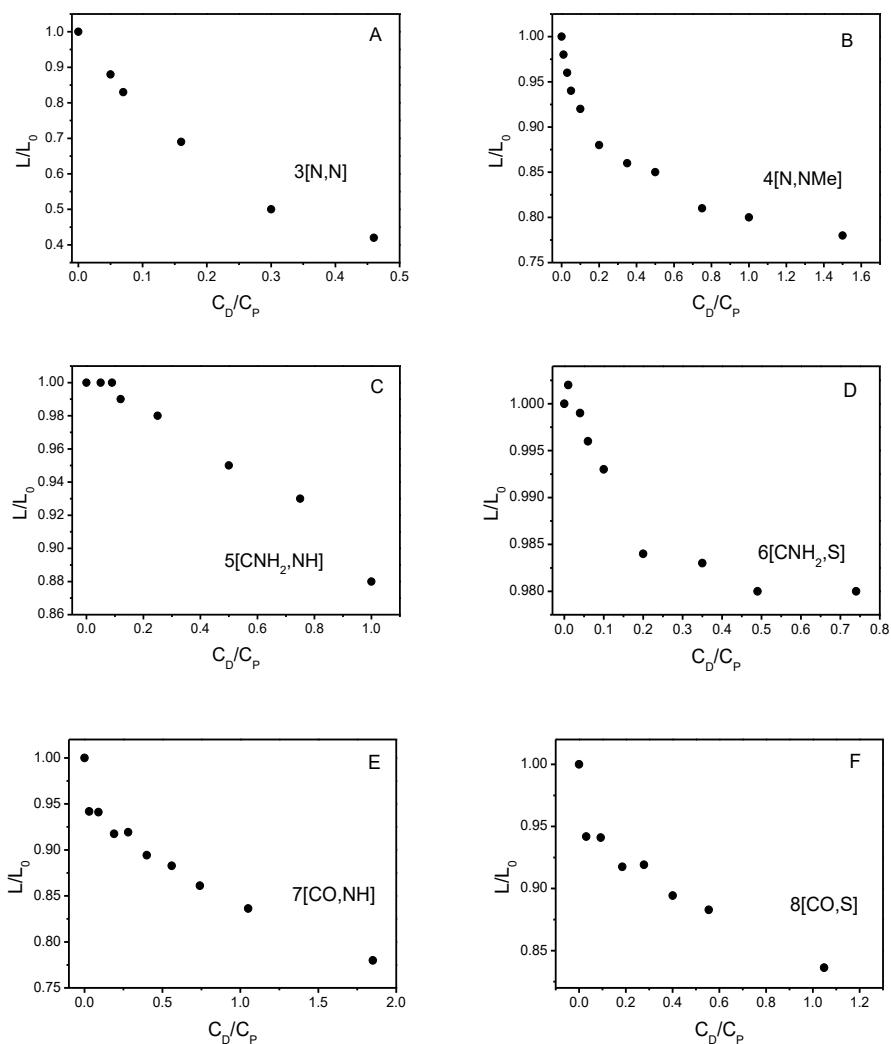


**Figure 16.** Circular dichroism of DNA with A) **1[C,NH]**, B) **2[C,NMe]**, C) **3[N,NH]**, D) **4[N,NMe]**, E) **5[CNH<sub>2</sub>,NH]**, F) **6[CNH<sub>2</sub>,S]**, G) **7[CO,NH]**, H) **8[CO,S]**.  
 $C_P = 6 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

### Viscosity

Like with the CD experiments, viscosities were measured for each  $C_D/C_P$  ratio after overnight incubation time in order to the covalent Ir-complex/DNA bond were formed. In every experiment, a different  $C_D/C_P$  ratio is reached because the solubility. The change of the contour length of DNA in presence of the complexes provide relevant information about the binding. It is well known that the intercalation process increases the viscosity [72], while the covalent binding decreases slightly it [154]. Any modification of DNA viscosity was observed with **1[C,NH]** and **2[C,NMe]**, supporting the absence of interaction with DNA. In Figure 17 we can observed that the reduction is prominent, even at low  $C_D/C_P$  ratios, which is agreeable with bifunctional complexes [155]. In **3[N,N]**/DNA, **4[N,NMe]**/DNA, **5[CNH<sub>2</sub>,NH]**/DNA, **6[CNH<sub>2</sub>,S]**/DNA, **7[CO,NH]**/DNA and **8[CO,S]**/DNA, relative DNA length decreases, in this way, firstly the intercalated complex is formed, afterwards, the DNA folds up being able to form a covalent

bond. In the case of **3[N,N]** the viscosity is drastically declined (Figure 17A), considering that at  $C_D/C_P = 0.3$  the viscosity is reduced by a half. Consequently, it is expected that **3[N,N]** would be high cytotoxic due to its extremely capacity to modify DNA structure (see also Figure 16C), nevertheless its toxicity is so reduced.

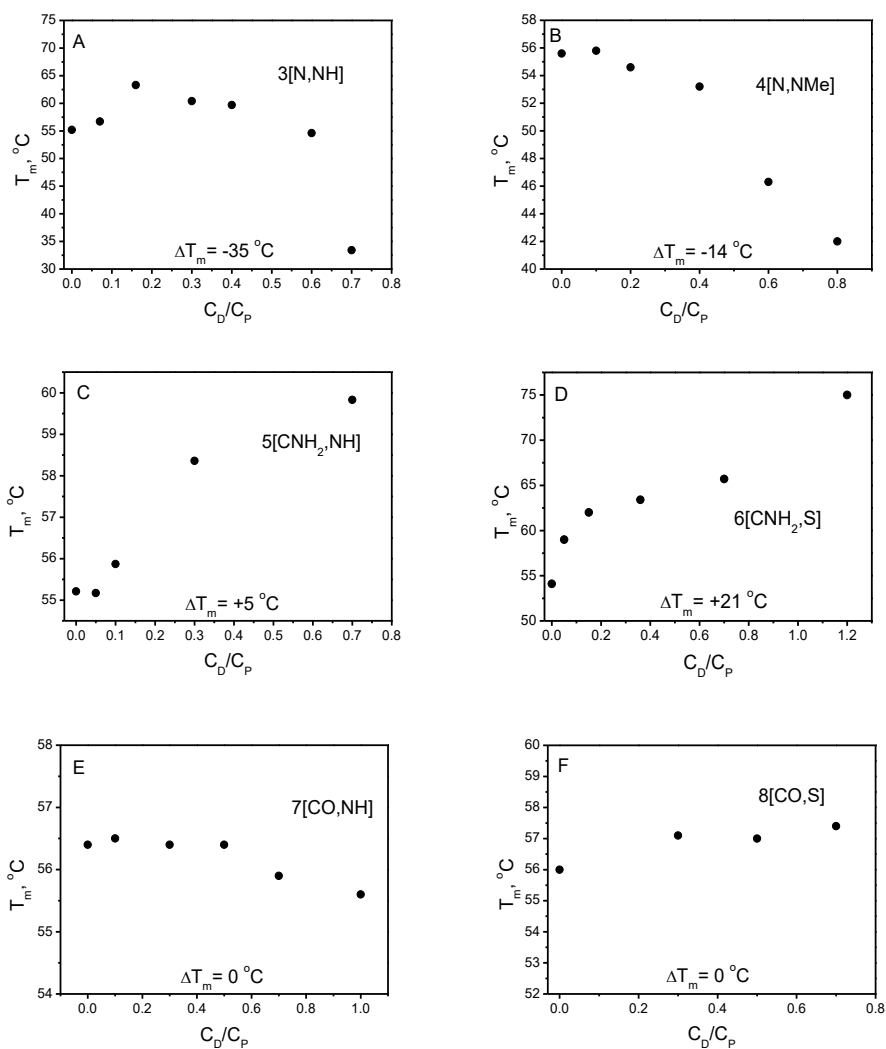


**Figure 17.** Relative elongation of A) **3[N,N]**, B) **4[N,NMe]**, C) **5[CNH<sub>2</sub>,NH]**, D) **6[CNH<sub>2</sub>,S]**, E) **7[CO,NH]**, F) **8[CO,S]** with DNA as a function of the  $C_D/C_P$  ratio.  $C_P^0 = 3 \times 10^{-4}$  M.

### *Melting Temperature*

An evidence for intercalation was also obtained from the DNA melting studies. Intercalation of molecules into the double helix is known to increase the helix melting temperature ( $T_m$ ) which means a stabilization of it, on the contrary, the decrease of  $T_m$  indicates destabilization [99]. The variation of  $T_m$  in presence of the complexes at different  $C_D/C_P$  ratios with incubated solutions are shown in Figure 18. No variations were observed in **1[C,NH]** and **2[C,NMe]** confirming no DNA interaction. According to CD and viscosity, the complex **3[N,N]** shows high interaction with DNA:  $\Delta T_m = +10^\circ\text{C}$  until  $C_D/C_P = 0.2$  and  $\Delta T_m = -35^\circ\text{C}$  from  $C_D/C_P = 0.2$  to  $C_D/C_P = 0.7$ . However, **5[CNH<sub>2</sub>,NH]** and **6[CNH<sub>2</sub>,S]** increase melting temperature supporting the intercalation as the prevailing mode of binding of these two complexes. It is remarkably that **6[CNH<sub>2</sub>,S]** provokes  $21^\circ\text{C}$  stabilization. The  $T_m$  differences in **3[N,N]**, **4[N,NMe]**, **5[CNH<sub>2</sub>,NH]** and **6[CNH<sub>2</sub>,S]** point out the formation of more than one complex depending on  $C_D/C_P$  ratio, as we saw in CD and viscosity too. But the trend of **3[N,N]** and **4[N,NMe]** is opposite to **5[CNH<sub>2</sub>,NH]** and **6[CNH<sub>2</sub>,S]** ones. Finally, the variation of **7[CO,NH]** and **8[CO,S]** is much less. This behaviour is, one more time, surprisingly, and it proves that small changes in the composition of benzimidazole Iridium complexes affect strongly DNA structure and stability.

We can gather that Z = CNH<sub>2</sub> group stabilizes DNA structure, -CO group does not modify  $T_m$ , and Z = N depends on the  $C_D/C_P$  ratio since  $T_m$  of **3[N,N]** increases for low ratios and  $T_m$  of **4[N,NMe]** remains unchanged, whereas  $T_m$  decreases at high  $C_D/C_P$  ratio in both complexes (Figures 18 A and B).



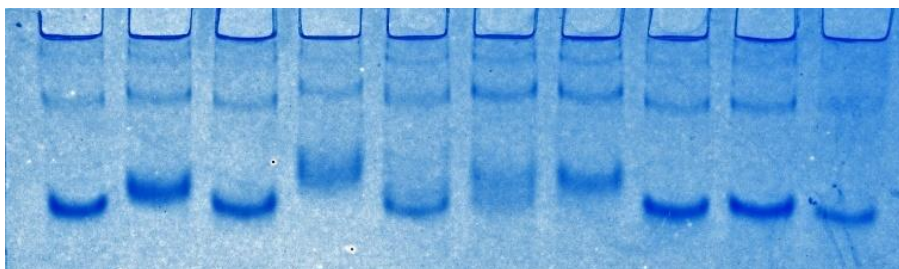
**Figure 18.** Melting temperature of the systems A) **3[N,N]**/DNA, B) **4[N,NMe]**/DNA, C) **5[CNH<sub>2</sub>,NH]**/DNA, D) **6[CNH<sub>2</sub>,S]**/DNA, E) **7[CO,NH]**/DNA, and F) **8[CO,S]**/DNA.

The set of experiments brings to light that **3[N,N]**, **4[N,NMe]**, **5[CNH<sub>2</sub>,NH]**, **6[CNH<sub>2</sub>,S]**, **7[CO,NH]** and **8[CO,S]** interact with DNA and depending on the complex structure and  $C_D/C_P$  they result in different adducts with DNA. However, there is no clear relation between structure and cytotoxicity or DNA binding. It is

remarkable that complexes **1[C,NH]** and **2[C,NMe]** are high cytotoxic but do not interact with DNA.

#### IV.3.6. Interaction with BSA

In a previous work we demonstrated that cytotoxicity of platinum complexes depended on their sequestration by seroalbumin [156]: at higher interaction with BSA, lower amount of complex reach the cell. Native acrylamide gel electrophoresis (Figure 19) exhibit the interaction of the complexes with BSA, representative example of proteins presents in blood plasma and in cell culture media. It is shown that **1[C,NH]**, **2[C,NMe]** and **5[CNH<sub>2</sub>,NH]** do not interact with the protein, so BSA is not a hindrance to enter in the cells. On the other hand, the interaction of **3[N,N]**, **4[N,NMe]** and **6[CNH<sub>2</sub>,S]** with BSA shows that the complexes are sequestered by the protein, which is a possible explanation of their low cytotoxicity in spite of the good results with DNA. Surprisingly, **8[CO,S]** interacts with BSA but also with DNA. Therefore, the interaction with BSA is not enough to justify the differences observed in the cytotoxicity of all studied complexes.



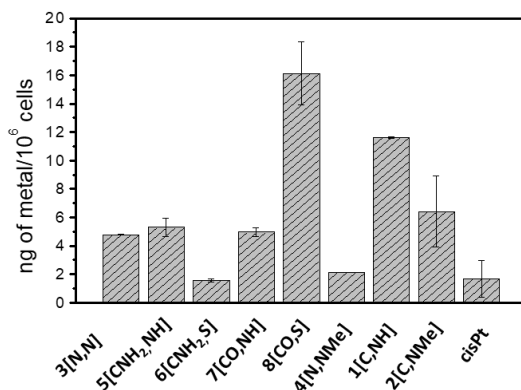
[1] [3] [5] [4] [6] [8] [7] [2] BSA BSA+DMSO

**Figure 19.** Native acrylamide gel electrophoresis of BSA with Iridium complexes,  $C_D/C_P = 10$ ,  $C_P = 3 \mu\text{M}$ .

#### IV.3.7. Cellular accumulation

DNA and BSA studies are not enough to support the differences in cytotoxicity of the complexes, as a result, metal accumulation was studied. Cellular concentrations were determined by ICP-MS after 24 h of exposure to the

complexes at 2  $\mu\text{M}$ . All of them, except **6**[CNH<sub>2</sub>,S], display higher levels of accumulation than cisplatin, being the declining order: **8**[CO,S] > **1**[C,NH] > **2**[C,NMe] > **5**[CNH<sub>2</sub>,NH] > **7**[CO,NH] > **3**[N,N] > **4**[N,NMe] > cisPt > **6**[CNH<sub>2</sub>,S]. Figure 20 shows cellular uptake and we can conclude that the most cytotoxic complexes are the most accumulated ones. Given that **1**[C,NH] and **2**[C,NMe] do not bind with DNA and with the purpose of explaining the high cytotoxicity of **1**[C,NH] in all studied cell lines, some in vitro and in vivo studies are carrying out.



**Figure 20.** Metal accumulation in SW480 cells at 24h with 2 $\mu\text{M}$  of the complexes.

#### IV.4. CONCLUSIONS

The synthesis, structural characterization, solution behaviour, cytotoxic activity, interaction with DNA, interaction with a model protein and the accumulation in cells were successfully investigated for a series of half sandwich benzimidazole Iridium complexes. The synthesised compounds show markedly different behaviour in solution, as well as different binding mode with DNA and BSA.

On the one hand, complexes with Z = N are water soluble. All complexes exchange their chloride leaving group, by water, those that are water soluble, or by DMSO, the DMSO soluble complexes. The latter ones, after the replacement of the DMSO molecule in a first step, they replace it by H<sub>2</sub>O.

On the other hand, most cytotoxic complexes are **1**[C,NH], **2**[C,NMe] and **8**[CO,S]. However, **1**[C,NH] and **2**[C,NMe] do not bind with DNA. **3**[N,NH]

strongly modify DNA structure but their cytotoxicity is low. **5[CNH<sub>2</sub>,NH]** and **6[CNH<sub>2</sub>,S]** increase melting temperature, whereas **4[N,NMe]** destabilizes DNA structure and **7[CO,NH]** and **8[CO,S]** do not modify DNA stability.

**3[N,NH]**, **4[N,NMe]** and **6[CNH<sub>2</sub>,S]** interact with BSA, being this fact the block to enter in the cell, corroborated by ICP-MS, and correlating well with their low cytotoxicity. **7[CO,NH]** and **8[CO,S]** also interact with BSA whereas **1[C,NH]**, **2[C,NMe]** and **5[CNH<sub>2</sub>,NH]** do not do it. **1[C,NH]**, **2[C,NMe]** and **8[CO,S]** are the most accumulated complexes in cells, agreeing well with the highest cytotoxicity.

The set of experiments conducted disclosed the following structure-activity relationship:

Complexes of the family studied with **Z = N** are water soluble whereas **Z = C** and **Z = CO** does not. **Z = CNH<sub>2</sub>** favours the chloride substitution. **Z = C** own the best cytotoxicity but do not interact with DNA nor BSA. However, complexes with **Z = CO** do not variate DNA melting temperature and can interact with BSA. Those with **X = NMe** have lower toxicity than its analogous **X = NH**, it confers quick DNA interactions and destabilizes DNA structure. Finally, **X = S** group slow down DNA interactions.

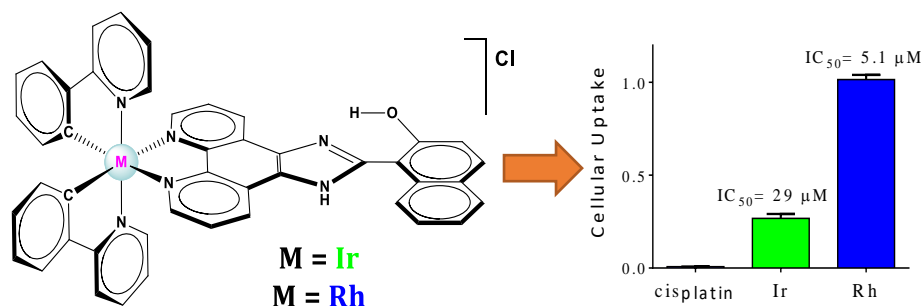
In light of the evidence, the small differences in the structure of the benzimidazole half-sandwich complexes, produce important changes in their properties and behaviour.



**V. Biological activity of a  
Naphthyl-Imidazo  
Phenanthroline  
(HNAIP) ligand and its  
[Ir(ppy)<sub>2</sub>(HNAIP)]Cl and  
Rh(ppy)<sub>2</sub>(HNAIP)]Cl  
complexes**



## V.1. RESUMEN



El ligando 2-(hydroxy-1-naphtyl)imidazo-[4,5-f][1,10]phenantroline, abreviadamente HNAIP, y sus complejos con centro metálico de Iridio y Rodio,  $([\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]\text{Cl})$  y  $([\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]\text{Cl})$ , presentan una citotoxicidad mayor que el cisplatino en la línea celular de adenocarcinoma de colon (SW480) siguiendo el orden  $\text{HNAIP} \approx [\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})] \gg [\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]$ . Así que el objetivo del trabajo es estudiar la interacción de los tres con ADN, BSA, GSH y NADH con la intención de explicar las diferencias observadas en la citotoxicidad.

En el estudio con ADN, el diroísmo circular muestra que los complejos modifican la estructura en mayor grado que el ligando, comportamiento compatible con la intercalación. Sin embargo, esta suposición se descarta tras los experimentos de estabilización térmica, los cuales muestran que la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) del ADN no varía en presencia de ninguna de las tres moléculas. Por otro lado, la viscosidad revela que el ligando disminuye la elongación del ADN, lo que es compatible con un enlace al surco. Para  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  y  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  el modo de enlace más probable es externo de carácter electrostático, pues tampoco modifican la viscosidad del ADN. La interacción con ADN, por tanto, no parece ser la clave para su citotoxicidad. Por ello, se estudió la interacción con BSA, GSH y NADH, encontrando que únicamente existe unión con GSH pero aún así no se explican las diferencias en la citotoxicidad.

Los complejos metálicos se han visualizado en el citoplasma de SW480 con tan solo 1 hora de incubación, lo que indica que estos complejos son internalizados por dichas células. Esta internalización celular se cuantificó por ICP-MS revelando que el complejo de Rodio se acumula cinco veces más que su análogo de Iridio

debido a su diferente hidrofobicidad ( $\log P$ ), correlacionándose perfectamente con la citotoxicidad y quedando evidente que la capacidad para entrar en las células es la causa determinante de las diferentes toxicidades observadas.

## V.2. INTRODUCTION

The intense work on metal complexes aimed at solving the shortcomings of current cisplatin-like drugs and similar chemotherapeutic compounds are key to current medicinal chemistry [122,157,158]. Recent relevant studies are based on testing transition metal complexes other than Platinum(II). As a notable instance of second generation metal-based anticancer agents, Ru(II) metal complexes such as NAMI-A or KP1019 have reached clinical trial steps [159–161]. To date, other less explored transition metal ions such as gold, Rhodium, Iridium, iron, palladium, silver, antimony, bismuth, copper and tin have aroused increasing attention [157,162–164]. Until very recently, Rh(III) and particularly Ir(III) complexes, were generally regarded as unsuitable candidates as anticancer agents owing to the typical kinetic inertness of their transition metal centres. Nowadays, due to their readily tuneable properties (attainable by changing the ancillary ligand), high water solubility and relative accessibility, Ir(III) and Rh(III) complexes have become promising alternatives to platinum and Ruthenium complexes [115,165–167]. The influence of the ligands in the biological activity of metal complexes is highly relevant; in some cases the ligand is not cytotoxic, whereas the metal complex is [165,168]. In other cases, the cytotoxicity is provided by the ligand, because the free ligand is toxic by itself [169]. However, very often the toxicity of the free ligands is not studied in literature [167,170,171] and the cytotoxicity is attributed to the complex. For this reason, it is compulsory to study the effect of the ligand on the cytotoxicity of the metal complex; this comparison should be routine work.

Half-sandwich arene Ir(III) and Rh(III) metal complexes with diimine ligands display potent anticancer properties related to DNA intercalation [167,172,173] or perturbation of the cellular redox state [170,174,175].

