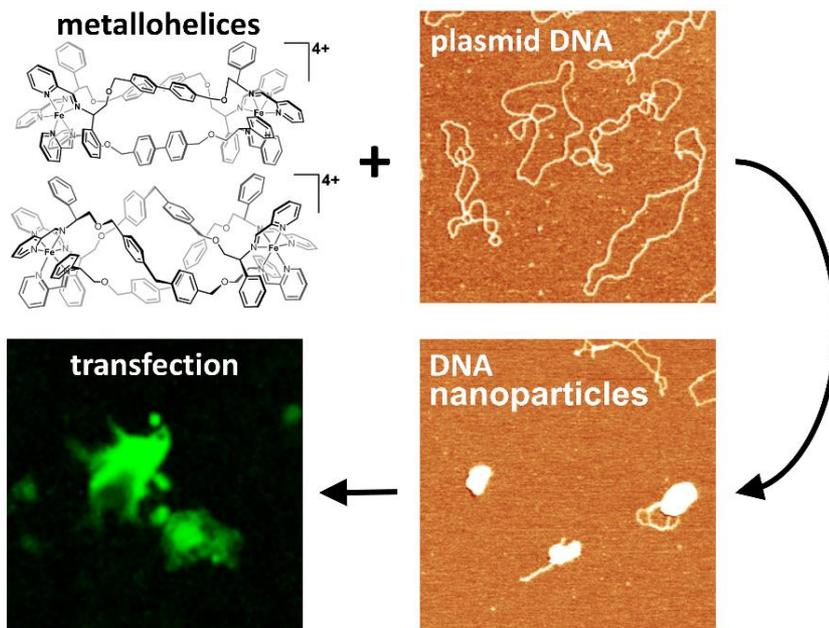


METALLOHELIX VECTORS FOR EFFICIENT GENE DELIVERY VIA CATIONIC DNA NANOPARTICLES

The design of efficient and safe gene delivery vehicles remains a major challenge for the application of gene therapy. Of the many reported gene delivery systems, metal complexes with high affinity for nucleic acids are emerging as an attractive option. We have discovered that certain metallohelices—optically pure, self-assembling triple-stranded arrays of fully encapsulated Fe—act as nonviral DNA delivery vectors capable of mediating efficient gene transfection. They induce formation of globular DNA particles which protect the DNA from degradation by various restriction endonucleases, are of suitable size and electrostatic potential for efficient membrane transport and are successfully processed by cells. The activity is highly structure-dependent—compact and shorter metallohelix enantiomers are far less efficient than less compact and longer enantiomers.

VNÁŠENÍ CIZORODÉ DNA DO JÁDRA EUKARYOTICKÝCH BUNĚK PROSTŘEDNICTVÍM NANOČÁSTIC Z MOLEKUL DNA VYTVOŘENÝCH S POMOCÍ ŽELEZNATÝCH HELIKÁLNÍCH KOMPLEXŮ

Vývoj účinného a bezpečného nosiče (vektoru) pro přenos (transfekci) cizorodé DNA (genu) do jádra buňky zůstává jedním z hlavních problémů, které je nutné vyřešit pro úspěšné použití genové terapie. Jednou z možností, které se pro transfekci nabízejí, je využít kovové komplexy, které se vyznačují vysokou vazebnou afinitou k DNA. Naše výsledky prokázaly, že určité druhy železnatých helikálních komplexů je možné úspěšně využít jako neviróvé vektory pro přenos genů do buněk. Železnaté helikáty po smíchání s molekulami DNA vytváří nanočástice o vhodné velikosti (100-300nm), s kladným povrchovým nábojem, které se úspěšně transportují přes buněčnou membránu a jsou schopny dopravit DNA až do buněčného jádra, kde dojde k jejímu zpracování. Účinnost helikátů silně závisí na jejich struktuře, přičemž kratší a kompaktnější helikáty jsou mnohem méně účinné než ty delší a méně kompaktní.