Cyclometallated Ir(III) and Rh(III) complexes have been synthesized as potential diagnostic agents. Octahedral Iridium(III) complexes of the type *fac*-[IrCl<sub>3</sub>(DMSO)(N<sup>^</sup>N)] (N<sup>^</sup>N = bipyridine, phenanthroline, dipyridoquinoxaline, dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine or benzo[i]-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine) are cytotoxic against lung and colon tumour cell lines, whose activity depends on the aromatic ligand and the presence of the *fac*-isomer. In spite of the aromatic ligands, DNA intercalation was not the biological mechanism of action of these

complexes [20]. A similar Rhodium compound showed higher antiproliferative activity toward MCF-7 breast cancer cells compared to its Iridium analogue.

Recently, studies on the properties of octahedral Rh(III) complexes of general formula  $[(C^{\wedge}N)_2Rh(dppz)]Cl$  (where  $C^{\wedge}N$  = 2-phenylpyridinate type ligands and  $dppz$  = dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine) have demonstrated that the activity depends not only on the DNA intercalator  $dppz$ , but also on the electronic and steric features of the C,N-chelating ligands [176].  $\Delta$ - $[Rh(bpy)_2(chrysi)]^{3+}$  ( $chrysi$  = 5,6-chrysenquinonediiimine) is able to intercalate into a specific region and recognize a single mismatch in a 2725 base pair plasmid [177].

Bearing all this in mind, the 2-(hydroxy-1-naphthyl)imidazo-[4,5-f][1,10]phenanthroline organic ligand (**HNAIP**)[178] was used to synthesize M(III) complexes denoted as  $[M(HNAIP)(ppy)_2]^+$  where  $ppy$  = 2-phenylpyridinate and  $M$  = Ir(III) and Rh(III) (Scheme 1). The ability of the ligand and the two transition metal complexes synthesized to induce cellular damage was tested and their possible mode of action was studied by biosubstrates-binding tests.

### V.3. RESULTS AND DISCUSSION

#### V.3.1. Synthesis

##### *Synthesis of ligand.*

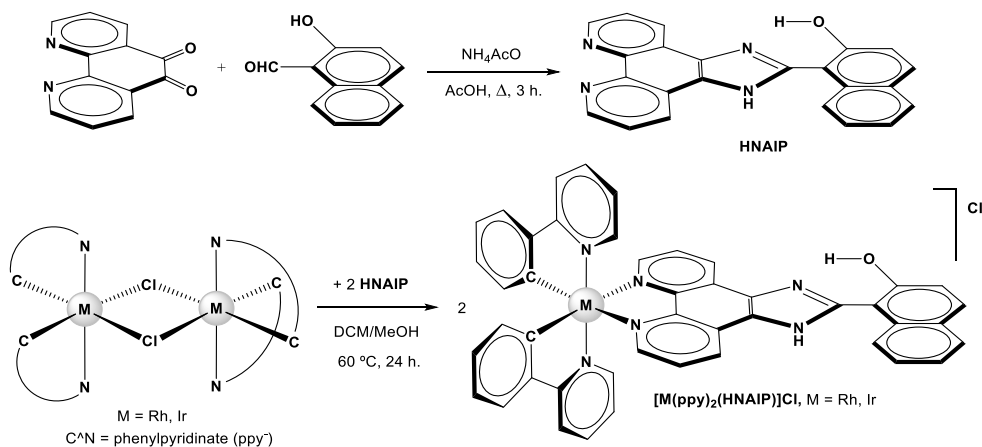
The HNAIP ligand was synthesized following a protocol from the literature which consists of reacting 2-hydroxy-1-naphthaldehyde with 1,10-phenanthroline-5,6-dione and ammonium acetate, in acetic acid as the solvent (see Scheme 1) [179,180].

##### *Synthesis of Complexes.*

The new complexes of general formula  $[M(ppy)_2(N^{\wedge}N)]Cl$  ( $ppy$  = 2-phenylpyridinate,  $N^{\wedge}N$  = HNAIP;  $M$  = Ir,  $[Ir(ppy)_2(HNAIP)]Cl$  or  $M$  = Rh,  $[Rh(ppy)_2(HNAIP)]Cl$ ) were synthesized from the appropriate starting material  $[M(\mu-Cl)(ppy)_2]_2$  ( $M$  = Rh, or  $M$  = Ir) through a bridge splitting reaction in the presence of HNAIP, using a solvent mixture of dichloromethane and methanol [181,182]. These complexes were isolated as pale yellow (Rh) or yellow (Ir) solids, consisting of racemic mixtures of  $\Delta$  and  $\Lambda$  enantiomers with good yields and purities according to analytical and spectroscopic data. Moreover, they are

soluble in common organic solvents such as DMSO, acetone,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and slightly soluble in methanol and water.

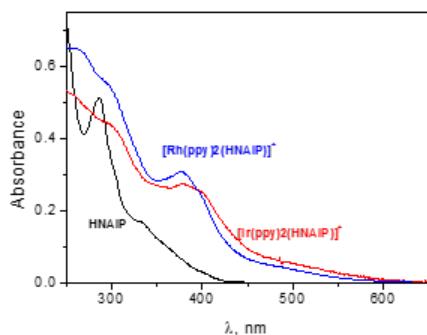
The new derivatives were comprehensively characterized by multinuclear NMR and mass spectroscopy and by elemental analysis.



**Scheme 1.** Synthesis of HNAIP and the Rh(III) and Ir(III) complexes.

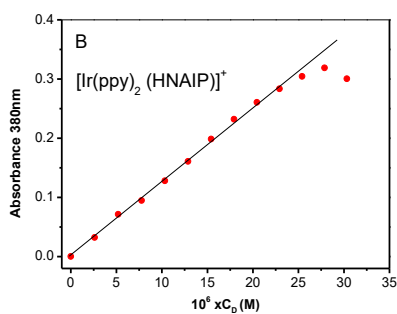
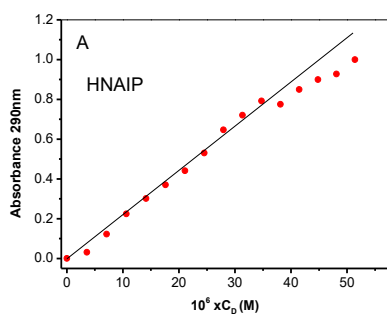
### V.3.2. Stability and solution studies

HNAIP presents an absorbance band at 300 nm, spread up to 400 nm (Figure 1). Both complexes,  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  and  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  display intense, broad absorption bands in the UV region, attributed to spin-allowed ( $^1\text{IL}$ ) ( $^1\pi \rightarrow \pi^*$ ) intra ligand transitions in the cyclometallated ( $\text{N}^{\wedge}\text{C}$ ) and ( $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ) ancillary ligands. In addition, the complexes exhibit a band at about 380 nm attributed to a mixed charge transfer (CT). The stability of the compounds was evaluated by means of absorbance measurements as a function of time. All three HNAIP,  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  and  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  are stable for weeks.

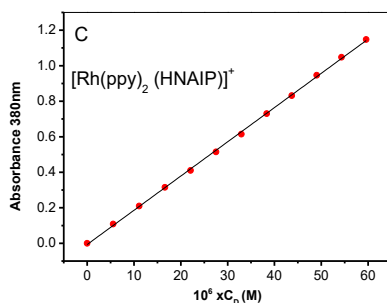


**Figure 1.** UV-Vis spectra of HNAIP,  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  and  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  in buffer,  $I = 0.01\text{M}$ ,  $\text{pH } 7.0$  and  $T = 25^\circ\text{C}$ .

The absorbance values increased linearly with concentration (Figure 2); fulfilment of Lambert Beer law is observed for HNAIP up to  $3.5 \times 10^{-5}\text{ M}$  with  $\epsilon_{290\text{nm}} = 2258\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ , for  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  up to  $2.0 \times 10^{-5}\text{ M}$  with  $\epsilon_{380\text{nm}} = 12758\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  and for  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  up to  $6.0 \times 10^{-5}\text{ M}$  with  $\epsilon_{380\text{nm}} = 20758\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ . Beyond these concentrations, changes in the linear profile are observed due to precipitation. Interestingly, the Rhodium complex is the most soluble.







**Figure 2.** Lambert-Beer law fulfillment for HNAIP (A),  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  (B) and  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  (C) in buffer I = 0.01 M, pH = 7.0 and T = 25 °C.

### V.3.3. Cellular tests in the dark and under irradiation.

MTT tests on human colon adenocarcinoma SW480 cells were performed to evaluate the cytotoxic activity of HNAIP,  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  and  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$ . The  $\text{IC}_{50}$  values in the dark are shown in Table 1. Interestingly, the metal centre exhibits a strong influence on the cytotoxicity of the synthesized complexes since the Ir(III) complex is 6-fold less cytotoxic than the Rh(III) complex; this one displays almost the same cytotoxic activity than the ligand, both being 8 times more active than cisplatin. Therefore, it can be concluded that not only the ligand but also the metal is key for the biological activity.

**Table 1.** Calculated  $\text{IC}_{50}$  values of the studied compounds and the positive control, cisplatin, in SW480 human colon adenocarcinoma cells after 24 h of exposure time.

COMPOUND	$\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{M}$
$[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$	$29 \pm 2$
$[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$	$5.1 \pm 0.7$
HNAIP	$4.2 \pm 1.5$
Cisplatin	$39 \pm 1$

As occurs with other Ir(III) cyclometallated complexes [128,183] these species could be adequate for its use in photodynamic therapy (PDT). In view that the

absorption spectra in both complexes extend to the Vis region (Figure 1), these were irradiated with UV ( $\lambda = 365$  nm) and Vis ( $\lambda = 460$  nm) light and the  $IC_{50}$  were evaluated. Unfortunately, neither  $[Ir(ppy)_2(HNAIP)]^+$  nor  $[Rh(ppy)_2(HNAIP)]^+$  showed any  $IC_{50}$  variation upon irradiation.

To shed some light into the possible mode of action responsible for the obtained cytotoxicity results, the interaction of the ligand and the two organometallic complexes with several bio-targets was studied.

#### V.3.4. Interaction with DNA

The HNAIP ligand is endowed with a phenanthroline moiety. It is known that phenanthrolines essentially behave as intercalating agents between DNA nucleobases, so that they are able to cause severe structural distortions, leading to lengthening, stiffening and unwinding of the double helix [169]. On the other side, the HNAIP molecule possess one 2-hydroxy-1-naphthaldehyde group, which could bind to the groove by H-bonding. Transition-metal complexes containing bipyridine or phenanthroline ligands have been shown to act as groove binders or possible partial intercalators [184,185]. That is why we study here the possible interaction of both the ligand and the metal complexes with DNA. The reaction of DNA with HNAIP,  $[Ir(ppy)_2(HNAIP)]^+$  and  $[Rh(ppy)_2(HNAIP)]^+$  can be represented by equation 1:

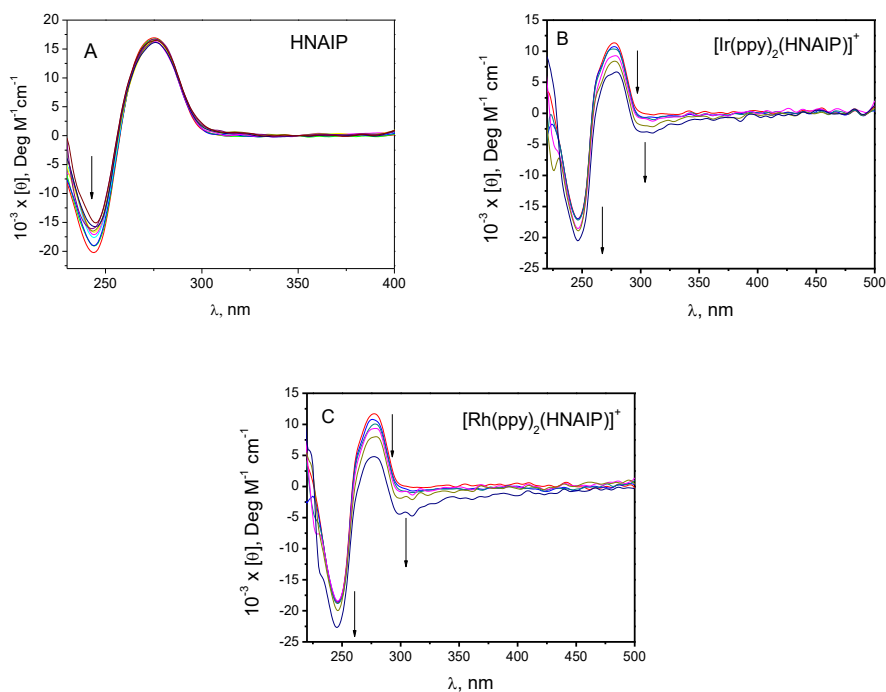


where P stands for the polynucleotide DNA, D for the ligand or metal complexes under study and PD represents the drug/DNA complex. Henceforth,  $C_D$  and  $C_P$  denote the analytical drug and biomolecule concentration, respectively.

#### *Circular Dichroism.*

CD titrations were performed by adding increasing amounts of the tested drug directly to the DNA solution. The variation of the CD spectra is somewhat modest for the ligand, but it was notable for the complexes, revealing that the metal complexes can modify the DNA structure to a greater extent than the ligand (Figure 3). The molar ellipticity in the DNA intrinsic, negative CD band (243 nm)

increases as a function of the  $C_D/C_P$  ratio for all systems; this band is related to changes in the helicity of the double helix [186]. Moreover, a new 315 nm band gets formed upon increasing the concentration of the complexes, thus making evident the formation of the drug/DNA complex. The observed behaviour of HNAIP is compatible with binding to the groove (far more than intercalation), whereas the interaction of  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  and  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  could be compatible with partial intercalation or binding to the groove.

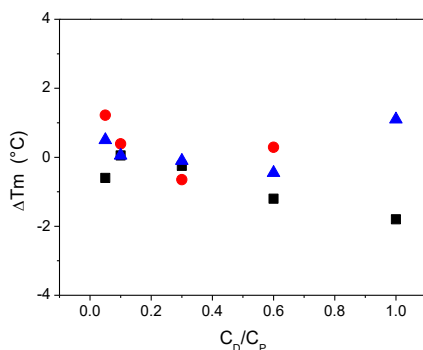


**Figure 3.** Circular dichroism titrations for (A) HNAIP/DNA, (B)  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$ /DNA and (C)  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$ /DNA systems;  $C_P = 4 \times 10^{-5}$  M; (A)  $C_D/C_P = 0 - 0.9$ ; (B) and (C),  $C_D/C_P = 0 - 1.3$ ;  $I = 0.01$  M, pH 7.0 and 25 °C.

#### *Thermal stability: UV-Vis and DSC.*

The thermal stabilization of the DNA double helix caused by the ligand and its Ir(III) and Rh(III) complexes was studied by UV-Vis and differential scanning calorimetry (DSC). These techniques show that neither HNAIP nor the Ir(II) and Rh(III) metal complexes stabilize the DNA double helix, since no significant

variation of  $\Delta T_m$  (difference between melting temperature,  $T_m$ , in the presence and in the absence of the studied compounds) was observed (Figure 4). This outcome points to absence of intercalation as the mode of binding with DNA.



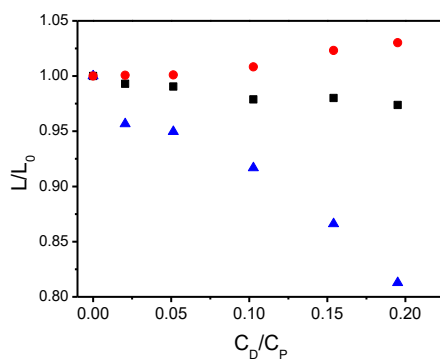
**Figure 4:** Variation of the DNA melting temperature ( $\Delta T_m = T_{mDrug/DNA} - T_{mDNAalone}$ ) as a function of  $C_D/C_P$  for the HNAIP/DNA (▲),  $[Ir(ppy)_2(HNAIP)]^+/DNA$  (■) and  $[Rh(ppy)_2(HNAIP)]^+/DNA$  (●) systems.

#### Viscosity.

Relative viscosity is related to the relative elongation of the DNA double helix according to the expression:

$$\frac{L}{L_0} = \sqrt[3]{\frac{\eta}{\eta_0}} \quad (2)$$

Figure 5 plots the obtained results, showing noticeable differences in the relative elongation of DNA. The behaviour of HNAIP is different (30% contraction for  $C_D/C_P \sim 0.2$ ) from that of  $[Rh(ppy)_2(HNAIP)]^+$  and  $[Ir(ppy)_2(HNAIP)]^+$  (no significant effect). Higher  $C_D/C_P$  ratios cannot be explored due to precipitation phenomena.



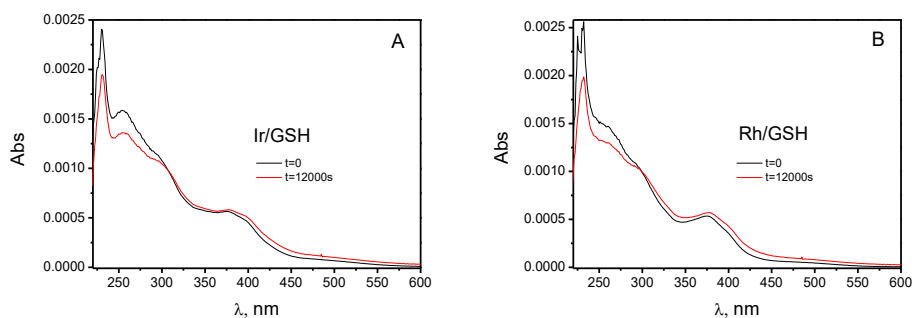
**Figure 5.** Relative contour length of the HNAIP/DNA (▲), [Ir(ppy)<sub>2</sub>(HNAIP)]<sup>+</sup>/DNA (●) and Rh(ppy)<sub>2</sub>(HNAIP)]<sup>+</sup>/DNA (■) systems; C<sub>p</sub> = 2 × 10<sup>-4</sup> M, I = 0.01 M, pH 7.0 and 25°C.

The observed decrease in the DNA relative contour length and the absence of thermal stabilization are compatible with binding of HNAIP to the DNA groove by H-bonding. By contrast, the absence of significant changes in the DNA relative viscosity and melting temperature suggest external binding as the plausible binding mode for [Rh(ppy)<sub>2</sub>(HNAIP)]<sup>+</sup> and [Ir(ppy)<sub>2</sub>(HNAIP)]<sup>+</sup>. The external complex formed is favoured by the electrostatic interaction between the positive charge of the metal complex and the negative DNA phosphate backbone. The possibility of the ligand to H-bonding also applies to the complexes. However, the geometry features of the complex are not adequate for this type of interaction because the cyclometallated ring prevents accommodation of the complex in the groove and the subsequent access to the functional groups of the DNA bases. Therefore, it follows that DNA cannot be the target of the complexes and the ligand.

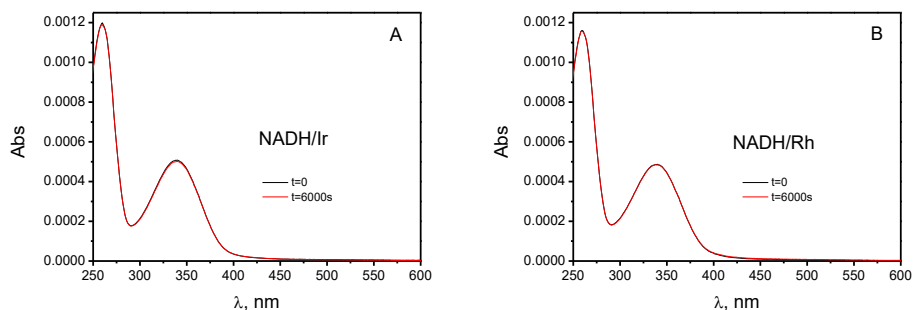
### V.3.5. Interaction with GSH and NADH.

The results obtained on the interaction with DNA is insufficient to justify the different cytotoxicities of the compounds listed in Table 1. Therefore, the reactivity of [Ir(ppy)<sub>2</sub>(HNAIP)]<sup>+</sup> and [Rh(ppy)<sub>2</sub>(HNAIP)]<sup>+</sup> towards GSH, overexpressed in the cytosol of most of cancer cells, and NADH, involved in numerous enzymatic processes, were explored, since both biomolecules have

been reported in the literature as adequate targets for similar metal complexes [187,188]. Therefore, UV-Vis measurements were carried out. Both complexes are able to interact with GSH (Figure 6) in a similar way, which do not explain the differences in the cytotoxicity. Unfortunately, there is no binding of the metal complexes to NADH (Figure 7).



**Figure 6.** UV-Vis spectra of GSH ( $C_P = 2.44 \times 10^{-4}$  M) with (A)  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$ , and (B)  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$ .  $C_P/C_D = 10$ ,  $I = 0.01\text{M}$ ,  $\text{pH } 7.0$  and  $25^\circ\text{C}$ .