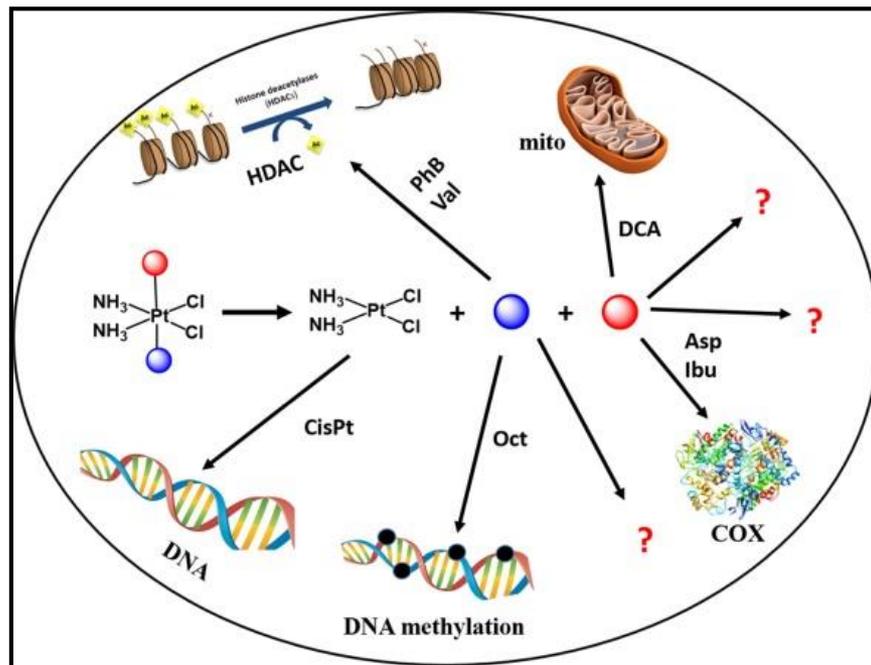


DISCOVERY OF NEW PLATINUM ANTITUMOR AGENTS THAT KILL CELLS BY A MULTIMODAL MECHANISM OF ACTION

We show that the Pt(IV) derivatives of cisplatin, oxaliplatin and other anticancer Pt(II) complexes with various biologically active axial ligands act by multimodal MoA. This MoA results in the global biological effects, that is, the Pt(IV) derivatives damage nuclear DNA, reduce the mitochondrial membrane potential, induce the epigenetic processes, and last but not least, the data provide evidence that changes in the organization of cytoskeleton networks are functionally important for some Pt(IV) derivatives, in contrast to clinically used platinum cytostatics, to kill cancer cells.

NOVÉ PLATINOVÉ PROTINÁDOROVÉ LÁTKY S MULTIMODÁLNÍM ÚČINKEM

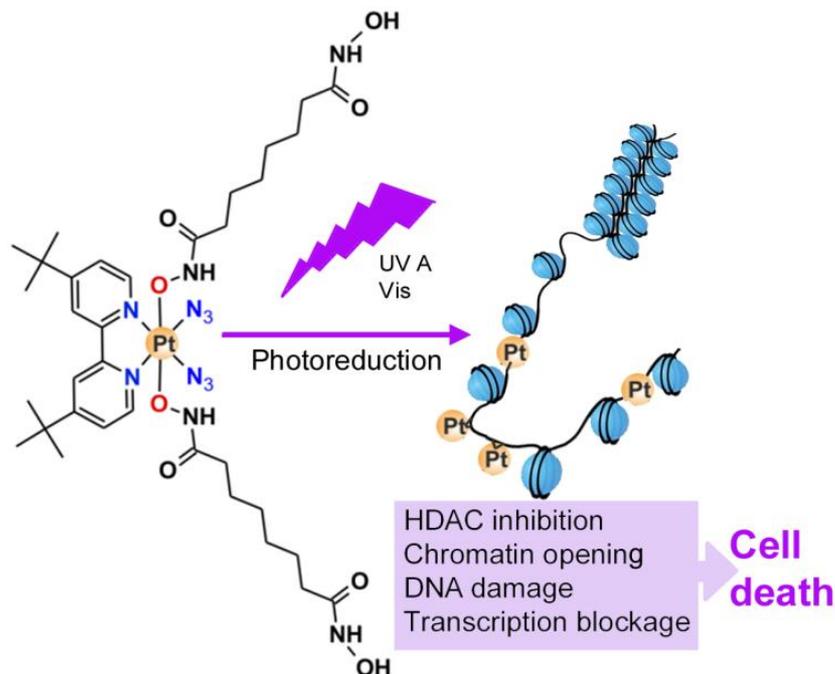
Naše výsledky ukazují, že čtyřmocné deriváty cisplatin, oxaliplatin a dalších dvojmocných protinádorových platinových komplexů s různými biologicky aktivními axiálními ligandy mají multimodální účinek, který se projevuje poškozením jaderné DNA, snížením membránového potenciálu v mitochondriích a vyvoláním epigenetických procesů. Získaná data navíc dokazují, že čtyřmocné deriváty, na rozdíl od dvojmocných, poškozují buněčný cytoskelet takovým způsobem, že dochází ke smrti nádorových buněk.