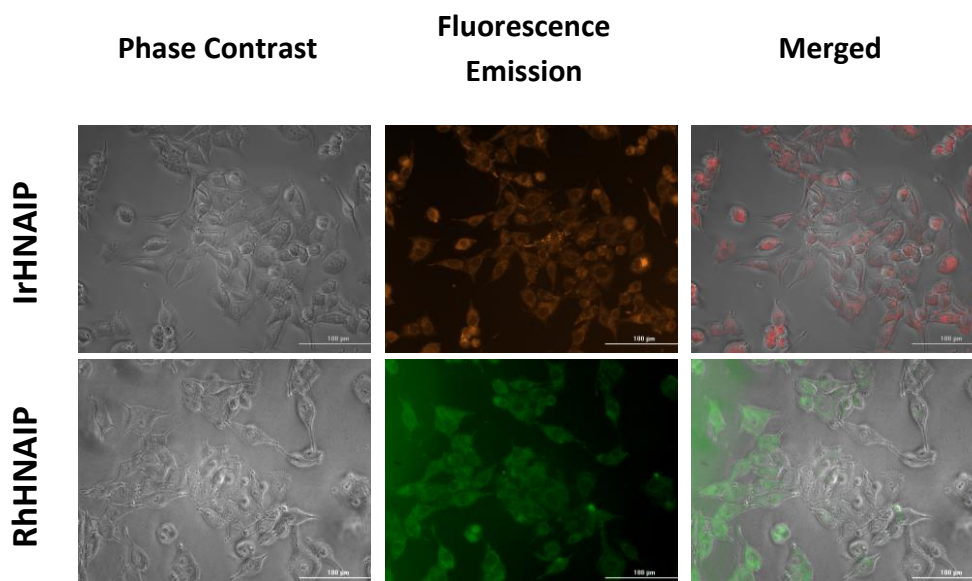


**Figure 7.** UV-Vis spectra of NADH ( $83\mu\text{M}$ ) with (A)  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  ( $0.8\mu\text{M}$ ) and (B)  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  ( $0.8\mu\text{M}$ ) in buffer,  $I = 0.01\text{M}$ ,  $\text{pH } 7.0$  and  $25^\circ\text{C}$ .

### V.3.6. Cellular uptake

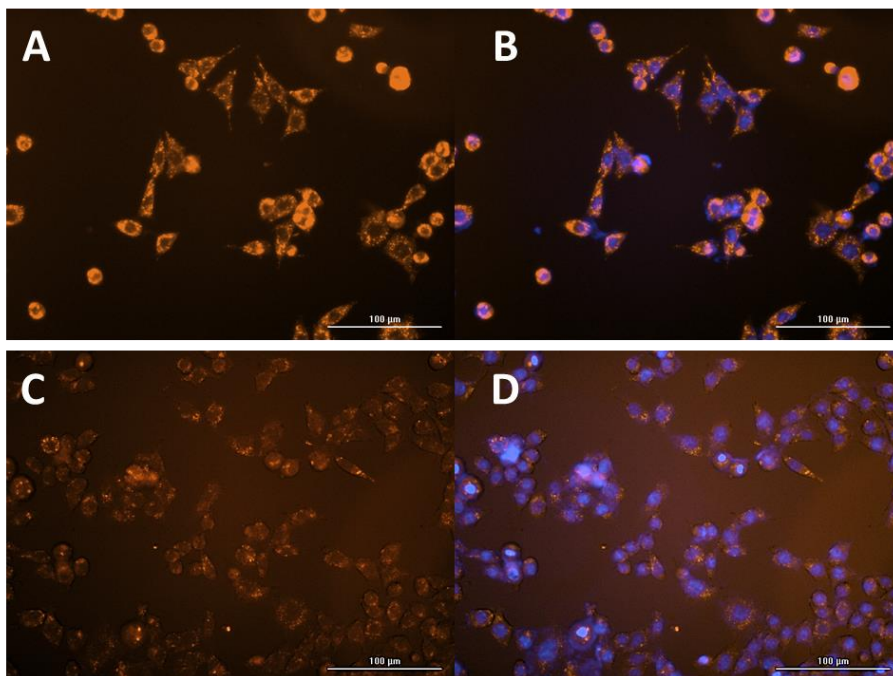
Up to now, no differences were found between these compounds and their interaction with the studied biological targets that justify their toxicity. This fact leads to cellular uptake as the most feasible explanation. Therefore, the uptake of ligand and metal complexes into SW480 cells was investigated using a

bioimaging microplate reader in phase contrast and blue, orange or green fluorescence emission modes. The images of SW480 cells treated with 20  $\mu\text{M}$  of both,  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  and  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  after 20 min incubation (Figure 8) show that they are successfully internalized by the cells and that they are mainly localized in the cytoplasm. By contrast, HNAIP is not visualized inside the cells.



**Figure 8.** SW480 cellular uptake of 20  $\mu\text{M}$  of the studied metal complexes after 20 min incubation time.

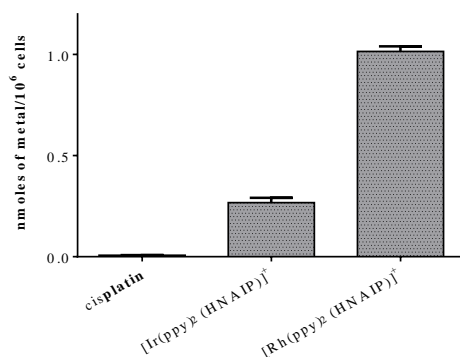
To confirm this localization SW480 cells were costained with Hoechst 33258. The images of SW480 cells treated with 2  $\mu\text{M}$  Hoechst 33258 and 5  $\mu\text{M}$   $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  and  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  after 1 h incubation (Figure 9) show that the metal complexes are successfully internalized by the cells. Regarding the subcellular localization of the metal complexes, both are localized mainly in the cytoplasm, as deduced from the orange emission pattern displayed by the complexes alone and for the co-staining with Hoechst 33258 and according to the binding to GSH.



**Figure 9.** SW480 cells treated for 1h with 2  $\mu\text{M}$  Hoechst 33258 and 5  $\mu\text{M}$  of  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  (1<sup>st</sup> row) or  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  (2<sup>nd</sup> row). Orange fluorescence emission (A and C), blue and orange fluorescence emission overlapped (B and D).

In order to properly quantify cellular uptake of both metal complexes ICP-MS measurements were performed. SW480 cells were treated for 24 h with  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$ ,  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  and cisplatin at  $C_D = 2 \mu\text{M}$ . The results show (Figure 10) greater cell internalization of the Rh complex compared to the Ir derivative and to the well-known anticancer agent cisplatin, which could explain the differences in the cytotoxicity of the metal complexes (Table 1), despite the fact that the interaction with DNA is much stronger (covalent binding) with cisplatin. Moreover, cellular uptake and cytotoxicity usually correlate satisfactorily in other anticancer drugs described in the literature [189]. In this work, the correlation is precise, since  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  is approximately five-fold more cytotoxic than  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$ , and exhibits a five-fold increase in its accumulation ability inside SW480 cells.



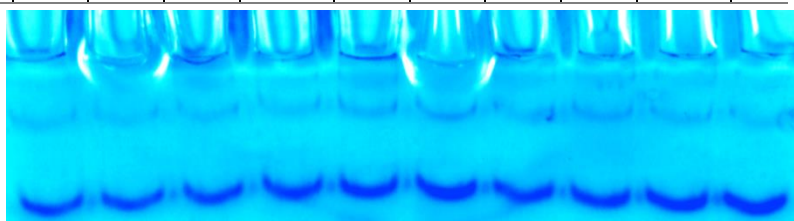


**Figure 10.** Metal accumulation expressed as nanomole of metal in  $10^6$  cells after 24 h treatment at  $C_D = 2 \mu\text{M}$ .

### V.3.7. Interaction with BSA

Since albumin is the most abundant plasma protein, the interaction of the studied compounds with this biomolecule can easily affect their bioavailability [156]. Therefore, to verify if the differences reported above between cellular uptake of  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  and  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  could be attributed to the interaction with albumin and, consequently, to a reduction in the final drug concentration that reaches the cell, the interaction with BSA was tested for the two complexes and also for the ligand. We have verified by native polyacrylamide gel electrophoresis that neither the HNAIP ligand, nor the corresponding Ir(III) and Rh(III) complexes do interact with the protein (Figure 11). Therefore, the differences in the cellular uptake cannot be justified on the basis of the interaction with seroalbumin.

Line	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Complex	BSA	HNAIP			IrHNAIP			RhHNAIP		
C <sub>D</sub> /C <sub>P</sub>	-	1	15	30	1	15	30	1	15	30



**Figure 11:** Native PAGE of BSA 15  $\mu$ M incubated for 1h at 37°C in the presence of different concentrations of the ligand and its metal complexes.

### V.3.8. Hydrophobicity (log P)

The cytotoxic potency of a drug is generally related to its cellular accumulation, which is in turn related to its lipophilicity. In general, hydrophobicity is considered to play a crucial role in structure–activity relationships and in determining the biological properties of the drug [190–193]. Since great differences in the cellular uptake were observed, the octanol/water partition coefficients (log P) for the complexes were determined in an attempt to find a possible explanation. HNAIP was not soluble in octanol therefore, its log P was not obtained. The log P values for Iridium and Rhodium complexes were  $-0.11 \pm 0.03$  and  $2.58 \pm 0.08$ , respectively indicating that Rhodium is more hydrophobic than Iridium.

## V.4. CONCLUSIONS

HNAIP and the new complexes  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  and  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  have been synthesized and fully characterized. The metal complexes are able to get into SW480 colon adenocarcinoma cells and due to their photoluminescence properties are visualized inside the cells after 1 hour of incubation, being localized in the cytoplasm. The cytotoxicity of HNAIP is really promising, showing the role played by the ligand in the biological activity of the complexes. Together with the ligand, the metal centre plays a key role, as  $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  is 6-times more cytotoxic than  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{HNAIP})]^+$  complex. In an attempt to explain the differences found in terms of cytotoxicity between them, the interaction of all

three compounds with BSA, GSH, NADH and DNA was studied. None of them is able to react with BSA and NADH. Nevertheless, both metal complexes interact with GSH. Regarding DNA binding HNAIP can interact with DNA by groove binding, whereas the complexes do it by external binding. It has been verified by ICP-MS that the cellular uptake is much greater for the Rh complex than for the Ir analog due to their different hydrophobicity, and that both complexes internalize into SW480 cells to a greater extent than cisplatin. Moreover, the uptake data concur with the observed difference for the  $IC_{50}$  values in SW480 cells.

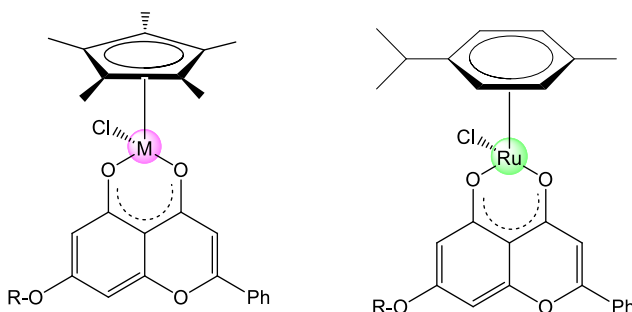


**VI. Influence of the  
ancillary ligand and the  
metal centre on the  
biological reactivity of  
chrysin flavonoids**



## VI.1. RESUMEN

En este capítulo se estudia una familia de ligandos y complejos metálicos del tipo half-sandwich donde los ligandos son flavonoides derivados de la crisina (ver Figura); para cada uno de ellos se ha sintetizado los correspondientes complejos metálicos de Iridio, Rodio y Rutenio.



**Figura.** Estructura de la familia de complejos metálicos. M = Ir o Rh, R = Etilo, Butilo, Bromo butilo y butilpiperidina.

Con el objetivo de estudiar la influencia del centro metálico y de los sustituyentes en la actividad biológica de los diferentes complejos, se ha realizado citotoxicidad, internalización celular e interacción con la proteína BSA y ADN.

Mediante el ensayo de proliferación celular MTT se observó que los complejos con butilpiperidina son los más citotóxicos. Estos resultados revelan la importancia de este ligando en términos de actividad biológica, por lo que fueron seleccionados para el estudio de la influencia del centro metálico, observando que el compuesto de Iridio es más citotóxico que el de Rutenio, y este, que el de Rodio. La diferencia en la toxicidad podría deberse a la distinta capacidad para entrar en las células, la cual se cuantificó por ICP-MS tras 24 horas de exposición, no encontrándose relación alguna entre citotoxicidad y captación celular. Dada la importancia de la interacción con las proteínas del suero para modular la internalización celular, facilitando su entrada o secuestrándoles, se estudió la interacción con BSA mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida. El resultado mostró que para el complejo de Rutenio la interacción con BSA puede ser la causa de la menor citotoxicidad comparado con el Iridio dado que éste no interacciona con la proteína. Por el contrario, el complejo de Rh solo es capaz de interaccionar con ésta a altas concentraciones.

Para conocer si las diferencias observadas en las citotoxicidades se pudieran deber a su interacción con el ADN se estudió por  $^1\text{H}$ -RMN la interacción con guanosín monofosfato (GMP) observando la formación de enlace covalente con el metal. Esos experimentos de RMN fueron realizados por la Dra. Mónica Vaquero Gutiérrez de la Universidad de Burgos.

Se realizaron experimentos de absorción, desnaturalización, dicroísmo circular y viscosidad con ctADN mediante los que se pudo observar las diferencias en la interacción. La electroforesis en gel de agarosa con plásmido pUC18 reveló que el complejo de Iridio provoca mellas (cleavage) en el plásmido además de la generación de oxígeno singlete, ya que en presencia de L-histidina (un conocido scavenger de  $^1\text{O}_2$ ) el cleavage es inhibido.

Por último, el estudio de la interacción con GSH permitió explicar el hecho de que el compuesto de Rodio sea el que más se internaliza en las células, pero el menos citotóxico, puesto que el tripéptido se encuentra en el citosol en concentraciones muy altas, del orden mM, y el compuesto queda secuestrado por el GSH lo cual dificultaría su interacción con el ADN.



## VI.2. INTRODUCTION

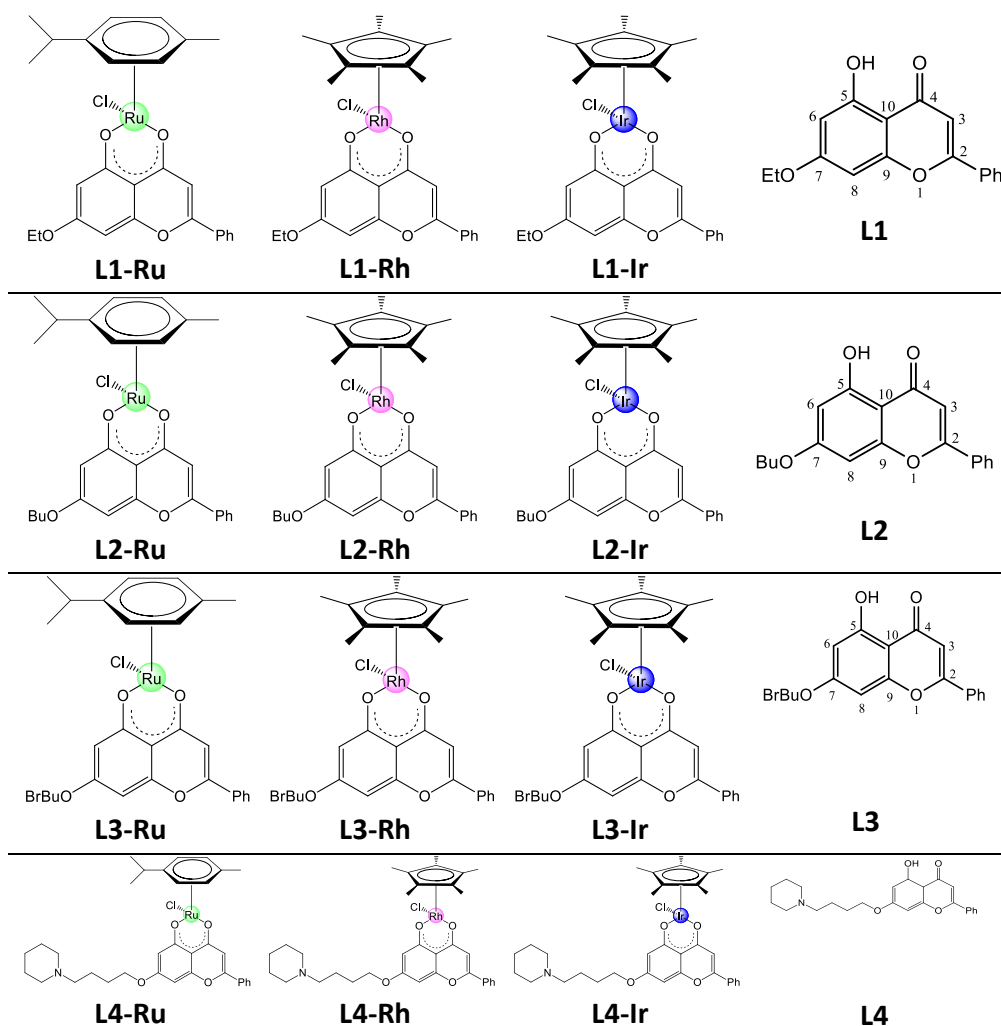
The acquired or intrinsic resistance of standard drugs is the major challenge in the cancer treatment [194]. Consequently, the last decades organometallic anticancer agents have emerged, and Iridium, Rhodium or Ruthenium complexes have become the focus of research due to their antiproliferative activity, efficient uptake and, in some cases, positive tolerance by healthy cells [195]. Specially arene metal complexes enable a relative easy modulation of the pharmacological properties by variation of the arene ligand, the leaving group or the quelating ligands [196]. Even so, most new anticancer drugs are ineffective because they are not capable of reaching their target. For this reason, it is necessary to continue designing innovative complexes.

Recently, Ru [197], V [198,199], Zn [200], Cu [201], Rh and Os complexes bearing bioactive flavonoid ligands have been described. Flavonoids are polyphenol compounds, which are present among the plant constituents. Their broad range of biological properties not only are ascribed to their antioxidant activity which depends mostly on the number and position of hydroxyl moieties, but also, they act as enzyme inhibitors [202], signalling molecules [203], DNA intercalators [204,205] and chelators of metal ions. Furthermore, they exhibit interesting properties including anti-inflammatory, estrogenic, antimicrobial and also anticancer activity [205]. DNA binding studies of quercetin and its metal complexes has been extensively investigated during the last decade in order to correlate their structure–activity relationship [206].

Among the extensive variety of flavonoids, chrysin (5,7-dihydroxy-2-phenyl-4Hchromen-4-one), a naturally wide distributed flavonoid, has been known due to its pharmacological potential as anticancer agent [207]. Chrysin mitigates neuro-inflammation, neurotoxicity, and oxidative stress in neuronal tissues, just as diminishes cognitive dysfunctions. From our knowledge there is a unique paper where the coordination of chrysin with Ruthenium has been studied [208].

In this work we linked chrysin flavonoids to metal-arene moieties, so that we achieved multi-targeted anticancer agents, which offer advantages over classic chemotherapeutics such as improved pharmacological properties, metabolism and resistance development, tuneable antitumor activity, intramolecular combination therapy, and also selective targeted properties [209].

Structure-activity relationship (SAR) of flavonoid–metal complexes like Cu, Ni, Zn, Se and Mn [210] and their anticancer activities have been explored, just like the role of the ligand system in anticancer activity with Ru<sup>II</sup> p-cymene complexes [211], however, there are a few studies about the influence of the metal centre in these types of systems [212]. So, we report four chrysin families of Iridium, Rhodium and Ruthenium with the aim of studying the influence of the metal centre and the substituents of the chrysin fragment on their biological activity.



**Figure 1.** Structure of the studied metal-flavonoid family.

### VI.3. RESULTS AND DISCUSSION

#### VI.3.1. Biological activity

The cytotoxicity of all the complexes was evaluated by means of the MTT proliferation assay in SW480 and A549 cells with 24h of exposure time. The achieved  $IC_{50}$  values, that is, the concentrations which produced 50% inhibition of cell viability, are collected in Table 1. The four families have analogous ligands differing in the last substituent: ethyl, butyl, bromobutyl and piperidine.

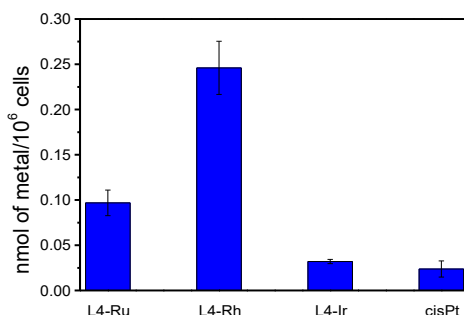
As it can be deduced from Table 1 values, the ligand structure plays an essential role. In this way, the ligand 4 and its complexes (L4-Ru, L4-Rh and L4-Ir) are the most cytotoxic complexes displaying higher activity than cisplatin. As far as the metal centre is concerned, Iridium, L4-Ir, is the most cytotoxic. Moreover, the ligands L1 and L2 are not cytotoxic, which is surprising comparing with L3 and L4. However, the complexes with L1 show moderate toxicity in SW482 cell line. The data collected show that the metal centre is not a decisive factor in the toxicity cells of the complexes with L2, L3 y L4.

**Table 1:**  $IC_{50}$  values expressed in  $\mu M$ , obtained from MTT assay for 24h exposition period in SW480 and A549 cell lines.

COMPOUND	SW480	A549
L1-Ru	95.7 $\pm$ 5.2	159.9 $\pm$ 1.2
L1-Rh	33.5 $\pm$ 1.1	134.4 $\pm$ 1.1
L1-Ir	51.9 $\pm$ 1.6	> 200
L1	> 200	> 200
L2-Ru	134.1 $\pm$ 9.2	122.6 $\pm$ 1.2
L2-Rh	124.2 $\pm$ 1.1	97.4 $\pm$ 1.2
L2-Ir	119.8 $\pm$ 1.1	> 200
L2	> 200	> 200
L3-Ru	117.3 $\pm$ 3.2	114.9 $\pm$ 1.2
L3-Rh	> 200	57.3 $\pm$ 1.1
L3-Ir	> 200	36.8 $\pm$ 1.2
L3	> 200	63.7 $\pm$ 1.2
L4-Ru	28.5 $\pm$ 1.3	31.1

<b>L4-Rh</b>	31.3 ± 1.3	35.3
<b>L4-Ir</b>	15.9 ± 1.3	18.9
<b>L4</b>	20.8 ± 2.0	3.8
<b>cisPt</b>	46.7 ± 1.4	37.6

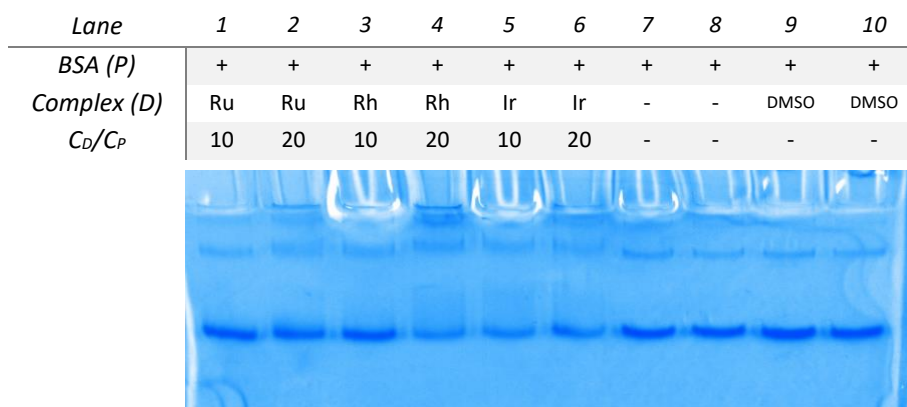
Because of their toxicity, we singled out piperidine group to study the influence of the metal centre on the biological behaviour. The differences in the cytotoxicity may have their origin in the ability of going into cells. So, metal accumulation inside the SW480 cells was determined by ICP-MS after 24h of exposure to the complexes (Figure 2), being all of them more internalized than the well-known anticancer agent cisplatin. However, direct relationship between cellular accumulation in SW480 cells and cytotoxicity is not observed. Surprisingly, L4-Ir, the most cytotoxic, is the less internalized complex. The cellular uptake of L4-Rh is twofold higher than that of L4-Ru although L4-Rh can be considered as cytotoxic as L4-Ru.



**Figure 2.** Metal accumulation in SW480 cells at 24h with 5µM of compounds.

Anticancer activity of some new metal complexes is conditioned by protein binding which improves accumulation in the tumour [213]. However serum protein interaction, can negatively affect in the cellular uptake due to protein sequestration of the drug [156]. Considering this fact, in an attempt to explain the observed lack of correlation between cytotoxicity and cellular uptake, the interaction of these complexes with bovine serum albumin (BSA) was studied due to its similarity with human serum albumin (HSA), present in blood plasma.

Figure 3 shows the native acrylamide gel electrophoresis performed incubating BSA, (which concentration was denoted as  $C_p$ ) with complexes, denoted as  $C_D$ , in the dark for 24h at two  $C_D/C_p$  ratios: 10 and 20. Lanes 7 and 8, are the negative controls with BSA alone, whereas lanes 9 and 10 are the vehicle controls (BSA in the presence of the maximum DMSO concentration used in the experiment). Interestingly, L4-Ir, which is the most cytotoxic complex, affects the protein conformation (lanes 5 and 6). Complex L4-Rh also interacts with BSA but only at higher concentrations, as it is visible in lane 3 where there is no effect on the protein bands. On the contrary, complex L4-Ru does not affect BSA conformation even at high concentrations (lane 1 and 2). Noteworthy, L4-Ir affects in a stronger way than the others the protein conformation, indeed, it is the less accumulated inside the cell which can be related to the complex partially sequestration exert by serum proteins. This fact can partially explain the uptake results, but it does not elucidate the cytotoxicity. In an attempt to identify the biological target, the interactions with DNA and glutathione were studied.



**Figure 3.** Native acrylamide gel electrophoresis of BSA incubated with complexes L4-Ru, L4-Rh and L4-Ir for 24h at  $C_D/C_p = 10$  and  $20$ .  $C_{BSA} = 1.5 \mu\text{M}$ .

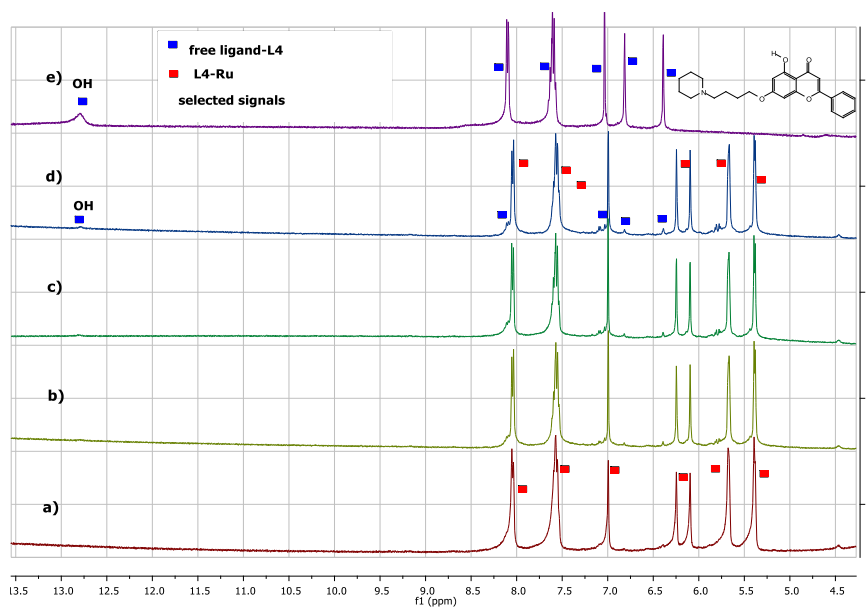
### VI.3.2. Stability in DMSO and aqueous solution

The study of anticancer agents in aqueous solution is crucial to know their stability and if the chloride ligands can be exchanged by a water molecule in aqueous media, being the species obtained more reactive [211]. Complexes L4-Ru, L4-Rh and L4-Ir were soluble in DMSO, so the concentrated stock solutions

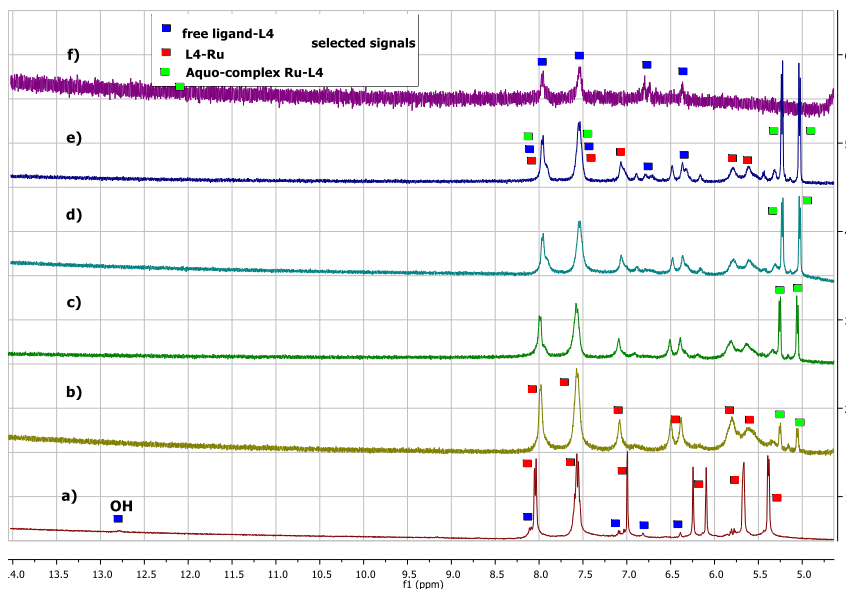
were prepared in this solvent and then, the more diluted working solutions were made in aqueous buffer.

#### *NMR studies of Stability in DMSO and DMSO/D<sub>2</sub>O (3:2)*

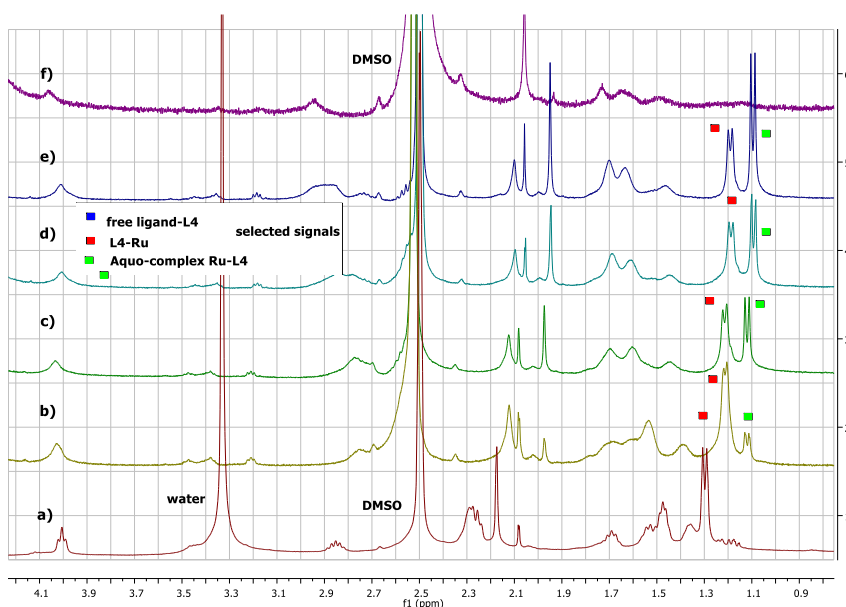
After 24 hours in DMSO solution, NMR spectra of the complex **L4-Ru** over the time showed 8% of **L4** in solution, with a 92% of **L4-Ru** unaltered (see Figure 4). Substitution of the Cl atom by DMSO is not observed. After the addition of D<sub>2</sub>O, the OH group signal disappears in the spectrum by proton exchange with de D<sub>2</sub>O (compare a and b in Figure 5). The <sup>1</sup>H NMR spectra showed the clear formation of the aquo complex (approx. 58%) by the increasing, over time, of the two doublet signals at 5.03 and 5.23 respect to the **L4-Ru** and the doublet at 1.10 ppm (methyl group of the isopropyl of cymene group) with the corresponding decrease of the same doublet for **L4-Ru** (1.19 ppm, see Figure 6).



**Figure 4.** Aromatic area of <sup>1</sup>H NMR spectra of **L4-Ru** in DMSO-d<sub>6</sub> (400 MHz): a) t = 0; b) t = 3 h; c) t = 7h; d) t = 24h; e) free ligand.

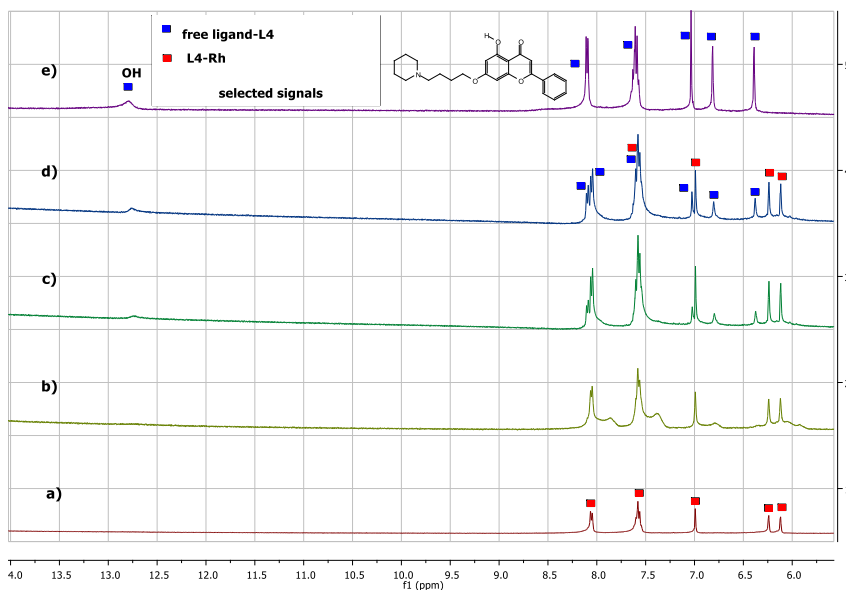


**Figure 5.** Aromatic area of  $^1\text{H}$  NMR spectra of **L4-Ru** in  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  (3:2) (400 MHz): a) **L4-Ru** after 24 h in  $\text{DMSO-d}_6$ ; b)  $t = 0$ ; c)  $t = 3$  h; d)  $t = 7$  h; e)  $t = 24$  h; f) **L4**.



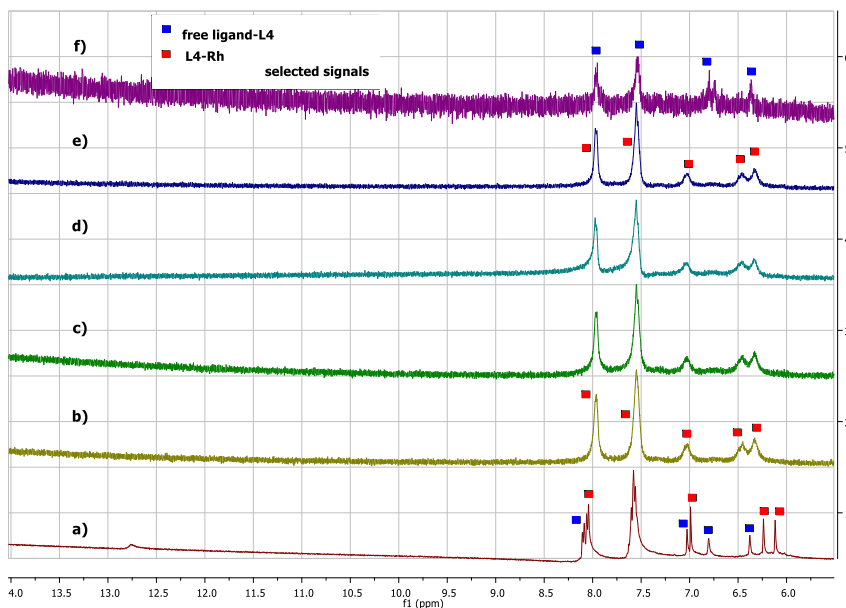
**Figure 6.** Aliphatic area of  $^1\text{H}$  NMR spectra of **L4-Ru** in  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  (3:2) (400 MHz): a) **L4-Ru** after 24 h in  $\text{DMSO-d}_6$ ; b)  $t = 0$ ; c)  $t = 3$  h; d)  $t = 7$  h; e)  $t = 24$  h; f) **L4**.

Regarding to the **L4-Rh** complex, after 24 h in solution of DMSO 39% of cleavage of the ligand is observed (see Figure 7). After the addition of D<sub>2</sub>O over the previous mixture, a precipitate is observed in the NMR tube. Proton spectra confirm that the observed precipitated is the ligand **L4**, due to the disappearance of the signals of the **L4** ligand (see Figure 8). The complex **L4-Rh** stay unaltered, that means there is no aquation process.



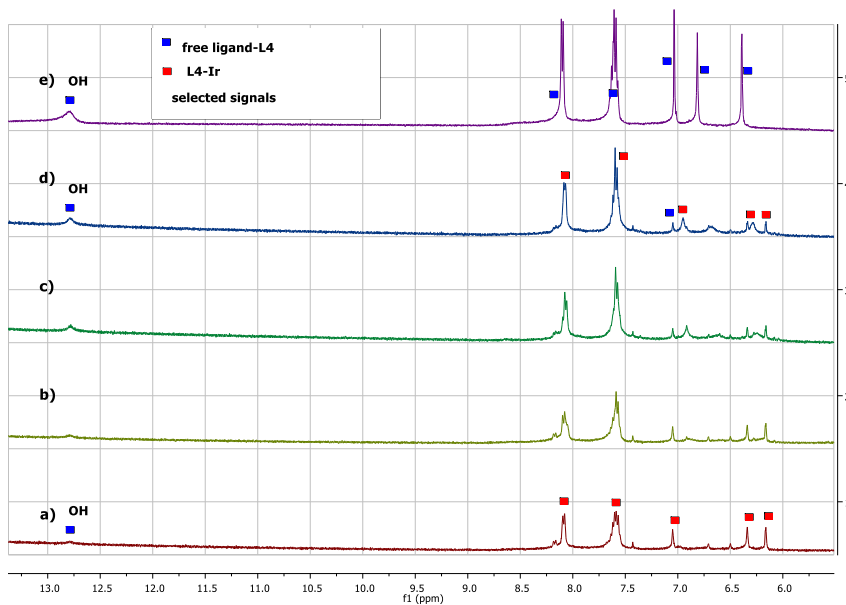
**Figure 7.** Aromatic area of <sup>1</sup>H NMR spectra of **L4-Rh** in DMSO-d<sub>6</sub> (400 MHz):  
a) t = 0; b) t = 30min; c) t = 7h; d) t = 24h; e) free ligand.



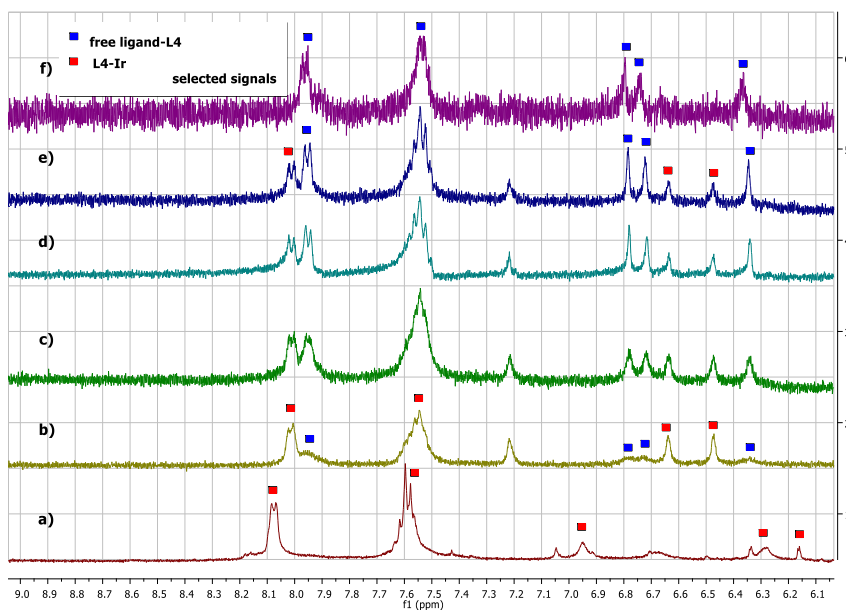


**Figure 8.** Aromatic area of  $^1\text{H}$  NMR spectra of **L4-Rh** in DMSO- $d_6$ : $\text{D}_2\text{O}$  (3:2) (400 MHz): a) **L4-Rh** after 24 h in DMSO- $d_6$  ; b)  $t = 0$ ; c)  $t = 3\text{h}$ ; d)  $t = 7\text{h}$ ; e)  $t = 24\text{h}$ ; f) **L4**.

For the complex **L4-Ir** in DMSO the signal of the OH appears in the proton spectra but other signals of the free ligand **L4** are missing, that could point to a partial discoordination of the **L4** by the protonation of the OH group (see Figure 9). After 24 h of the addition of  $\text{D}_2\text{O}$  a 66% of free ligand is observed, the rest of the complex **L4-Ir** is unaltered and no process of aquation is observed.

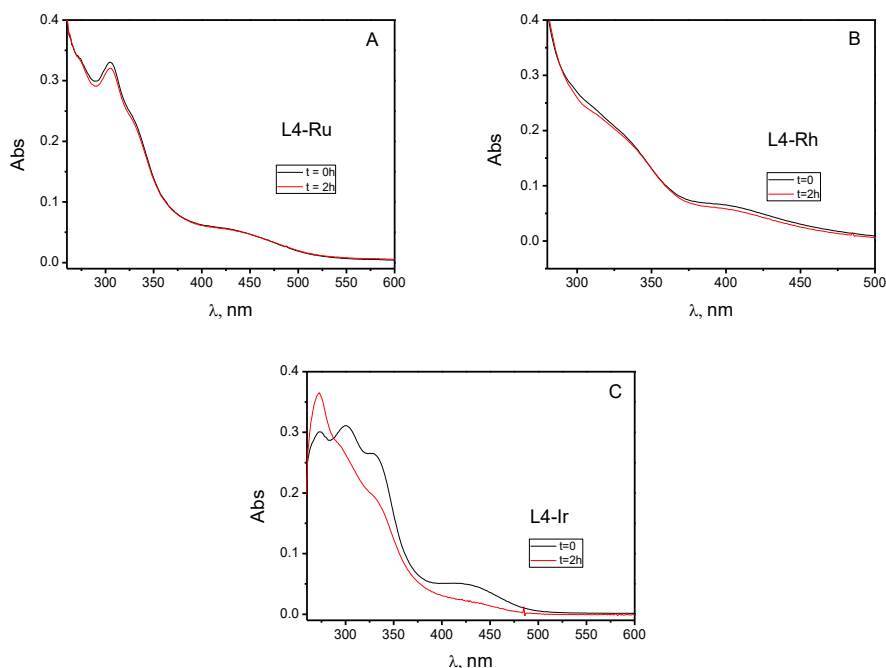


**Figure 9.** Aromatic area of  $^1\text{H}$  NMR spectra of **L4-Ir** in  $\text{DMSO-d}_6$  (400 MHz):  
 a)  $t = 0$ ; b)  $t = 30\text{min}$ ; c)  $t = 7\text{h}$ ; d)  $t = 24\text{h}$ ; e) **L4**.



**Figure 10.** Aromatic area of  $^1\text{H}$  NMR spectra of **L4-Ir** in  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  (3:2) (400 MHz): a) **L4-Ir** after 24 h in  $\text{DMSO-d}_6$ ; b)  $t = 0$ ; c)  $t = 3\text{ h}$ ; d)  $t = 7\text{ h}$ ; e)  $t = 24\text{h}$ ; f) **L4**.

UV-Vis studies corroborate NMR results. Figure 11 displays lower cleavage of L4-Ru and L4-Rh than L4-Ir.