Kostrhunova, H.; Zajac, J.; Novohradsky, V.; Kasparkova, J.; Malina, J.; Aldrich-Wright, J. R.; Petruzzella, E.; Sirota, R.; Gibson, D.; Brabec, V. A subset of new platinum antitumor agents kills cells by a multimodal mechanism of action also involving changes in the organization of the microtubule cytoskeleton. *J. Med. Chem.* 2019, 62, 5176-5190. **IF= 6.054**. Kostrhunova, H.; Petruzzella, E.; Gibson, D.; Kasparkova, J.; Brabec, V. A new anticancer Pt(IV) prodrug that acts by mechanisms involving DNA damage and different epigenetic effects. *Chem. Eur. J.* 2019, 25, 5235 – 5245. **IF=5.160**. Novohradsky, V.; Zanellato, I.; Marzano, C.; Pracharova, J.; Kasparkova, J.; Gibson, D.; Gandin, V.; Osella, D.; Brabec, V. Epigenetic and antitumor effects of platinum(IV)-octanoato conjugates. *Sci. Rep.* 2017, 7, 3751. **IF=4.011**. Raveendran, R.; Braude, J. P.; Wexselblatt, E.; Novohradsky, V.; Stuchlikova, O.; Brabec, V.; Gandin, V.; Gibson, D. Pt(IV) derivatives of cisplatin and oxaliplatin with phenylbutyrate axial ligands are potent cytotoxic agents that act by several mechanisms of action. *Chem. Sci.* 2016, 7, 2381-2391. **IF=9.556**.

A PHOTOACTIVATABLE PLATINUM(IV) COMPLEX TARGETING GENOMIC DNA AND HISTONE DEACETYLASES

We reported toxic effects of photoactivatable platinum(IV) complex conjugated with suberoyl-bis-hydroxamic acid in tumor cells. The conjugate exerts, after photoactivation, the two functions: activity of both platinum(II) anticancer drug and histone deacetylase (HDAC) inhibition in cancer cells. The novelty of this approach resides in the use of a Pt(IV) pro-drug, acting by two independent mechanisms of biological action in a cooperative manner, which can be selectively photoactivated to cytotoxic species in and around a tumor thereby increasing selectivity towards cancer cells. The results suggest that this new strategy is a valuable route to design new platinum agents with higher efficacy for photodynamic anticancer chemotherapy. Recent advances in laser and fiber-optic technologies make it possible to irradiate also internal organs with light of highly defined intensity and wavelength.



FOTOAKTIVOVATELNÉ PLATINOVÉ KOMPLEXY PŮSOBÍCÍ SOUČASNĚ NA GENOMICKOU DNA A HISTONOVÉ DEACETYLÁZY

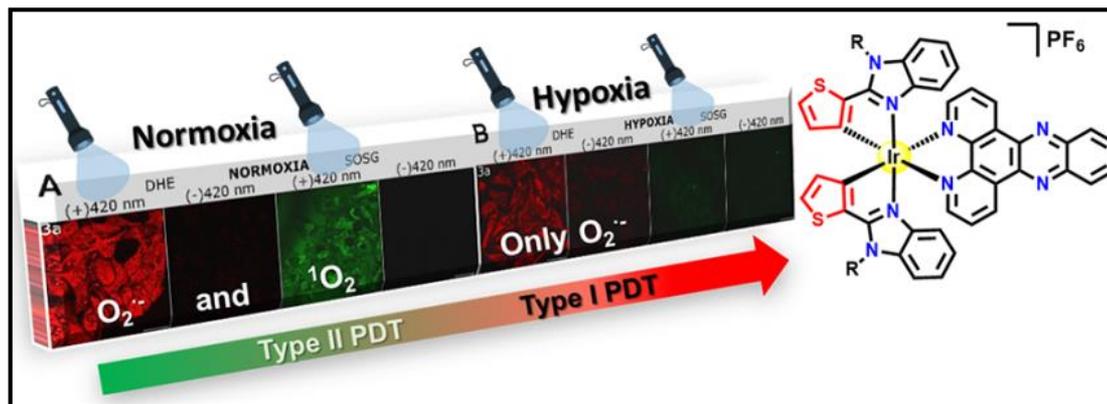
Předmětem výzkumu bylo cytotoxické působení fotoaktivovatelných čtyřmocných platinových komplexů obsahujících suberoyl-bis-hydroxamovou kyselinu na nádorové buňky. Zkoumané platinové komplexy se po fotoaktivaci v nádorových buňkách a následné disociaci axiálních ligandů rozpadnou na dvě aktivní látky: protinádorově aktivní dvojmocný platinový komplex a inhibitor histon deacetylázy (HDAC), čímž dojde k aktivaci dvou nezávislých, kooperativních mechanismů působení. Výsledky ukazují, že tato strategie může být přínosná při vývoji nových platinových cytostatik, které by se daly použít pro fotodynamickou protinádorovou chemoterapii. Pokroky ve vývoji laserů a technologii optických vláken umožňují ozařovat i interní orgány světlem o vhodné vlnové délce a dostatečné intenzitě záření.

THE ANTICANCER ACTIVITY OF THE NEW PHOSPHORESCENT IRIIDIUM(III) COMPLEXES SUITABLE FOR PHOTODYNAMIC THERAPY ACTING AS PROTEOSYNTHESIS INHIBITORS

The phototoxicity in cancer cells of three series of octahedral Ir(III) complexes of general formula $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})][\text{PF}_6]$, where the $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ligand is dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine (*dppz*) and the $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ ligands are deprotonated 2-phenyl-, 2-(naphthalen-2-yl)- or 2-(thiophen-2-yl)-benzimidazole derivatives (series **1**, **2** and **3**, respectively) with different substituents (H, methyl or 4-(trifluoromethyl)benzyl) on the imidazole units, has been studied. The compounds were found to be photoactive in model human cervical cancer HeLa cells (IC_{50} about 20 nM under irradiation conditions, $\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$), inducing a substantial formation of apoptotic bodies as shown by flow cytometry. Some of these compounds showed the high phototoxic indexes. Notably, the antiproliferative activity of the photoactivated Ir(III) compounds was also significant under hypoxic conditions (2 % O_2). Further investigations on series **3** compounds have shown that molecular superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) generation is the main responsible for the oxidative stress induced by irradiation of the cells treated with the 2-(thiophen-2-yl)benzimidazole derivatives **3a-c**. The photopotential of compounds of series 3 also involves the formation of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). The results also showed that in tumor HeLa cells, the generation of superoxide radicals competed with singlet oxygen production in cells in normoxia, but became dominant under hypoxia.