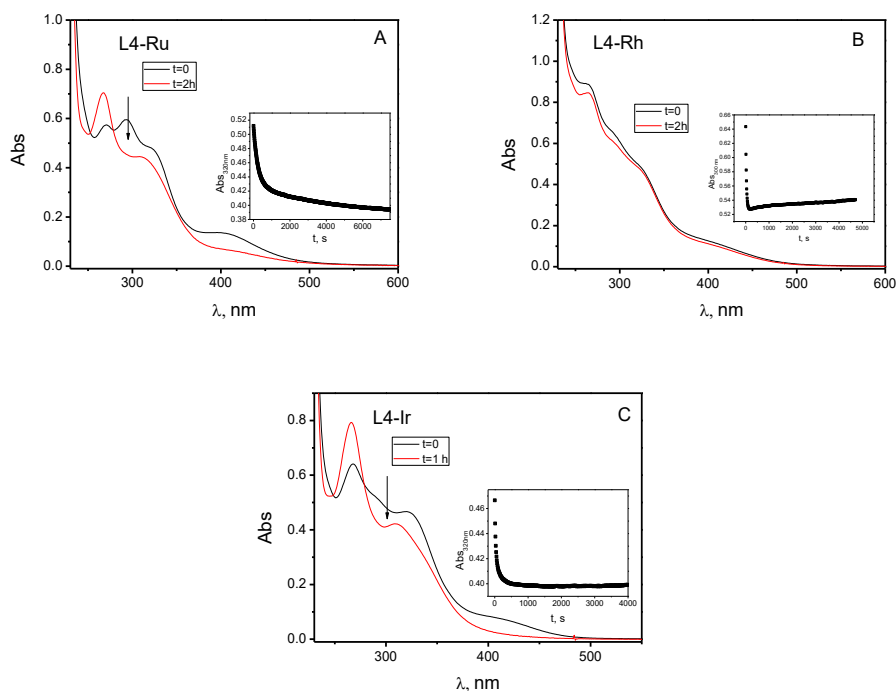


**Figure 11.** Absorbance spectra over time of A) L4-Ru, B) L4-Rh, C) L4-Ir, in DMSO.  $C_D = 1.66 \times 10^{-5}$  M.

Since the interaction of these complexes with biomolecules will be enhanced in aqueous solution, their stability in 2.5 mM sodium cacodylate (NaCaC) aqueous buffer was studied. Spectrograms of Figure 12 exhibit isosbestic points indicative of different species in solution. It is interesting paying attention to the final spectra in L4-Ru and L4-Ir, which are evidences of ligand L4 discoordination, just like NMR observations. In L4-Rh complex the cleavage of the ligand is less evident whereas its cytotoxicity is so similar to L4-Ru complex. It can be concluded that cytotoxic values not only are influenced by the ligand but also the metal centre has an important role.

The functions obtained from abs-time data pairs are biexponential, pointing to aquation process along with ligand release. Despite this aquation has not been

observed by NMR, inset in Figure 12B leaves no doubt about the consecutive reactions' existence.



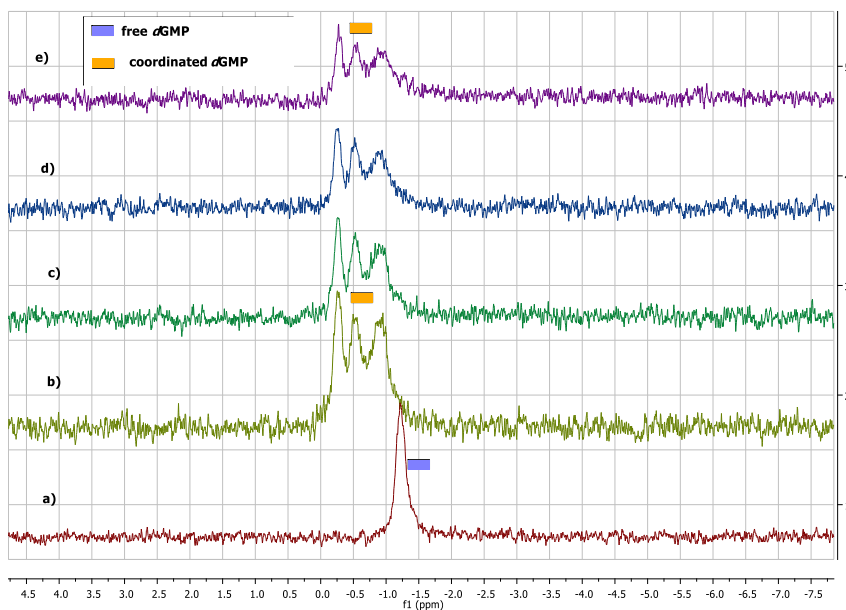
**Figure 12.** Absorbance spectra over time in buffer solution of A) L4-Ru, B) L4-Rh and C) L4-Ir.  $C_D = 3.30 \times 10^{-5}$  M.

### VI.3.3. Interaction with the nucleotide GMP

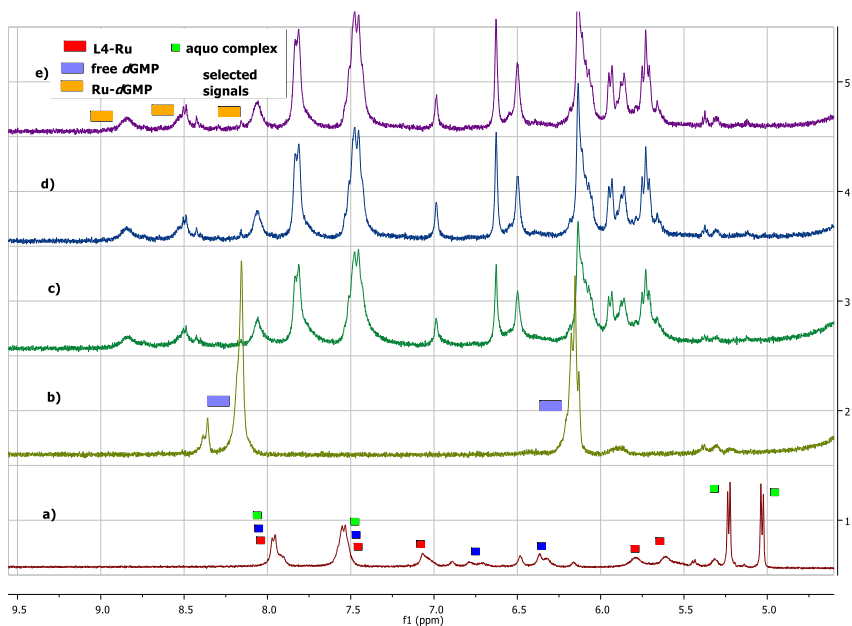
#### NMR

The covalent binding with *d*GMP was studied by NMR. Immediately, after the addition of the *d*GMP over the NMR tube of **L4-Ru**, three signals in the  $^{31}\text{P}$  NMR spectra are observed, that correspond to three different Ru-arene complexes with coordinated *d*GMP. That means that all the metallic complexes existing in solution (**L4-Ru**,  $[\text{Ru}(\text{cym})(\text{Cl})\text{L4}(\text{H}_2\text{O})]^+$ , and  $[\text{Ru}(\text{cym})\text{Cl}_2\text{DMSO}]$  obtained by the liberation of the ligand **L4**) are able to bind to the N7 of *d*GMP generating three different species (see Figure 13). These signals do not correspond to the binding to the P of *d*GMP since in that case the peaks would be 4 positive ppm displaced to free *d*GMP [150]. On the other hand, the  $^1\text{H}$  NMR spectra are more difficult to

explain due to the presence of numerous signals. Probably, the broad singlet signals at 8.84, 8.50 and 8.06 ppm are the signals of the H8 proton of the corresponding complexes bonded to the N7 of *d*GMP (see Figure 14).

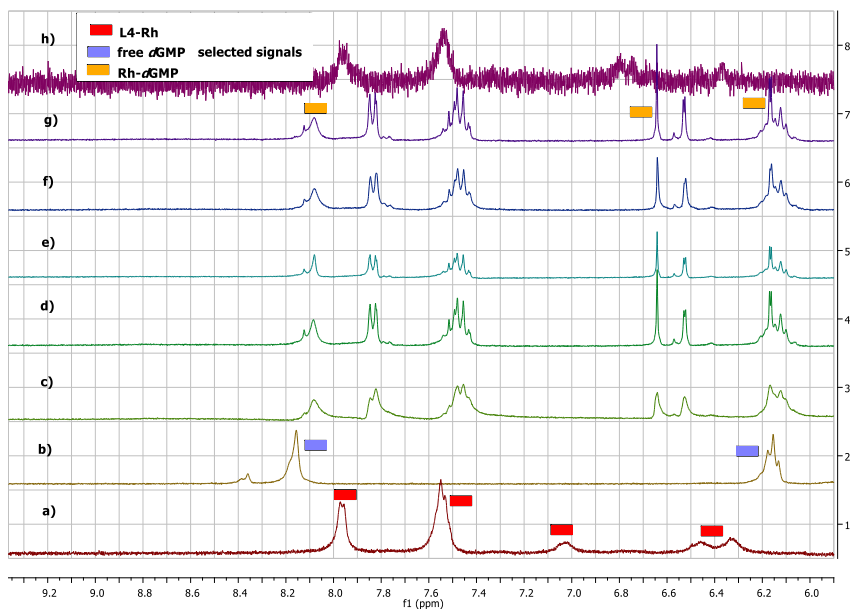


**Figure 13.**  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra of **L4-Ru** in  $\text{DMSO-}d_6\text{:D}_2\text{O}$  (3:2) + *d*GMP (300 MHz): a) free *d*GMP; b)  $t = 0$ ; c)  $t = 3\text{h}$ ; d)  $t = 7\text{h}$ ; e)  $t = 24\text{h}$ .



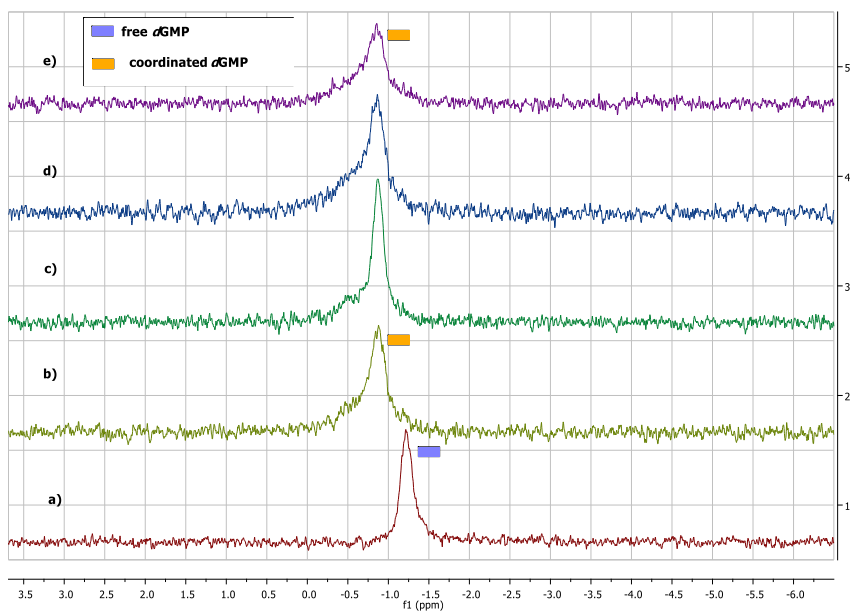
**Figure 14.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of **L4-Ru** in  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  (3:2) + *d*GMP (300 MHz):  
a) **L4-Ru** after 24h in  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  (3:2); b) free *d*GMP; c)  $t = 1\text{h}$ ; d)  $t = 7\text{h}$ ;  
e)  $t = 24\text{h}$ .

The complexes **L4-Rh** and **L4-Ir** bind quickly to *d*GMP at the time of the addition. The coordination of both complexes through the N7 is confirmed by  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR (see Figures 15 and 16 for **L4-Rh** and Figures 17-18 for **L4-Ir**, respectively).

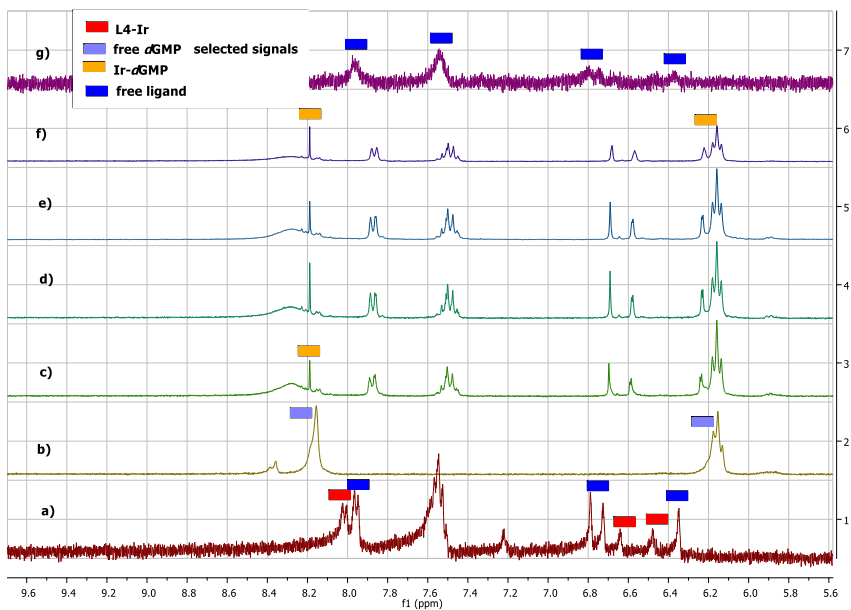


**Figure 15.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of **L4-Rh** in  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  (3:2) + *d*GMP (300 MHz):

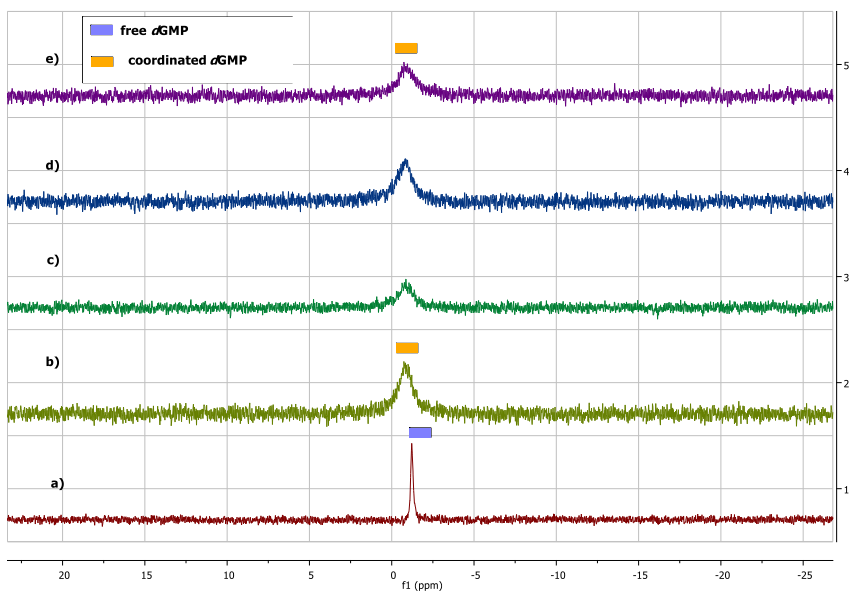
a) **L4-Rh** after 24h in  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  (3:2); b) free *d*GMP; c)  $t = 0$ ; d)  $t = 1\text{h}$ ;  
e)  $t = 3\text{h}$ ; f)  $7\text{h}$ ; g)  $24\text{h}$ ; h) free **L4**.



**Figure 16.**  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra of **L4-Rh** in  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  (3:2) + *d*GMP (300 MHz): a) free *d*GMP; b)  $t = 0$ ; c)  $t = 3\text{h}$ ; d)  $t = 7\text{h}$ ; e)  $t = 24\text{h}$ .



**Figure 17.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of **L4-Ir** in  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  (3:2) + *d*GMP (300 MHz):  
 a) **L4-Ir** after 24h in  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  (3:2); b) free *d*GMP; c)  $t = 0\text{h}$ ; d)  $t = 1\text{h}$ ;  
 e)  $t = 3\text{h}$ ; f)  $t = 7\text{h}$ ; g)  $t = 24\text{h}$ ; h) free **L4**.



**Figure 18.**  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra of **L4-Ir** in  $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$  (3:2) + *d*GMP (300 MHz): a) free *d*GMP; b)  $t = 0$ ; c)  $t = 1\text{h}$ ; d)  $t = 3\text{h}$ ; e)  $t = 7\text{h}$ .

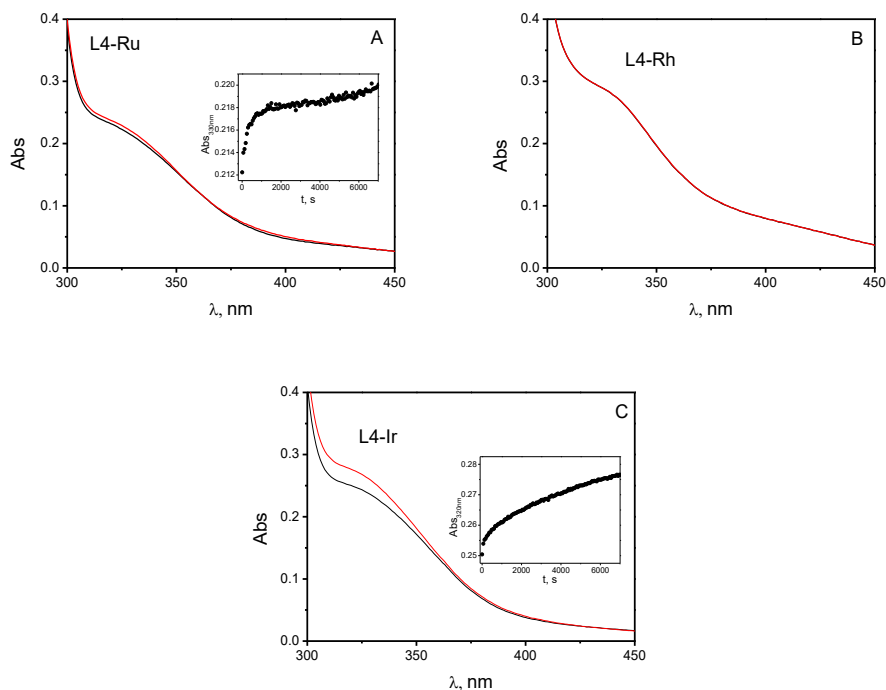


### VI.3.4. Interaction with DNA

#### UV-Vis

Absorbance measurements as a function of time were performed in order to study the DNA covalent binding. DNA was added to the cell once the aquation processes were finished. UV-Vis spectra of L4-Ru and L4-Ir show small variation as a result of the covalent bond formation between these two complexes and the DNA (Figure 19). On the other hand, L4-Rh/DNA binding is not observed by UV-Vis due to the speed of the reaction, but the bond takes place because it was observed by NMR.

With the aim to delve into the DNA interaction, circular dichroism, melting, viscosity and electrophoresis studies were also carried out.

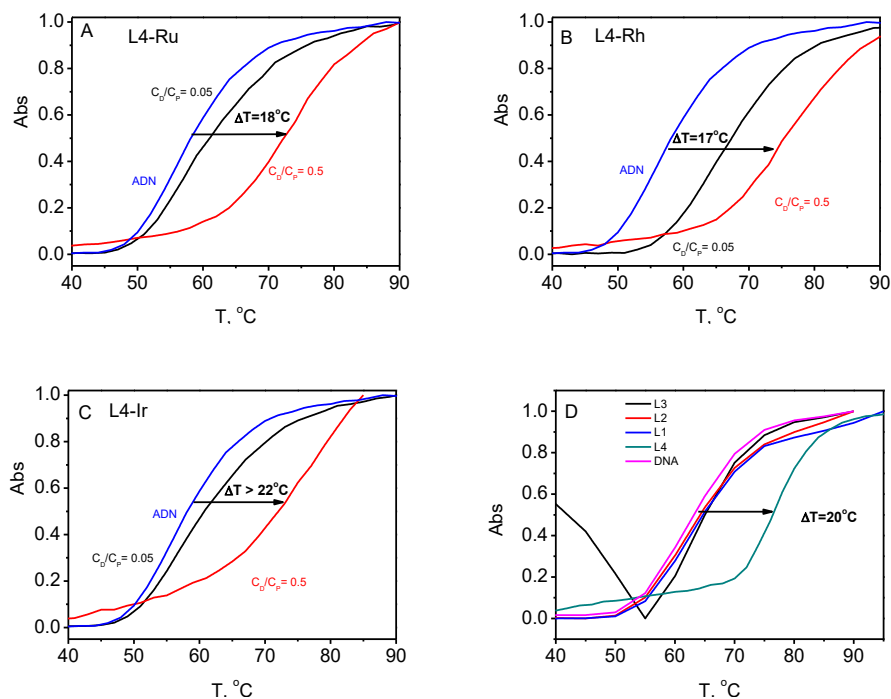


**Figure 19.** Spectral evolution of the systems: A) L4-Ru/DNA. Inset: biexponential curve at 330nm. B) L4-Rh/DNA. C) L4-Ir/DNA. Inset: biexponential fitting curve at 320nm.  $C_D = 3.0 \times 10^{-5}$  M,  $C_P/C_D = 20$ .

### Thermal denaturation by UV-Vis

Thermal denaturation measurements were performed with overnight incubated solutions. They revealed the stabilization of DNA by every complex when the  $C_D/C_P$  ratio rose. Figures 20A to 21C reveal a great increase of melting temperature compared with free DNA,  $\Delta T_m = 18^\circ\text{C}$  with L4-Ru and L4-Rh and  $\Delta T_m > 22^\circ\text{C}$  with L4-Ir. Keeping in mind the complex structures, this stabilization can only be attributable to the intercalation reaction of complexes between the base pairs of DNA, which can be produced through the ancillary ligand.

The Figure 20D exposes how the ligand L4 (green line) stabilizes DNA structure in the same way that its complexes, being  $\Delta T_m = 20^\circ\text{C}$ , whereas the ligands L1, L2 and L3 do not modify DNA melting temperature, in accordance with their low cytotoxicity (see Table 1). Given that the covalent bond between DNA and metal complexes with L4 in their structure has been observed by NMR and UV-Vis, it can be confirmed that the binding of L4-Ru, L4-Rh and L4-Ir to DNA takes place through a bifunctional intercalated-covalent bond.