PROTINÁDOROVÁ AKTIVITA NOVÝCH FOSFORESCENČNÍCH TROJMOCNÝCH IRIUDIOVÝCH KOMPLEXŮ VHODNÝCH PRO VYUŽITÍ VE FOTODYNAMICKÉ TERAPII

Předmětem zkoumání byla fototoxicita vůči nádorovým buňkám u tří sérií (série **1**, **2** a **3**) oktaedrálních trojmocných iridiových komplexů s obecným vzorcem $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})][\text{PF}_6]$, kde $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ligand představuje dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine (*dppz*) a $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ ligandy jsou deprotonované deriváty 2-phenyl-, 2-(naphthalen-2-yl)- nebo 2-(thiophen-2-yl)- benzimidazolu s různými substituenty (H, metyl nebo 4-(trifluoromethyl)benzyl) připojenými k imidazolu. Komplexy po ozáření byly aktivní vůči lidským nádorovým HeLa buňkám (IC_{50} bylo $\sim 20 \text{ nM}$ při použití světla o vlnové délce, $\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$), přičemž docházelo k tvorbě apoptotických tělísek, jak prokázala průtoková cytometrie. Některé z komplexů vykazovaly vysoké fototoxické indexy. Antiproliferativní aktivita komplexů byla výrazná i v případě hypoxických podmínek (2% O_2). Dodatečné experimenty s komplexy **3a-c** odhalily, že hlavním zdrojem oxidativního stresu v buňkách je tvorba superoxidového radikálu ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Po ozáření komplexů ze série **3** také docházelo ke vzniku singletního kyslíku ($^1\text{O}_2$). U HeLa buněk v hypoxických podmínkách produkce superoxidových radikálů dominovala, zatímco v případě normoxie byla tvorba obou typů radikálů vyrovnaná.



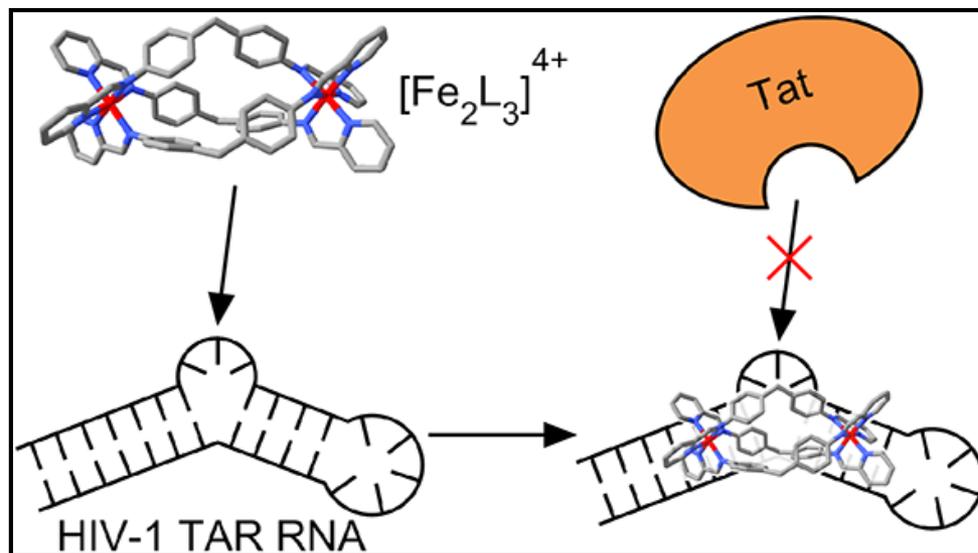
IRON(II) SUPRAMOLECULAR HELICATES INTERFERE WITH THE HIV-1 Tat-TAR RNA INTERACTION CRITICAL FOR VIRAL REPLICATION

The binding of the viral trans-activator protein (**Tat**) to the **TAR** RNA is an essential step in the HIV-1 replication cycle. Therefore, the blockage of the **Tat-TAR** interaction is a potential route for AIDS chemotherapy. Compounds that bind to **TAR** RNA, and prevent binding by Tat, could disrupt processive transcription and thereby inhibit viral growth.

The interaction between the HIV-1 transactivator protein **Tat** and **TAR** (transactivation responsive region) RNA, plays a critical role in HIV-1 transcription. Iron(II) supramolecular helicates were evaluated for their *in vitro* activity to inhibit **Tat-TAR** RNA interaction using UV melting studies, electrophoretic mobility shift assay, and RNase A footprinting. The results demonstrate that iron(II) supramolecular helicates inhibit **Tat-TAR** interaction at nanomolar concentrations by binding to **TAR** RNA with high affinity. Thus, iron(II) supramolecular helicates inhibit the HIV-1 **Tat-TAR** interaction at notably lower concentrations than many inhibitors of **Tat-TAR** binding so far tested. These studies provide a new insight into the biological potential of metallosupramolecular helicates.