**Figure 20.** Melting profiles for the A) L4-Ru/DNA, B) L4-Rh/DNA C) L4-Ir/DNA and D) L1, L2, L3 and L4 with DNA at  $C_D/C_P = 0.5$ .  $C_P = 5.7 \times 10^{-5}$  M.

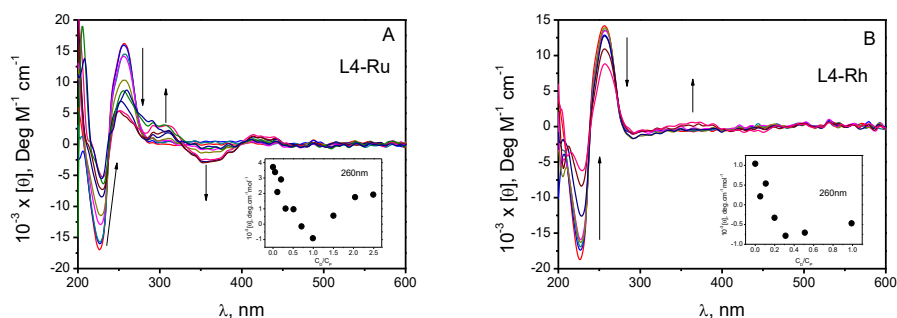
### Circular Dichroism (CD)

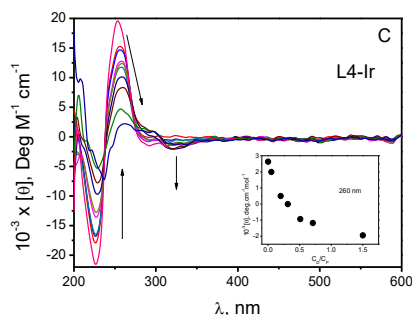
The CD titration of three systems was performed with overnight incubated solutions in a way the covalent bond was formed. Dichroism experiments expose the conformational variation in DNA structure upon drug interaction. In Figure 21 it can be seen how each complex modifies in a different way the DNA spectrum.

The study of L4-Ru/DNA system showed that the molar ellipticity of both negative and positive bands of the DNA spectra decreased as the  $C_D/C_P$  ratio rose (Figure 21A). The spectra recorded evinced three induced circular dichroism bands (ICD), two positive and a negative one, centred at 300nm, 360nm and 425nm, revealing the formation of new species.

L4-Rh provoked the same decreasing effect on the 226 and 257nm DNA bands accompanied by the appearance of a weakly ICD band at 380nm (Figure 21B).

Additionally, L4-Ir produced a reduction of both DNA negative and positive bands accompanied by a 6 nm bathochromic shift (Figure 21C). This behaviour is related to the unwinding of the DNA double helix and is characteristic of intercalation processes. The formation of the L4-Ir/DNA complex also lead to the emergence of a new negative ICD band at 321nm.

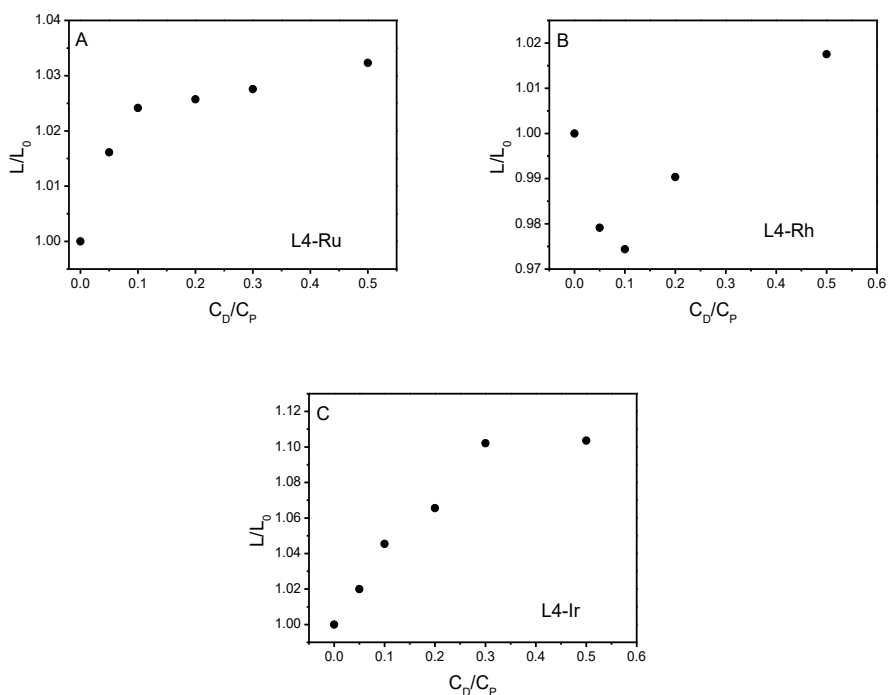




**Figure 21.** CD spectra for A) L4-Ru/DNA, B) L4-Rh/DNA, C) L4-Ir/DNA.  $C_P = 5.73 \times 10^{-5}$  M,  $C_D/C_P = 0 - 2.5$ . Inset: dependence of the molar ellipticity at 260 nm on the  $C_D/C_P$  ratio.

### Viscosity

In order to confirm that the DNA thermal stabilization was produced by an intercalating binding, the study was completed with relative viscosity experiments (Figure 22). Intercalation of a drug between DNA base-pairs causes local unwinding which leads to the increase in the DNA contour length. The titration was carried out waiting two hours among each addition for covalent bond formation. The experiment yielded the binding isotherm for L4-Ru/DNA and L4-Ir/DNA systems and the saturation is reached at  $C_D/C_P = 0.1$  and  $C_D/C_P = 0.3$  respectively. Interestingly, DNA elongation is higher for L4 than for L4-Ru complex. On the other hand, L4-Rh viscosity decreased up to  $C_D/C_P = 0.1$  and then raised, but saturation is not reached due to precipitation phenomena even though at  $C_D/C_P = 0.5$  the relative contour length is the lowest one respecting the other studied complexes. All this confirmed that not only the ligand but also the metal centre has influence in the intercalation process.

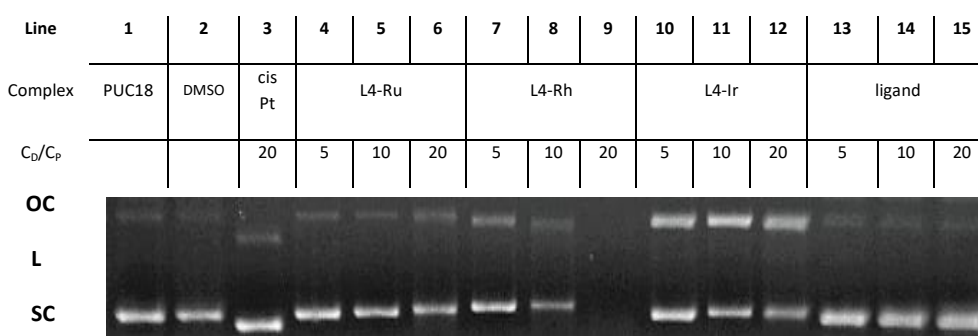


**Figure 22.** Relative elongation obtained for A) L4-Ru/DNA, B) L4-Rh/DNA and C) L4-Ir/DNA systems as a function of the  $C_D/C_P$  ratio.  $C_P^0 = 2.0 \times 10^{-4}$  M.

### *Agarose gel electrophoresis*

Up to now it is clear that not only chrysin as ancillary ligand plays an important function in the toxicity of complexes, but also the metal is relevant due to the formation of covalent bonds. It is known that metal-based anticancer complexes commonly owe their efficacy due to DNA interaction [214,215]. In order to complete the study of complexes L4-Ru, L4-Rh and L4-Ir with DNA, an electrophoresis assay (Figure 23) was carried out monitoring the pUC18 plasmid DNA migration pattern of supercoiled (SC), open circular (OC) and linear forms (L). Lane 1 is the plasmid alone, where it can be seen the mainly SC form migrates more than the small amount of circular DNA. The interaction with DNA results in a decrease of DNA bands fluorescence intensity or changes in the mobility of the bands. For discarding any effect provoked by DMSO, this was tested in lane 2, where the bands are just the same as the plasmid alone. Cisplatin (line 3) was used as a reference for covalent binding, showing the OC and SC bands migrates

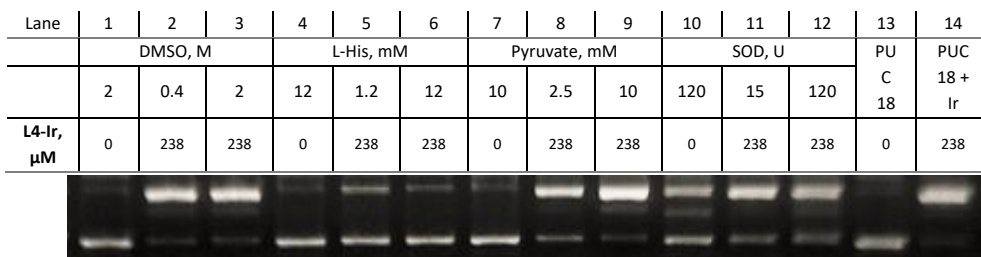
more than free pUC18. L4-Ru (lanes 4-6) and L4-Rh (lanes 7-9) cause dose-dependant retardation in the migration of supercoiled DNA bands which can be related to intercalation processes [216]. When the amount of L4-Rh is increased, a vanishing of the band intensity takes place, pointing out the precipitation of large amount of Rhodium coordinated to DNA. Surprisingly, L4-Ir (lines 10-12) efficiently cleaved supercoiled DNA up rise to an increase in the OC form. These results reinforce the hypothesis that the metal centre plays a key role in the DNA interaction effects.



**Figure 23.** Agarose gel electrophoresis of 20  $\mu$ M pUC18 plasmid incubated overnight at 37°C with DMSO (lane 2), cisplatin (lane 3), L4-Ru (lanes 4-6), L4-Rh (lanes 7-9), L4-Ir (lanes 10-12) and the ligand (lanes 13-15) at different  $C_D/C_P$  ratios.

As it has been seen, only Iridium as metal centre provides the complex with activity as DNA chemical nuclease. The reactive oxygen species (ROS) that take part in DNA cleavage are hydroxyl radical ( $\text{OH}\cdot$ ), superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ). The involvement of these radicals in DNA cleavage by L4-Ir, was assessed adding selective scavengers. So, an electrophoresis was completed with the addition of DMSO which inhibits the cleavage produced by  $\text{OH}\cdot$ , L-Histidine for  $^1\text{O}_2$ , sodium pyruvate for  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and superoxide dismutase, SOD, to prevent  $\text{O}_2^{\cdot-}$  formation. It can be seen in Figure 24 that neither DMSO nor pyruvate are able to inhibit the cleavage produced by L4-Ir. SOD seems to be a partial inhibitor being the bands intensity reduced. However, L-histidine clearly reduce the cleavage activity, revealing  $^1\text{O}_2$  as the highly reactive oxygen species responsible for the DNA damage induced by L4-Ir.

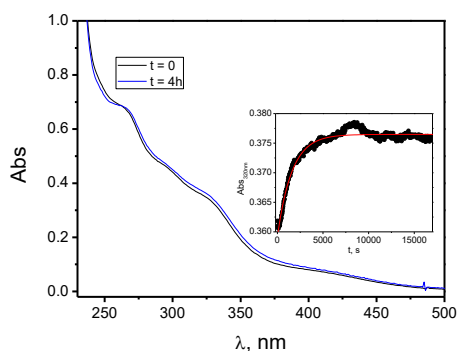
Therefore, DNA cleavage mechanism is O<sub>2</sub> dependent. The oxidative damage observed for L4-Ir is absent for the other complexes and can be determinant for the achieved cytotoxicity results since all the studied complexes are able to interact with DNA but only L4-Ir displays nuclease activity.



**Figure 24.** Agarose gel electrophoresis of 20 μM pUC18 DNA cleavage products after overnight incubation at 37°C of L4-Ir with DMSO (0.4M and 2M), L- histidine (1.2mM and 12mM), sodium pyruvate (2.5mM and 10mM), SOD (15U and 120U). Lane 13 is the control for pUC18 alone, and lane 14 is pUC18 with L4-Ir.

### VI.3.5. Interaction with glutathione

In any case the differences observed in terms of cellular uptake of L4-Rh and L4-Ru are not well correlated with their similar cytotoxicity and DNA binding effects. In order to shed some light on this issue other biological targets were explored. Glutathione (GSH) is a tripeptide present in the cytosol of the cells in millimolar concentrations which could be a target for the complexes. So, the organometallic flavonoids were also investigated with GSH by UV-Vis spectroscopy. L4-Rh is the complex which can interact with GSH as Figure 25 shows. The rate constant obtained from the monoexponential fitting curve is  $(6.33 \pm 0.03) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . This fact pointed out L4-Rh binds GSH and therefore, it can be partially inactivated due to the interaction with the tripeptide hindering DNA interaction [217,218]. This complex has the lowest cytotoxicity even though it is the most accumulated inside the cells. Thus, its lower cellular uptake can be compensated with its dual activity.



**Figure 25.** Kinetic curve of L4-Rh/GSH system.  $C_{\text{GSH}} = 2.44 \times 10^{-4}\text{M}$ ,  $C_{\text{GSH}}/C_{\text{D}} = 10$ .

#### VI.4. CONCLUSIONS

A new class of chrysin derivatives linked to a variety of half sandwich Iridium, Rhodium and Ruthenium complexes have been successfully synthesised and their antiproliferative activity was tested on SW480 and A549 cell lines, resulting the piperidine derivatives L4-Ru, L4-Rh and L4-Ir have the best cytotoxicity. Thus, the ligand 4 is the responsible for the higher toxicity. Then, the piperidine family was further studied with DNA, BSA, and GSH as biological targets just as their cellular uptake in order to discern the influence of metal centre.

All of them interact with double stranded DNA establishing a dual covalent-intercalated bond. The covalent bond through the N7 of the guanine was corroborated by NMR and the intercalated one was confirmed by CD, melting and viscosity experiments.

The cellular uptake revealed the most cytotoxic complex, L4-Ir, was the less accumulated one, which was explained by the interaction with BSA since Iridium complex is sequestered by the serum proteins decreasing its accumulation inside the cells. On the other hand, L4-Ir was the only one able to cleave DNA by an oxygen dependent mechanism since  $^1\text{O}_2$  is generated, explaining its major cytotoxicity.

L4-Rh was the less cytotoxic complex although it is the most internalized by the cells. On the other hand, L4-Rh is the only one able to bind to GSH. This fact



indicates the bioavailability of L4-Rh is diminished due to GSH binding that leads to its inactivation in the cytosol.

On the other hand, the cytotoxicity of L4-Ru, which is very close to that of L4-Rh, correlates well with its cellular uptake, considering the absence of binding with BSA and GSH.



# **VII. General overview**



## GENERAL OVERVIEW

Over this doctoral thesis it has been studied the interaction of biomolecules with an organic ligand and three families of metal complexes, as well as the cytotoxicity of them and the capacity of enter in the cells. With that purpose it has been employed chemist and biological techniques which are complementary to conclude the studies.

Every Chapter includes its conclusions, even so, here are reported some brief highlights. In Chapter III it is necessary underline that although the DNA is the main target of the anticancer drug doxorubicin, its interaction with duplex helix of RNA is 3 times higher than with the double DNA helix. The reaction between doxorubicin and the triple helix of RNA causes the disproportion of it to give the double one and the single Poly(rU) strand, remaining the molecule of DOX intercalated in the double helix.

The Chapter IV evinces the great importance of chemist structure in the biological behaviour of eight half sandwich complexes with benzimidazole ligands and Iridium metal centre, demonstrating that small changes in the composition of the compounds cause high differences in the cytotoxicity and the modes of binding with DNA and proteins. Thus, it is evidencing the importance of basic investigation for a rational antitumoral drug design.

The Chapters V and VI exhibit how the cytotoxic capacity and the modes of binding with polynucleotides of studied metal complexes depend as much on the ligand as on the metal centre. In the Chapter V the cellular uptake is the key factor in the different cytotoxicity of the HNAIP derivative compounds, while in the Chapter VI it is shown the large number of variables which take part in the different modes of action of crisin derivative metal complexes.



# VIII. Bibliografía





- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer., *Cell* (Cambridge, Massachusetts). 100 (2000) 57–70.
- [2] A. Urruticoechea, R. Alemany, J. Balart, A. Villanueva, F. Vinals, G. Capella, Recent advances in cancer therapy: an overview., *Curr. Pharm. Des.* 16 (2010) 3–10.
- [3] M. Rescigno, F. Avogadri, G. Curigliano, Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment., *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer.* 1776 (2007) 108–123.
- [4] C. Brown, Targeted therapy: An elusive cancer target., *Nat.* (London, United Kingdom). 537 (2016) S106–S108.
- [5] L. Benov, Photodynamic therapy: current status and future directions, *Med. Princ. Pract.* 24 Suppl 1 (2015) 14–28.
- [6] H. Brockmann, Anthracyclinone and anthracycline (rhodo-mycinone, pyrromycinone, and their glycosides)., *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* (L. Zechmeister, Ed. Springer, Vienna). 21 (1963) 121–182.
- [7] J. V McGowan, R. Chung, A. Maulik, I. Piotrowska, J.M. Walker, D.M. Yellon, Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity., *Cardiovasc. Drugs Ther.* 31 (2017) 63–75.
- [8] S. Moro, G.L. Beretta, D. Dal Ben, J. Nitiss, M. Palumbo, G. Capranico, Interaction Model for Anthracycline Activity against DNA Topoisomerase II., *Biochemistry.* 43 (2004) 7503–7513.
- [9] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode., *Nat.* (London, United Kingdom). 205 (1965) 698–699.
- [10] A. Eastman, The mechanism of action of cisplatin: from adducts to apoptosis., in: *Cisplatin*, Verlag Helvetica Chimica Acta, 1999: pp. 111–134.
- [11] Y. Jung, S.J. Lippard, Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage., *Chem. Rev.* (Washington, DC, United States). 107 (2007) 1387–1407.
- [12] M. Kartalou, J.M. Essigmann, Mechanisms of resistance to cisplatin., *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 478 (2001) 23–43.
- [13] L. Galluzzi, L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Castedo, G. Kroemer, Molecular mechanisms of cisplatin resistance., *Oncogene.* 31 (2012) 1869–1883.

- [14] N. Metzler-Nolte, Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug by Bernhard Lippert., *Angew. Chemie, Int. Ed.* 40 (2001) 258–259.
- [15] J. Reedijk, Metal-ligand exchange kinetics in platinum and ruthenium complexes. Significance for effectiveness as anticancer drugs., *Platin. Met. Rev.* 52 (2008) 2–11.
- [16] M.J. Clarke, Ruthenium metallopharmaceuticals., *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 69–93.
- [17] Y.K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P.J. Sadler, Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes., *Chem. Commun. (Cambridge, United Kingdom)*. (2005) 4764–4776.
- [18] A. Levina, A. Mitra, P.A. Lay, Recent developments in ruthenium anticancer drugs., *Metallomics*. 1 (2009) 458–470.
- [19] G. Suss-Fink, Arene ruthenium complexes as anticancer agents, *Dalton Trans.* 39 (2010) 1673–1688.
- [20] M. Dobroschke, Y. Geldmacher, I. Ott, M. Harlos, L. Kater, L. Wagner, R. Gust, W.S. Sheldrick, A. Prokop, Cytotoxic rhodium(III) and iridium(III) polypyridyl complexes: structure-activity relationships, antileukemic activity, and apoptosis induction., *ChemMedChem*. 4 (2009) 177–187.
- [21] A.R. Burgoyne, C.H. Kaschula, M.I. Parker, G.S. Smith, In vitro Cytotoxicity of Half-Sandwich Platinum Group Metal Complexes of a Cationic Alkylated Phosphaadamantane Ligand., *Eur. J. Inorg. Chem.* 2016 (2016) 1267–1273.
- [22] C. Perez-Arnaiz, M.I. Acuna, N. Busto, I. Echevarria, M. Martinez-Alonso, G. Espino, B. Garcia, F. Dominguez, Thiabendazole-based Rh(III) and Ir(III) biscyclometallated complexes with mitochondria-targeted anticancer activity and metal-sensitive photodynamic activity., *Eur. J. Med. Chem.* 157 (2018) 279–293.
- [23] G. Solaini, G. Sgarbi, A. Baracca, Oxidative phosphorylation in cancer cells., *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1807 (2011) 534–542.
- [24] F.H. CRICK, On protein synthesis, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12 (1958) 138–163.
- [25] F.H.C. Crick, Central dogma of molecular biology., *Nat. (London, United Kingdom)*. 227 (1970) 561–563.
- [26] C.R. Calladine, H.R. Drew, B.F. Luisi, A.A. Travers, *Understanding DNA: The*

Molecule and How it Works: Third Edition, 2004.

- [27] L. Pray, Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick, *Nat. Educ.* 1 (2008) 100.
- [28] T. Umehara, S. Kuwabara, S. Mashimo, S. Yagihara, Dielectric study on hydration of B-, A-, and Z-DNA., *Biopolymers.* 30 (1990) 649–656.
- [29] R.D. Kornberg, Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA, *Science.* 184 (1974) 868–871.
- [30] D. Renneberg, C.J. Leumann, Exploring Hoogsteen and reversed-Hoogsteen duplex and triplex formation with tricyclo-DNA purine sequences, *Chembiochem.* 5 (2004) 1114–1118.
- [31] A. Jain, G. Wang, K.M. Vasquez, DNA triple helices: Biological consequences and therapeutic potential., *Biochimie.* 90 (2008) 1117–1130.
- [32] H.E. Moser, P.B. Dervan, Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation., *Sci. (Washington, DC, United States).* 238 (1987) 645–650.
- [33] V. Sklenar, J. Feigon, Formation of a stable triplex from a single DNA strand., *Nat. (London, United Kingdom).* 345 (1990) 836–838.
- [34] C. Ehresmann, F. Baudin, M. Mougel, P. Romby, J.P. Ebel, B. Ehresmann, Probing the structure of RNAs in solution., *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 9109–9128.
- [35] G. Bischoff, S. Hoffmann, DNA-binding of drugs used in medicinal therapies., *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 321–348.
- [36] A. Paul, S. Bhattacharya, Chemistry and biology of DNA-binding small molecules., *Curr. Sci.* 102 (2012) 212–231.
- [37] Y. Huang, L. Li, DNA crosslinking damage and cancer - a tale of friend and foe., *Transl. Cancer Res.* 2 (2013) 144–154.
- [38] S.R. Rajski, R.M. Williams, DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs, *Chem. Rev.* 98 (1998) 2723–2796.
- [39] D.M. Noll, T. McGregor Mason, P.S. Miller, Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA., *Chem. Rev. (Washington, DC, United States).* 106 (2006) 277–301.
- [40] L. Strekowski, B. Wilson, Noncovalent interactions with DNA: An

- overview., *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 623 (2007) 3–13.
- [41] S.M. Nelson, L.R. Ferguson, W.A. Denny, Non-covalent ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents., *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 623 (2007) 24–40.
- [42] G.S. Khan, A. Shah, Zia-ur-Rehman, D. Barker, Chemistry of DNA minor groove binding agents., *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 115 (2012) 105–118.
- [43] F. Hamy, U. Asseline, J. Grasby, S. Iwai, C. Pritchard, G. Slim, J.G. Butler, J. Karn, M.J. Gait, Hydrogen-bonding contacts in the major groove are required for human immunodeficiency virus type-1 tat protein recognition of TAR RNA., *J. Mol. Biol.* 230 (1993) 111–123.
- [44] A.H.J. Wang, Intercalative drug binding to DNA., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1992) 361–368.
- [45] S. Li, V.R. Cooper, T. Thonhauser, B.I. Lundqvist, D.C. Langreth, Stacking Interactions and DNA Intercalation., *J. Phys. Chem. B.* 113 (2009) 11166–11172.
- [46] E.C. Long, J.K. Barton, On demonstrating DNA intercalation., *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 271–273.
- [47] U. Kragh-Hansen, Molecular aspects of ligand binding to serum albumin., *Pharmacol. Rev.* 33 (1981) 17–53.
- [48] T. Topala, A. Bodoki, L. Oprean, R. Oprean, Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes, *Clujul Med.* 87 (2014) 215–219.
- [49] V.I. Lushchak, Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions., *J. Amino Acids.* (2012) 736837, 26 .
- [50] N. Braidy, J. Berg, J. Clement, F. Khorshidi, A. Poljak, T. Jayasena, R. Grant, P. Sachdev, Role of Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Related Precursors as Therapeutic Targets for Age-Related Degenerative Diseases: Rationale, Biochemistry, Pharmacokinetics, and Outcomes., *Antioxid. Redox Signal.* 30 (2019) 251–294.
- [51] M.E. Reichmann, C.A. Rice, C.A. Thomas, P. Doty, A further examination of the molecular weight and size of deoxypentose nucleic acid., *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 3047–3053.
- [52] B. Janik, *Physicochemical Characteristics of Oligonucleotides and Polynucleotides.*, IFI/Plenum, 1971.

- [53] G. Felsenfeld, D.R. Davies, A. Rich, Formation of a three-stranded polynucleotide molecule., *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 2023–2024.
- [54] C.L. Stevens, G. Felsenfeld, The conversion of two -stranded poly (A + U) to three-strand poly (A + 2U) and poly A by heat., *Biopolymers.* 2 (1964) 293–314.
- [55] J.D. McGhee, P.H. Von Hippel, Theoretical aspects of DNA-protein interactions. Cooperative and noncooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice., *J. Mol. Biol.* 86 (1974) 469–489.
- [56] W.D. Wilson, F.A. Tanious, M. Fernandez-Saiz, C.T. Rigl, Evaluation of drug-nucleic acid interactions by thermal melting curves., *Methods Mol. Biol.* (Totowa, New Jersey). 90 (1997) 219–240.
- [57] J.-L. Mergny, L. Lacroix, Analysis of thermal melting curves., *Oligonucleotides.* 13 (2003) 515–537.
- [58] Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, OECD, 1995.
- [59] C. Albrecht, Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition, Joseph R. Lakowicz, editor., *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1223–1224.
- [60] G.D. Fasman, Editor., *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules.*, Plenum, 1996.
- [61] P.J. Stephens, *Circular Dichroism: Principles and Applications.* Second Edition. Edited by Nina Berova (Columbia University), Koji Nakanishi (Columbia University), and Robert W. Woody (Colorado State University). Wiley-VCH: New York. 2000. xxii + 878 pp. \$195.00. ISBN: 0, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 8182.
- [62] S.R. Martin, M.J. Schilstra, Circular dichroism and its application to the study of biomolecules., *Methods Cell Biol.* 84 (2008) 263–293.
- [63] N. Holmgaard List, J. Knoop, J. Rubio-Magnieto, J. Ide, D. Beljonne, P. Norman, M. Surin, M. Linares, Origin of DNA-Induced Circular Dichroism in a Minor-Groove Binder., *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 14947–14953.
- [64] P. Gabbott, Editor., *Principles and Applications of Thermal Analysis.*, Blackwell Publishing Ltd., 2008.
- [65] G. Bruylants, J. Wouters, C. Michaux, Differential scanning calorimetry in life science: Thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design., *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 2011–2020.

- [66] C.H. Spink, Differential scanning calorimetry, *Methods Cell Biol.* 84 (2008) 115–141.
- [67] A.D. Robertson, K.P. Murphy, Protein Structure and the Energetics of Protein Stability., *Chem. Rev. (Washington, D. C.)*. 97 (1997) 1251–1267.
- [68] E.A. Lewis, K.P. Murphy, Isothermal titration calorimetry, *Methods Mol. Biol.* 305 (2005) 1–16.
- [69] N.E. Grosseohme, A.M. Spuches, D.E. Wilcox, Application of isothermal titration calorimetry in bioinorganic chemistry., *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 15 (2010) 1183–1191.
- [70] L. Werber, Y. Mastai, Isothermal titration calorimetry for chiral chemistry., *Chirality*. 30 (2018) 619–631.
- [71] J.E. Ladbury, B.Z. Chowdhry, Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions., *Chem. Biol.* 3 (1996) 791–801.
- [72] G. Cohen, H. Eisenberg, Viscosity and sedimentation study of sonicated DNA-proflavine complexes., *Biopolymers*. 8 (1969) 45–55.
- [73] D. Suh, J.B. Chaires, Criteria for the mode of binding of DNA binding agents., *Bioorg. Med. Chem.* 3 (1995) 723–728.
- [74] R. Rigler, C.R. Rabl, T.M. Jovin, Temperature-jump apparatus for fluorescence measurements., *Rev. Sci. Instrum.* 45 (1974) 580–588.
- [75] J.F. Eccleston, S.R. Martin, M.J. Schilstra, Rapid kinetic techniques., *Methods Cell Biol.* 84 (2008) 445–477.
- [76] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein., *Protein Sci.* 4 (1995) 2411–2423.
- [77] J.T. Corthell, J.T. Corthell, Agarose Gel Electrophoresis, *Basic Mol. Protoc. Neurosci. Tips, Tricks, Pitfalls.* (2014) 21–25.
- [78] C. Li, T. Arakawa, Application of native polyacrylamide gel electrophoresis for protein analysis: Bovine serum albumin as a model protein, *Int. J. Biol. Macromol.* 125 (2019) 566–571.
- [79] A. Bal-Price, S. Coecke, Guidance on good cell culture practice (GCCP)., *Neuromethods*. 56 (2011) 1–25.
- [80] J. van Meerloo, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Cell sensitivity assays: the MTT

- assay., *Methods Mol. Biol.* (New York, NY, United States). 731 (2011) 237–245.
- [81] R. Thomas, *A beginner's guide to ICP-MS Part I., Spectrosc.* (Duluth, MN, United States). 16 (2001) 38,40-42.
- [82] P.-K. Lee, W.H.-T. Law, H.-W. Liu, K.K.-W. Lo, Luminescent cyclometalated iridium(III) polypyridine di-2-picolyamine complexes: synthesis, photophysics, electrochemistry, cation binding, cellular internalization, and cytotoxic activity, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 8570–8579.
- [83] A.E. Egger, C. Rappel, M.A. Jakupec, C.G. Hartinger, P. Heffeter, B.K. Keppler, Development of an experimental protocol for uptake studies of metal compounds in adherent tumor cells., *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 51–61.
- [84] A. Di Marco, M. Gaetani, B. Scarpinato, Adriamycin; antibiotic with antitumor activity., *Cancer Chemother. Reports.* 53 (1969) 33–37.
- [85] C. Carvalho, R.X. Santos, S. Cardoso, S. Correia, P.J. Oliveira, M.S. Santos, P.I. Moreira, Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect., *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 3267–3285.
- [86] C.F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T.E. Klein, R.B. Altman, Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects., *Pharmacogenet. Genomics.* 21 (2011) 440–446.
- [87] Y. Octavia, C.G. Tocchetti, K.L. Gabrielson, S. Janssens, H.J. Crijns, A.L. Moens, Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52 (2012) 1213–1225.
- [88] Y. Pommier, E. Leo, H.-L. Zhang, C. Marchand, DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs., *Chem. Biol.* (Cambridge, MA, United States). 17 (2010) 421–433.
- [89] O. Tacar, P. Sriamornsak, C.R. Dass, Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems., *J. Pharm. Pharmacol.* 65 (2013) 157–170.
- [90] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity., *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 185–229.
- [91] C. Perez-Arnaiz, N. Busto, J.M. Leal, B. Garcia, New Insights into the Mechanism of the DNA/Doxorubicin Interaction., *J. Phys. Chem. B.* 118

(2014) 1288–1295.

- [92] S. Fulle, H. Gohlke, Molecular recognition of RNA: challenges for modeling interactions and plasticity., *J. Mol. Recognit.* 23 (2010) 220–231.
- [93] D.P. Bartel, *MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function.*, Cell (Cambridge, MA, United States). 116 (2004) 281–297.
- [94] C.C. Esau, B.P. Monia, Therapeutic potential for microRNAs., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 101–114.
- [95] Y. Tor, Targeting RNA with small molecules., *ChemBioChem.* 4 (2003) 998–1007.
- [96] F.A. Buske, J.S. Mattick, T.L. Bailey, Potential in vivo roles of nucleic acid triple-helices., *RNA Biol.* 8 (2011) 427–439.
- [97] H. Xi, E. Davis, N. Ranjan, L. Xue, D. Hyde-Volpe, D.P. Arya, Thermodynamics of Nucleic Acid “Shape Readout” by an Aminosugar., *Biochemistry.* 50 (2011) 9088–9113.
- [98] D. Bhowmik, S. Das, M. Hossain, L. Haq, G.S. Kumar, Biophysical characterization of the strong stabilization of the RNA triplex poly(U)·poly(A)\*poly(U) by 9-O-( $\omega$ -amino) alkyl ether berberine analogs., *PLoS One.* 7 (2012) e37939.
- [99] B. Garcia, J.M. Leal, V. Paiotta, R. Ruiz, F. Secco, M. Venturini, Role of the Third Strand in the Binding of Proflavine and Pt-Proflavine to Poly(rA)·2poly(rU): A Thermodynamic and Kinetic Study., *J. Phys. Chem. B.* 112 (2008) 7132–7139.
- [100] B. Garcia, J.M. Leal, V. Paiotta, S. Ibeas, R. Ruiz, F. Secco, M. Venturini, Intercalation of ethidium into triple-strand poly(rA)·2ply(rU): a thermodynamic and kinetic study., *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 16131–16138.
- [101] R. Sinha, G.S. Kumar, Interaction of Isoquinoline Alkaloids with an RNA Triplex: Structural and Thermodynamic Studies of Berberine, Palmatine, and Coralyne Binding to Poly(U)·Poly(A)\*Poly(U)., *J. Phys. Chem. B.* 113 (2009) 13410–13420.
- [102] H.J. Lozano, B. García, N. Busto, J.M. Leal, Interaction of Thionine with Triple-, Double-, and Single-Stranded RNAs, *J. Phys. Chem. B.* 117 (2013) 38–48.
- [103] T. Biver, A. Boggioni, B. Garcia, J.M. Leal, R. Ruiz, F. Secco, M. Venturini,



- New aspects of the interaction of the antibiotic coralyne with RNA: coralyne induces triple helix formation in poly(rA)·poly(rU)., *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 1697–1710.
- [104] F.J. Hoyuelos, B. Garcia, J.M. Leal, N. Busto, T. Biver, F. Secco, M. Venturini, RNA triplex-to-duplex and duplex-to-triplex conversion induced by coralyne., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 6012–6018.
- [105] J.C. Canzoneri, A.K. Oyelere, Interaction of anthracyclines with iron responsive element mRNAs., *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 6825–6834.
- [106] J.C. Kwok, D.R. Richardson, Unexpected anthracycline-mediated alterations in iron-regulatory protein-RNA-binding activity: the iron and copper complexes of anthracyclines decrease RNA-binding activity., *Mol. Pharmacol.* 62 (2002) 888–900.
- [107] R.J. Marcheschi, K.D. Mouzakis, S.E. Butcher, Selection and Characterization of Small Molecules that Bind the HIV-1 Frameshift Site RNA., *ACS Chem. Biol.* 4 (2009) 844–854.
- [108] D. Agudelo, P. Bourassa, M. Beauregard, G. Berube, H.-A. Tajmir-Riahi, tRNA binding to antitumor drug doxorubicin and its analogue., *PLoS One.* 8 (2013) e69248.
- [109] V. Bagalkot, O.C. Farokhzad, R. Langer, S. Jon, An aptamer\doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform., *Angew. Chemie, Int. Ed.* 45 (2006) 8149–8152.
- [110] H.A. Benesi, J.H. Hildebrand, A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons., *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 2703–2707.
- [111] A. Tikhomirova, T. V Chalikian, Probing Hydration of Monovalent Cations Condensed Around Polymeric Nucleic Acids., *J. Mol. Biol.* 341 (2004) 551–563.
- [112] J.M. Saucier, B. Festy, J.B. Le Pecq, Change of the torsion of the DNA helix caused by intercalation. II. Measurement of the relative change of torsion induced by various intercalating drugs., *Biochimie.* 53 (1971) 973–980.
- [113] R.D. Blake, J.R. Fresco, Polynucleotides. VII. Spectrophotometric study of the kinetics of formation of the two-stranded helical complex resulting from the interaction of poly(riboadenylate) and poly(ribouridylylate)., *J. Mol. Biol.* 19 (1966) 145–160.
- [114] M.T. Record Jr., C.F. Anderson, T.M. Lohman, Thermodynamic analysis of

ion effects on the binding and conformational equilibriums of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity., *Q. Rev. Biophys.* 11 (1978) 103–178.

- [115] C.-H. Leung, H.-J. Zhong, D.S.-H. Chan, D.-L. Ma, Bioactive iridium and rhodium complexes as therapeutic agents., *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 1764–1776.
- [116] I. Ott, R. Gust, Preclinical and clinical studies on the use of platinum complexes for breast cancer treatment., *Anticancer. Agents Med. Chem.* 7 (2007) 95–110.
- [117] D. Wang, S.J. Lippard, Cellular processing of platinum anticancer drugs., *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 307–320.
- [118] S.J. Berners-Price, Activating Platinum Anticancer Complexes with Visible Light., *Angew. Chemie, Int. Ed.* 50 (2011) 804–805.
- [119] L. Kelland, The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy., *Nat. Rev. Cancer.* 7 (2007) 573–584.
- [120] S. Dasari, P. Bernard Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action., *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 364–378.
- [121] W. Kandioller, C.G. Hartinger, A.A. Nazarov, C. Bartel, M. Skocic, M.A. Jakupec, V.B. Arion, B.K. Keppler, Maltol-Derived Ruthenium-Cymene Complexes with Tumor Inhibiting Properties: The Impact of Ligand-Metal Bond Stability on Anticancer Activity In Vitro., *Chem. - A Eur. J.* 15 (2009) 12283–12291, S12283/1–S12283/32.
- [122] S.H. van Rijt, P.J. Sadler, Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs., *Drug Discov. Today.* 14 (2009) 1089–1097.
- [123] K.H. Thompson, C. Orvig, Boon and Bane of Metal Ions in Medicine., *Sci. (Washington, DC, United States).* 300 (2003) 936–939.
- [124] T.W. Hambley, Metal-Based Therapeutics., *Sci. (Washington, DC, United States).* 318 (2007) 1392–1393.
- [125] G.S. Yellol, A. Donaire, J.G. Yellol, V. Vasylyeva, C. Janiak, J. Ruiz, On the antitumor properties of novel cyclometalated benzimidazole Ru(II), Ir(III) and Rh(III) complexes, *Chem. Commun. (Camb).* 49 (2013) 11533–11535.
- [126] S. Medici, M. Peana, V.M. Nurchi, J.I. Lachowicz, G. Crisponi, M.A. Zoroddu, Noble metals in medicine: Latest advances., *Coord. Chem. Rev.*

- 284 (2015) 329–350.
- [127] A. Wilbuer, D.H. Vlecken, D.J. Schmitz, K. Kraeling, K. Harms, C.P. Bagowski, E. Meggers, Iridium Complex with Antiangiogenic Properties., *Angew. Chemie, Int. Ed.* 49 (2010) 3839–3842, S3839/1–S3839/41.
- [128] C. Pérez-Arnaiz, M.I. Acuña, N. Busto, I. Echevarría, M. Martínez-Alonso, G. Espino, B. García, F. Domínguez, Thiabendazole-based Rh(III) and Ir(III) biscyclometallated complexes with mitochondria-targeted anticancer activity and metal-sensitive photodynamic activity, *Eur. J. Med. Chem.* 157 (2018) 279–293.
- [129] C. Wang, J. Liu, Z. Tian, M. Tian, L. Tian, W. Zhao, Z. Liu, Half-Sandwich Iridium N-Heterocyclic Carbene Anticancer Complexes., *Dalt. Trans.* (2017) Ahead of Print.
- [130] W. Su, X. Wang, X. Lei, Q. Xiao, S. Huang, P. Li, Synthesis, characterization, cytotoxic activity of half-sandwich rhodium(III), and iridium(III) complexes with curcuminoids., *J. Organomet. Chem.* 833 (2017) 54–60.
- [131] S.B. Gajera, J. V Mehta, P. Thakor, V.R. Thakkar, P.C. Chudasama, J.S. Patel, M.N. Patel, Half-sandwich iridium(III) complexes with pyrazole-substituted heterocyclic frameworks and their biological applications., *New J. Chem.* 40 (2016) 9968–9980.
- [132] A. Paul, R.K. Gupta, M. Dubey, G. Sharma, B. Koch, G. Hundal, M.S. Hundal, D.S. Pandey, Potential apoptosis inducing agents based on a new benzimidazole schiff base ligand and its dicopper(II) complex., *RSC Adv.* 4 (2014) 41228–41236.
- [133] Y. Bansal, O. Silakari, The therapeutic journey of benzimidazoles: A review., *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 6208–6236.
- [134] Z. Liu, P.J. Sadler, Organoiridium Complexes: Anticancer Agents and Catalysts., *Acc. Chem. Res.* 47 (2014) 1174–1185.
- [135] G. Sipos, R. Dorta, Iridium complexes with monodentate N-heterocyclic carbene ligands., *Coord. Chem. Rev.* 375 (2018) 13–68.
- [136] Y. Yang, L. Guo, Z. Tian, Y. Gong, H. Zheng, S. Zhang, Z. Xu, X. Ge, Z. Liu, Novel and Versatile Imine-N-Heterocyclic Carbene Half-Sandwich Iridium(III) Complexes as Lysosome-Targeted Anticancer Agents., *Inorg. Chem.* 57 (2018) 11087–11098.
- [137] G.S. Yellol, J.G. Yellol, V.B. Kenche, X.M. Liu, K.J. Barnham, A. Donaire, C. Janiak, J. Ruiz, Synthesis of 2-Pyridyl-benzimidazole Iridium(III),

- Ruthenium(II), and Platinum(II) Complexes. Study of the Activity as Inhibitors of Amyloid- $\beta$  Aggregation and Neurotoxicity Evaluation., *Inorg. Chem.* 54 (2015) 470–475.
- [138] H. Zhang, L. Guo, Z. Tian, M. Tian, S. Zhang, Z. Xu, P. Gong, X. Zheng, J. Zhao, Z. Liu, Significant effects of counteranions on the anticancer activity of iridium(III) complexes., *Chem. Commun. (Cambridge, United Kingdom)*. 54 (2018) 4421–4424.
- [139] Z. Liu, A. Habtemariam, A.M. Pizarro, S.A. Fletcher, A. Kisova, O. Vrana, L. Salassa, P.C.A. Bruijninx, G.J. Clarkson, V. Brabec, P.J. Sadler, Organometallic half-sandwich iridium anticancer complexes., *J. Med. Chem.* 54 (2011) 3011–3026.
- [140] Q. Du, L. Guo, M. Tian, X. Ge, Y. Yang, X. Jian, Z. Xu, Z. Tian, Z. Liu, Potent Half-Sandwich Iridium(III) and Ruthenium(II) Anticancer Complexes Containing a P-O-Chelated Ligand., *Organometallics*. 37 (2018) 2880–2889.
- [141] J. Li, M. Tian, Z. Tian, S. Zhang, C. Yan, C. Shao, Z. Liu, Half-Sandwich Iridium(III) and Ruthenium(II) Complexes Containing P-P-Chelating Ligands: A New Class of Potent Anticancer Agents with Unusual Redox Features, *Inorg. Chem.* 57 (2018) 1705–1716.
- [142] G. Ludwig, G.N. Kaluderovic, T. Rueffer, M. Bette, M. Korb, M. Block, R. Paschke, H. Lang, D. Steinborn, Cationic arene ruthenium(II) complexes with chelating P-functionalized alkyl phenyl sulfide and sulfoxide ligands as potent anticancer agents., *Dalt. Trans.* 42 (2013) 3771–3774.
- [143] N. Yamamoto, Y. Sato, Y. Kayaki, T. Ikariya, Synthesis and Reactivity of Cp\*Ir(III) Complexes with a C-S Chelate Displaying Metal/Sulfur Bifunctionality., *Organometallics*. (2018) Ahead of Print.
- [144] Z. Liu, A. Habtemariam, A.M. Pizarro, G.J. Clarkson, P.J. Sadler, Organometallic Iridium(III) Cyclopentadienyl Anticancer Complexes Containing C,N-Chelating Ligands., *Organometallics*. 30 (2011) 4702–4710.
- [145] H. Green, DI-p-CHLORO-BIS[(t'-PENTA-METHYLCYCLOPENTADIENYL)CHLORORUTHENIUM(III)], ICp\*RuC12]2 AND DI-p-METHOXO-BIS(t'-PENTAMETHYLCYCLO-PENTADIENYL)DIRUTHENIUM(II), [Cp\*RuOMe], in: *Inorg. Synth.*, 1992: pp. 37–40.
- [146] H.N. Po, N.M. Senozan, The Henderson-Hasselbalch equation: its history and limitations., *J. Chem. Educ.* 78 (2001) 1499–1503.