ŽELEZNATÉ SUPRAMOLEKULÁRNÍ HELIKÁLNÍ KOMPLEXY BRÁNÍ INTERAKCI TAR RNA S Tat PROTEINEM, KTERÁ JE KRITICKÁ PRO REPLIKACI VIRU HIV-1

Vazba proteinu **Tat** (viral trans-activator protein) na **TAR** (transactivation responsive region) RNA je klíčový krok v replikaci viru HIV-1. Zablokování této vazby tudíž představuje jednu z možných cest, které by šlo využít při léčbě AIDS. Látky schopné navázat se na **TAR** RNA a zabránit vazbě proteinu **Tat** by mohly blokovat transkripci viru HIV-1. Železnaté supramolekulární helikální komplexy byly zkoumány z hlediska jejich schopnosti blokovat **Tat-TAR** RNA interakci s využitím různých biofyzikálních technik *in vitro*. Výsledky ukázaly, že helikáty v nanomolárních koncentracích inhibují **Tat-TAR** RNA interakci tím způsobem, že se váží s vysokou afinitou na centrální strukturu v **TAR** RNA. Železnaté helikáty tedy blokují vazbu **Tat-TAR** RNA při nižších koncentracích než řada dalších inhibitorů, které byly do té doby testovány.

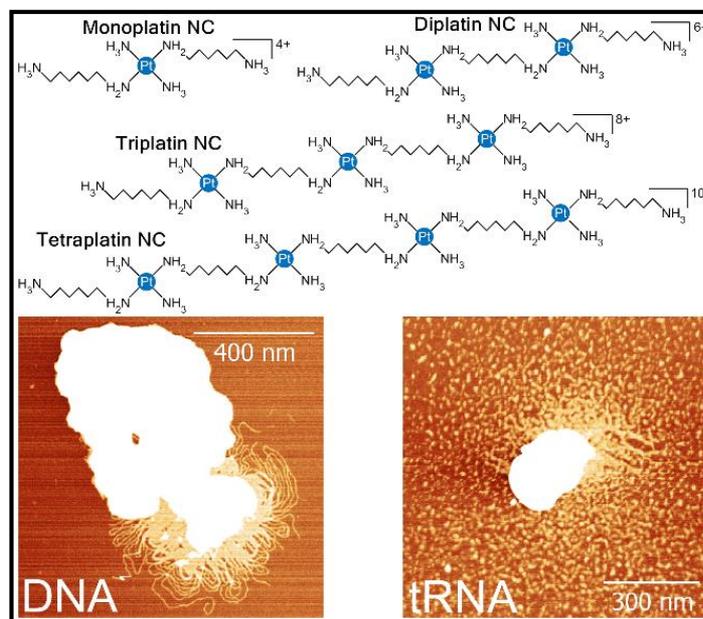


SUBSTITUTION-INERT POLYNUCLEAR PLATINUM COMPLEXES ACT AS VERY POTENT INDUCERS OF CONDENSATION/AGGREGATION OF DNA AND RNA INCLUDING THEIR SHORT FRAGMENTS THAT MIGHT HAVE POTENTIAL IN GENE THERAPY, BIOTECHNOLOGY, AND BIONANOTECHNOLOGY

The substitution-inert polynuclear platinum complexes (SI-PPCs) represent a unique group of platinum-based anticancer agents that exhibit high affinity towards nucleic acids. We investigated the effects of SI-PPCs containing dangling amine groups in place of NH_3 as ligands to increase the length of the molecule and therefore overall charge and its distribution. The results obtained with the aid of biophysical techniques, such as total intensity light scattering, gel electrophoresis and atomic force microscopy show that addition of dangling amine groups considerably augments the ability of SI-PPCs to condense/aggregate nucleic acids. Moreover, this enhanced capability of SI-PPCs correlates with their heightened efficiency to inhibit DNA-related enzymatic activities, such as those connected with DNA transcription, catalysis of DNA relaxation by DNA topoisomerase I and DNA synthesis catalyzed by Taq DNA polymerase. Thus, the structures of SI-PPCs, which differ so markedly from the derivatives of cisplatin used in the clinic, appears to contribute to the overall biological activity of these molecules.