- [147] K.-P. Ang, A spectrophotometric method for the determination of overlapping ionization constants., *J. Phys. Chem.* 62 (1958) 1109–1112.
- [148] I. Cassells, T. Stringer, A.T. Hutton, S. Prince, G.S. Smith, Impact of various lipophilic substituents on ruthenium(II), rhodium(III) and iridium(III) salicylaldimine-based complexes: synthesis, in vitro cytotoxicity studies and DNA interactions., *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 23 (2018) 763–774.
- [149] F. Wang, H. Chen, S. Parsons, I.D.H. Oswald, J.E. Davidson, P.J. Sadler, Kinetics of aquation and anation of ruthenium(II) arene anticancer complexes, acidity and X-ray structures of aqua adducts., *Chem. - A Eur. J.* 9 (2003) 5810–5820.
- [150] H. Chen, J.A. Parkinson, R.E. Morris, P.J. Sadler, Highly Selective Binding of Organometallic Ruthenium Ethylenediamine Complexes to Nucleic Acids: Novel Recognition Mechanisms., *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 173–186.
- [151] L.H. Hurley, Editor., *Advances in DNA Sequence Specific Agents*, Vol. 1., Jai Press, 1992.
- [152] R. Ruiz, B. Garcia, J. Garcia-Tojal, N. Busto, S. Ibeas, J.M. Leal, C. Martins, J. Gaspar, J. Borrás, R. Gil-García, M. Gonzalez-Alvarez, Biological assays and noncovalent interactions of pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazonecopper(II) drugs with [poly(dA-dT)]<sub>2</sub>, [poly(dG-dC)]<sub>2</sub>, and calf thymus DNA., *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 15 (2010) 515–532.
- [153] N. Busto, B. Garcia, J.M. Leal, J.F. Gaspar, C. Martins, A. Boggioni, F. Secco, ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxy acridine) forms three complexes in the presence of DNA., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 19534–19545.
- [154] M.N. Patel, C.R. Patel, H.N. Joshi, K.P. Thakor, DNA interaction and cytotoxic activities of square planar platinum(II) complexes with N,S-donor ligands., *Spectrochim. Acta, Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 127 (2014) 261–267.
- [155] N. Busto, J. Valladolid, M. Martínez-Alonso, H.J. Lozano, F.A. Jalón, B.R. Manzano, A.M. Rodríguez, M.C. Carrión, T. Biver, J.M. Leal, G. Espino, B. García, Anticancer Activity and DNA Binding of a Bifunctional Ru(II) Arene Aqua-Complex with the 2,4-Diamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine Ligand, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 9962–9974.
- [156] C. Perez-Arnaiz, J. Leal, N. Busto, M.C. Carrion, A.R. Rubio, I. Ortiz, G. Barone, B. Diaz de Grenu, J. Santolaya, J.M. Leal, M. Vaquero, F.A. Jalón, B.R. Manzano, B. Garcia, Role of Seroalbumin in the Cytotoxicity of cis-Dichloro Pt(II) Complexes with (N,N)-Donor Ligands Bearing

Functionalized Tails., *Inorg. Chem.* 57 (2018) 6124–6134.

- [157] Y. Cheng, Y. Qi, Current Progresses in Metal-based Anticancer Complexes as Mammalian TrxR Inhibitors., *Anticancer. Agents Med. Chem.* 17 (2017) 1046–1069.
- [158] J.-X. Liang, H.-J. Zhong, G. Yang, K. Vellaisamy, D.-L. Ma, C.-H. Leung, Recent development of transition metal complexes with in vivo antitumor activity., *J. Inorg. Biochem.* 177 (2017) 276–286.
- [159] C. Riccardi, D. Musumeci, C. Irace, L. Paduano, D. Montesarchio, Ru(II) Complexes for Anticancer Therapy: The Importance of Being Nucleolipidic., *European J. Org. Chem.* 2017 (2017) 1100–1119.
- [160] A.R. Timerbaev, Role of metallomic strategies in developing ruthenium anticancer drugs., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 547–554.
- [161] C.G. Hartinger, M.A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessler, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P.J. Dyson, B.K. Keppler, KP1019, a new redox-active anticancer agent - preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients., *Chem. Biodivers.* 5 (2008) 2140–2155.
- [162] T. Marzo, D. Cirri, C. Gabbiani, T. Gamberi, F. Magherini, A. Pratesi, A. Guerri, T. Biver, F. Binacchi, M. Stefanini, A. Arcangeli, L. Messori, Auranofin, Et<sub>3</sub>PAuCl, and Et<sub>3</sub>PAuI Are Highly Cytotoxic on Colorectal Cancer Cells: A Chemical and Biological Study., *ACS Med. Chem. Lett.* 8 (2017) 997–1001.
- [163] M. Singla, R. Ranjan, K. Mahiya, S.C. Mohapatra, S. Ahmad, Nitric oxide inhibition, antioxidant, and antitumor activities of novel copper(II) bis-benzimidazole diamide nanocoordination complexes., *New J. Chem.* 39 (2015) 4316–4327.
- [164] A. Shanmugapriya, R. Jain, D. Sabarinathan, G. Kalaiarasi, F. Dallemer, R. Prabhakaran, Structurally different mono-, bi- and trinuclear Pd(II) complexes and their DNA/protein interaction, DNA cleavage, and anti-oxidant, anti-microbial and cytotoxic studies., *New J. Chem.* 41 (2017) 10324–10338.
- [165] T.-S. Kang, Z. Mao, C.-T. Ng, M. Wang, W. Wang, C. Wang, S.M.-Y. Lee, Y. Wang, C.-H. Leung, D.-L. Ma, Identification of an Iridium(III)-Based Inhibitor of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ., *J. Med. Chem.* 59 (2016) 4026–4031.
- [166] L. Lu, L.-J. Liu, W. Chao, H.-J. Zhong, M. Wang, X.-P. Chen, J.-J. Lu, R. Li, D.-L. Ma, C.-H. Leung, Identification of an iridium(III) complex with anti-

- bacterial and anti-cancer activity., *Sci. Rep.* 5 (2015) 14544.
- [167] G. Gupta, G. Sharma, B. Koch, S. Park, S.S. Lee, J. Kim, Syntheses, characterization and molecular structures of novel Ru(II), Rh(III) and Ir(III) complexes and their possible roles as antitumour and cytotoxic agents., *New J. Chem.* 37 (2013) 2573–2581.
- [168] G.H. Ribeiro, L. Colina-Vegas, J.C.T. Clavijo, J. Ellena, M.R. Cominetti, A.A. Batista, Ru(II)/N-N/PPh<sub>3</sub> complexes as potential anticancer agents against MDA-MB-231 cancer cells (N-N = diimine or diamine)., *J. Inorg. Biochem.* 193 (2019) 70–83.
- [169] J. Valladolid, C. Hortigueela, N. Busto, G. Espino, A.M. Rodriguez, J.M. Leal, F.A. Jalon, B.R. Manzano, A. Carbayo, B. Garcia, Phenanthroline ligands are biologically more active than their corresponding ruthenium(ii) arene complexes., *Dalt. Trans.* 43 (2014) 2629–2645.
- [170] Z. Liu, I. Romero-Canelon, B. Qamar, J.M. Hearn, A. Habtemariam, N.P.E. Barry, A.M. Pizarro, G.J. Clarkson, P.J. Sadler, The Potent Oxidant Anticancer Activity of Organoiridium Catalysts., *Angew. Chemie, Int. Ed.* 53 (2014) 3941–3946.
- [171] J.M. Zimbron, K. Passador, B. Gatin-Fraudet, C.-M. Bachelet, D. Plazuk, L.-M. Chamoreau, C. Botuha, S. Thorimbert, M. Salmain, Synthesis, Photophysical Properties, and Living Cell Imaging of Theranostic Half-Sandwich Iridium-4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) Dyads., *Organometallics.* 36 (2017) 3435–3442.
- [172] S. Gencaslan, W.S. Sheldrick, Bifunctional bioorganometallic iridium(III)-platinum(II) complexes incorporating both intercalative and covalent DNA binding capabilities., *Eur. J. Inorg. Chem.* (2005) 3840–3849.
- [173] J.M. Hearn, I. Romero-Canelon, B. Qamar, Z. Liu, I. Hands-Portman, P.J. Sadler, Organometallic Iridium(III) Anticancer Complexes with New Mechanisms of Action: NCI-60 Screening, Mitochondrial Targeting, and Apoptosis., *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 1335–1343.
- [174] Z. Liu, I. Romero-Canelon, A. Habtemariam, G.J. Clarkson, P.J. Sadler, Potent Half-Sandwich Iridium(III) Anticancer Complexes Containing C N-Chelated and Pyridine Ligands., *Organometallics.* 33 (2014) 5324–5333.
- [175] L. Salassa, Polypyridyl Metal Complexes with Biological Activity., *Eur. J. Inorg. Chem.* 2011 (2011) 4931–4947.
- [176] H. Liang, T. Hao, C. Yin, X. Yang, H. Fu, X. Zheng, R. Li, D. Xiao, H. Chen, Cyclometalated Rhodium(III) Complexes Based on Substituted 2-

Phenylpyridine Ligands: Synthesis, Structures, Photophysics, Electrochemistry, and DNA-Binding Properties., *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017 (2017) 4149–4157.

- [177] B.A. Jackson, J.K. Barton, Recognition of DNA Base Mismatches by a Rhodium Intercalator., *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 12986–12987.
- [178] X.-Y. Wang, S. Ma, Y. He, 1-(1 H -Imidazo[4,5- f ][1,10]phenanthrolin-2-yl)naphthalen-2-ol, *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online.* 67 (2011) o725–o725.
- [179] J.-G. Liu, B.-H. Ye, Q.-L. Zhang, X.-H. Zou, Q.-X. Zhen, X. Tian, L.-N. Ji, Enantiomeric ruthenium(II) complexes binding to DNA: binding modes and enantioselectivity., *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 5 (2000) 119–128.
- [180] J.-G. Liu, B.-H. Ye, H. Li, Q.-X. Zhen, L.-N. Ji, Y.-H. Fu, Polypyridyl ruthenium(II) complexes containing intramolecular hydrogen-bond ligand: syntheses, characterization, and DNA-binding properties., *J. Inorg. Biochem.* 76 (1999) 265–271.
- [181] S. Sprouse, K.A. King, P.J. Spellane, R.J. Watts, Photophysical effects of metal-carbon  $\sigma$  bonds in ortho-metalated complexes of iridium(III) and rhodium(III)., *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 6647–6653.
- [182] M. Nonoyama, [Benzo[h]quinolin-10-yl-N]iridium(III) complexes., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 47 (1974) 767–768.
- [183] M. Martinez-Alonso, N. Busto, L. Berlanga, J. V Cuevas, A. Carbayo, B. Garcia, G. Espino, L.D. Aguirre, M.C. Carrion, A.M. Rodriguez, B.R. Manzano, F.A. Jalon, E. Orti, Strong Influence of the Ancillary Ligand over the Photodynamic Anticancer Properties of Neutral Biscyclometalated Ir(III) Complexes Bearing 2-Benzoazole-Phenolates, *Chemistry.* (2018).
- [184] X.-W. Liu, J. Li, H. Li, K.-C. Zheng, H. Chao, L.-N. Ji, Synthesis, characterization, DNA-binding and photocleavage of complexes [Ru(phen)<sub>2</sub>(6-OH-dppz)]<sup>2+</sup> and [Ru(phen)<sub>2</sub>(6-NO<sub>2</sub>-dppz)]<sup>2+</sup>., *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 2372–2380.
- [185] B.M. Zeglis, V.C. Pierre, J.K. Barton, Metallo-intercalators and metallo-insertors., *Chem. Commun. (Cambridge, United Kingdom).* (2007) 4565–4579.
- [186] S. Das, G.S. Kumar, Molecular aspects on the interaction of phenosafranine to deoxyribonucleic acid: Model for intercalative drug-DNA binding., *J. Mol. Struct.* 872 (2008) 56–63.



- [187] H. Xiang, H. Chen, H.P. Tham, S.Z.F. Phua, J.-G. Liu, Y. Zhao, Cyclometalated Iridium(III)-Complex-Based Micelles for Glutathione-Responsive Targeted Chemotherapy and Photodynamic Therapy., *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 27553–27562.
- [188] M. Williams, A.I. Green, J. Fernandez-Cestau, D.L. Hughes, M.A. O’Connell, M. Searcey, B. Bertrand, M. Bochmann, (C<sup>N</sup>pzC<sup>+</sup>)AuIII complexes of acyclic carbene ligands: synthesis and anticancer properties., *Dalt. Trans.* 46 (2017) 13397–13408.
- [189] M. Haghdoost, G. Golbaghi, M. Letourneau, S.A. Patten, A. Castonguay, Lipophilicity-antiproliferative activity relationship study leads to the preparation of a ruthenium(II) arene complex with considerable in vitro cytotoxicity against cancer cells and a lower in vivo toxicity in zebrafish embryos than clinically approved c, *Eur. J. Med. Chem.* 132 (2017) 282–293.
- [190] S.P. Oldfield, M.D. Hall, J.A. Platts, Calculation of Lipophilicity of a Large, Diverse Dataset of Anticancer Platinum Complexes and the Relation to Cellular Uptake., *J. Med. Chem.* 50 (2007) 5227–5237.
- [191] Z. Liu, L. Salassa, A. Habtemariam, A.M. Pizarro, G.J. Clarkson, P.J. Sadler, Contrasting reactivity and cancer cell cytotoxicity of isoelectronic organometallic iridium(III) complexes, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 5777–5783.
- [192] M.-G. Mendoza-Ferri, C.G. Hartinger, R.E. Eichinger, N. Stolyarova, K. Severin, M.A. Jakupec, A.A. Nazarov, B.K. Keppler, Influence of the Spacer Length on the in Vitro Anticancer Activity of Dinuclear Ruthenium-Arene Compounds., *Organometallics*. 27 (2008) 2405–2407.
- [193] P. Gramatica, E. Papa, M. Luini, E. Monti, M.B. Gariboldi, M. Ravera, E. Gabano, L. Gaviglio, D. Osella, Antiproliferative Pt(IV) complexes: synthesis, biological activity, and quantitative structure-activity relationship modeling., *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 15 (2010) 1157–1169.
- [194] P. Heffeter, U. Jungwirth, M. Jakupec, C. Hartinger, M. Galanski, L. Elbling, M. Micksche, B. Keppler, W. Berger, Resistance against novel anticancer metal compounds: Differences and similarities., *Drug Resist. Updat.* 11 (2008) 1–16.
- [195] Y. Geldmacher, K. Splith, I. Kitanovic, H. Alborzinia, S. Can, R. Rubbiani, M.A. Nazif, P. Wefelmeier, A. Prokop, I. Ott, S. Woelfl, I. Neundorf, W.S. Sheldrick, Cellular impact and selectivity of half-sandwich organorhodium(III) anticancer complexes and their organoiridium(III) and trichloridorhodium(III) counterparts., *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 17 (2012)

631–646.

- [196] J. Yellol, S.A. Perez, A. Buceta, G. Yellol, A. Donaire, P. Szumlas, P.J. Bednarski, G. Makhloufi, C. Janiak, A. Espinosa, J. Ruiz, Novel C,N-Cyclometalated Benzimidazole Ruthenium(II) and Iridium(III) Complexes as Antitumor and Antiangiogenic Agents: A Structure-Activity Relationship Study., *J. Med. Chem.* 58 (2015) 7310–7327.
- [197] R. Gaur, L. Mishra, Bi-nuclear Ru(II) complexes of bis-chalcone and bis-flavonol: synthesis, characterization, photo cleavage of DNA and Topoisomerase I inhibition., *RSC Adv.* 3 (2013) 12210–12219.
- [198] J.J. Martinez Medina, L.G. Naso, A.L. Perez, A. Rizzi, N.B. Okulik, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams, Apigenin oxidovanadium(IV) cation interactions. Synthesis, spectral, bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer studies., *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 344 (2017) 84–100.
- [199] L.G. Naso, L. Lezama, M. Valcarcel, C. Salado, P. Villace, D. Kortazar, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams, Bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer properties of an oxidovanadium(IV) complex with luteolin., *J. Inorg. Biochem.* 157 (2016) 80–93.
- [200] L.-Y. Tu, J. Pi, H. Jin, J.-Y. Cai, S.-P. Deng, Synthesis, characterization and anticancer activity of kaempferol-zinc(II) complex., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 2730–2734.
- [201] A.S. Roy, D.R. Tripathy, S. Samanta, S.K. Ghosh, S. Dasgupta, DNA damaging, cell cytotoxicity and serum albumin binding efficacy of the rutin-Cu(II) complex., *Mol. Biosyst.* 12 (2016) 1687–1701.
- [202] G. Galati, P.J. O'Brien, Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties., *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 287–303.
- [203] R.J. Williams, J.P.E. Spencer, C. Rice-Evans, Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?., *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 838–849.
- [204] G. Rusak, I. Piantanida, L. Masic, K. Kapuralin, K. Durgo, N. Kopjar, Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA interactions and DNA damaging/protecting and cytotoxic potential of flavonoids in human peripheral blood lymphocytes., *Chem. Biol. Interact.* 188 (2010) 181–189.
- [205] E.J. Middleton, C. Kandaswami, T.C. Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.* 52 (2000) 673–751.

- [206] J.E.N. Dolatabadi, Molecular aspects on the interaction of quercetin and its metal complexes with DNA., *Int. J. Biol. Macromol.* 48 (2011) 227–233.
- [207] T.A. Phan, X.-M. Yu, M. Kunnimalaiyaan, H. Chen, Antiproliferative Effect of Chrysin on Anaplastic Thyroid Cancer., *J. Surg. Res.* 170 (2011) 84–88.
- [208] A. Zahirovic, E. Kahrovic, M. Cindric, S. Kraljevic Pavelic, M. Hukic, A. Harej, E. Turkusic, Heteroleptic ruthenium bioflavonoid complexes: from synthesis to in vitro biological activity., *J. Coord. Chem.* 70 (2017) 4030–4053.
- [209] G.R. Zimmermann, J. Lehar, C.T. Keith, Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts, *Drug Discov. Today.* 12 (2007) 34–42.
- [210] J.-Z. Qian, B.-C. Wang, Y. Fan, J. Tan, X. Yang, QSAR study of flavonoid-metal complexes and their anticancer activities., *J. Struct. Chem.* 56 (2015) 338–345.
- [211] A. Kurzwernhart, W. Kandioller, S. Baechler, C. Bartel, S. Martic, M. Buczkowska, G. Muehlgassner, M.A. Jakupec, H.-B. Kraatz, P.J. Bednarski, V.B. Arion, D. Marko, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, Structure-Activity Relationships of Targeted Ru(II)-p-Cymene Anticancer Complexes with Flavonol-Derived Ligands., *J. Med. Chem.* 55 (2012) 10512–10522.
- [212] A. Kurzwernhart, S. Mokesch, E. Klapproth, M.S. Adib-Ravazi, M.A. Jakupec, C.G. Hartinger, W. Kandioller, B.K. Keppler, Flavonoid-Based Organometallics with Different Metal Centers - Investigations of the Effects on Reactivity and Cytotoxicity., *Eur. J. Inorg. Chem.* 2016 (2016) 240–246.
- [213] M.P. Sullivan, H.U. Holtkamp, C.G. Hartinger, Antitumor Metallodrugs that Target Proteins, *Met. Ions Life Sci.* 18 (2018).
- [214] M. Dehkhodaei, M. Sahihi, R.H. Amiri, F. Momenbeik, DNA and HSA interaction of Vanadium (IV), Copper (II), and Zinc (II) complexes derived from an asymmetric bidentate Schiff-base ligand: multi spectroscopic, viscosity measurements, molecular docking, and ONIOM studies, *J. Biol. Inorg. Chem.* 23 (2018) 181–192.
- [215] H.-K. Liu, P.J. Sadler, Metal Complexes as DNA Intercalators., *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 349–359.
- [216] J. Neissa, C. Perez-Arnaiz, V. Porto, N. Busto, E. Borrajo, J.M. Leal, M.A. Lopez-Quintela, B. Garcia, F. Dominguez, Interaction of silver atomic quantum clusters with living organisms: bactericidal effect of Ag<sub>3</sub> clusters

mediated by disruption of topoisomerase-DNA complexes., *Chem. Sci.* 6 (2015) 6717–6724.

- [217] B.S. Howerton, D.K. Heidary, E.C. Glazer, Strained ruthenium complexes are potent light-activated anticancer agents., *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 8324–8327.
- [218] V. Cepeda, M.A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo, J.M. Perez, Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 7 (2007) 3–18.