NEKOVALENTNĚ INTERAGUJÍCÍ VÍCEJADERNÉ PLATINOVÉ KOMPLEXY SCHOPNÉ S VYSOKOU ÚČINNOSTÍ KONDENZOVAT/AGREGOVAT DNA A RNA, VČETNĚ KRÁTKÝCH FRAGMENTŮ, MOHOU NALÉZT VYUŽITÍ V GENOVÉ TERAPII, BIOTECHNOLOGII A BIONANOTECHNOLOGII

Nekovalentně se vážící vícejaderné platinové komplexy (SI-PPCs) představují unikátní skupinu platinových protinádorově aktivních látek, které vykazují vysokou afinitu k nukleovým kyselinám. Pomocí biofyzikálních technik, jako jsou rozptyl světla, gelová elektroforéza a mikroskopie atomárních sil, jsme zkoumali vliv prodloužení molekul platinových komplexů v důsledku výměny jednoduchých $-\text{NH}_3$ skupin za delší $-\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_3$ skupiny na interakce s DNA a RNA. Výsledky prokázaly, že prodloužení platinových komplexů, zvýšení náboje a možnost vytvářet dodatečné vodíkové vazby, výrazně zvýšily schopnost těchto látek kondenzovat/agregovat DNA a RNA a inhibovat enzymatické aktivity spojené s DNA, jako jsou transkripce, replikace nebo relaxace DNA prostřednictvím topoisomérázy I.



DISCOVERY OF SELECTIVE, ANTI-METASTATIC AND ANTI-CANCER STEM CELL METALLOHELICES

Lehn envisaged in his original report that helicates – self-assembling multimetallic coordination compounds – may find uses in biochemistry. Helicates and related metallofoldamers, synthesised by dynamic self-assembly, represent an area of chemical space inaccessible by traditional organic synthesis, and yet with potential for discovery of new classes of drug. We reported that water-soluble, optically pure Fe(II)- and even Zn(II)-based triplex metallohelices are an excellent platform for post-assembly click reactions. By these means, the *in vitro* anticancer activity and most importantly the selectivity of a triplex metallohelix Fe(II) system is dramatically improved. For one compound, a remarkable array of mechanistic and pharmacological behaviours is discovered: inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase with potency comparable to the drug ouabain, antimetastatic properties (including inhibition of cell migration, re-adhesion and invasion), cancer stem cell targeting, and finally colonosphere inhibition competitive with the drug salinomycin. This study was performed in collaboration with researchers of the University of Warwick in England.

SELEKTIVNÍ HELIKÁLNÍ KOVOVÉ KOMPLEXY S ANTIMETASTATICKOU AKTIVITOU A ÚČINKY VŮČI NÁDOROVÝM KMENOVÝM BUŇKÁM

Supramolekulární kovové helikální komplexy představují zcela novou skupinu látek, které by nebylo možné získat s využitím tradiční organické syntézy, a proto mají tyto látky potenciál při vývoji nových léčiv. Předmětem výzkumu byly železnaté a zinečnaté kovové helikáty, které bylo navíc možné dodatečně modifikovat pomocí „click“ reakcí. Díky tomu se podařilo dramaticky zvýšit protinádorovou aktivitu a selektivitu železnatých helikátů. U jednoho ze zkoumaných zástupců této skupiny byla důkladně prozkoumána jeho biologická aktivita a prokázaly se následující účinky: velmi účinná inhibice Na⁺/K⁺ ATPázy, antimetastatická aktivita zahrnující inhibici buněčné migrace, invaze a re-adheze, inhibice nádorových kmenových buněk a konečně aktivita vůči nádorům tlustého střeva srovnatelná se salinomycinem. Tato studie byla provedena ve spolupráci s kolegy z univerzity ve Warwicku v Anglii.

