





Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Uniwersytetu Łódzkiego

## Rozprawa doktorska

### Metaloorganiczne pochodne typu "click" erlotynibu oraz AZT – synteza i aktywność biologiczna

### mgr inż. Przemysław Biegański

Monotematyczny cykl publikacji wraz z komentarzem, przedstawiony Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne w celu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych

Promotor: prof. dr hab. Konrad Kowalski

Badania zrealizowano

w Katedrze Chemii Organicznej

Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

Łódź, 2024

Składam podziękowania mojemu Promotorowi prof. dr hab. Konradowi Kowalskiemu, za opiekę naukową i wsparcie w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.

Chciałbym również złożyć podziękowania dr Joannie Skibie oraz dr Rafałowi Karpowiczowi za wiele cennych uwag podczas codziennej pracy laboratoryjnej oraz za czas spędzony wspólnie w laboratorium 4-211.

Składam serdeczne podziękowania mojej żonie Martynie i rodzinie za cierpliwość, wyrozumiałość i ogrom wsparcia w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.

Składam podziękowania Narodowemu Centrum Nauki w Krakowie (projekt PRELUDIUM 20 UMO-2021/41/N/ST4/00059) za wsparcie finansowe.

Mojej żonie Martynie i synowi Leonowi pracę tą poświęcam.

"Obiecującym sposobem na odkrycie nowego leku jest rozpoczęcie od starego leku" – James Whyte Black, laureat Nagrody Nobla w 1988 w dziedzinie fizjologii i medycyny.

## Spis treści

Wykaz zastosowanych skrótów i symboli	7
1. Streszczenie w języku polskim	14
2. Streszczenie w języku angielskim	16
3. Spis publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej	18
4. Wprowadzenie literaturowe w tematykę badawczą	20
4.1. Płuca i ich choroby	21
4.1.1. Choroby nowotworowe we współczesnym świecie	21
4.2. Inhibitory EGFR w terapii nowotworów płuc	25
4.2.1. Erlotynib	29
4.2.2. Pochodne erlotynibu zawierające atomy metali o aktywności	
przeciwnowotworowej	31
4.3. Azydotymidyna (AZT)	34
4.3.1. Wybrane metaloorganiczne pochodne nukleozydów pirymidynow	/ych
o aktywności przeciwnowotworowej	
4.4. Reakcje CuAAC i RuAAC	39
4.4.1. Mechanizm reakcji CuAAC i RuAAC	42
4.4.2. Metaloorganiczne 1,2,3-triazole o aktywności przeciwnowotworo	wej
– wybrane przykłady	43
4.5. Wirus SARS-CoV-2 – wyzwanie współczesnej cywilizacji	49
4.5.1. Wybrane związki o aktywności przeciw SARS-CoV-2	52
5. Hipoteza badawcza i uzasadnienie podjęcia badań	56
6. Omówienie wyników badań własnych	58

6.1. Informacje wstępne59
6.2. Synteza i aktywność biologiczna metalocenylowych pochodnych erlotynibu (Praca P1)60
6.3. Synteza, badania aktywności biologicznej i zjawiska "komunikacji elektronowej" ferrocenylowych pochodnych AZT <b>119 – 121</b> i pochodnych <b>122 – 124</b> (Praca P2)63
6.4. Synteza i aktywność biologiczna pochodnych erlotynibu zawierających atomy metali (Praca P3)72
7. Podsumowanie i wnioski82
8. Część eksperymentalna85
9. Bibliografia99
10. Życiorys oraz przebieg pracy naukowej110
11. Działalność naukowa i organizacyjna112
12. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej115
13. Oświadczenia współautorów publikacji149

## Wykaz zastosowanych skrótów i symboli

3CL <sup>Pro</sup>	proteaza podobna do 3-chymotrypsyny (ang. 3-chymotrypsin-like protease)	
5-FU	5-fluorouracyl	
A2780	linia komórkowa nowotworu jajnika (ang. <i>ovarian cancer</i> )	
A2780cis	linia komórkowa nowotworu jajnika oporna na działanie cis-platyny (ang. <i>cisplatin-resistant ovarian cancer</i> )	
A431	linia komórkowa ludzkiego nowotworu skóry (ang. epidermoid carcinoma)	
A549	linia komórkowa gruczolakoraka płuc (ang. <i>lung adenocarcinoma</i> )	
A549-hACE2	linia komórkowa gruczolakoraka płuc (ang. <i>lung adenocarcinoma</i> )	
	z nadekspresją ludzkiego enzymu konwertującego angiotensynę 2 (ACE2)	
ACE2	enzym konwertujący angiotensynę 2 (ang. angiotensin-converting enzyme 2)	
ADP	adenozynodifosforan	
AIDS	zespół nabytego upośledzenia odporności (ang. acquired immune deficiency syndrome)	
AKT	kinaza białkowa B (ang. protein kinase B)	
AgAAC	reakcja cykloaddycji pomiędzy alkinem a azydkiem katalizowana srebrem (I) (ang. silver(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition)	
AscNa	askorbinian sodu	
ATP	adenozynotrifosforan	
AuAAC	reakcja cykloaddycji pomiędzy alkinem a azydkiem katalizowana złotem (I) (ang. gold(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition)	
AZT	azydotymidyna	
BEAS-2B	niezmieniona nowotworowo linia komórka nabłonka płuc (ang. <i>normal</i> human bronchial epithelium cells)	

BGM	niezmieniona nowotworowo linia komórkowa nerek afrykańskiej małpy		
	zielonej (ang. <i>Buffalo Green Monkey kidney cells</i> )		
BJAB	linia komórkowa chłoniaka Burkitta (ang. Burkitt's lymphoma)		
C797S	mutacja w receptorze EGFR, w wyniku której następuje zastąpienie w pozycji		
	797 reszty cysteiny przez resztę seryny		
CA	anhydraza węglanowa (ang. carbonic anhydrase)		
Calu-3	linia komórkowa niedrobnokomórkowego gruczolakoraka płuc (ang. non-small		
	cell lung adenocarcinoma)		
cisPt	cis-platyna		
Covid-19	zespół ostrej niewydolności oddechowej wywołany przez wirus		
	SARS-CoV-2		
Cp*	grupa pentametylocyklopentadienylowa		
CTSL	katepsyna L (ang. cathepsin L)		
CuAAC	reakcja cykloaddycji pomiędzy alkinem a azydkiem katalizowana miedzią (I)		
	(ang. copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition)		
DCC	N,N'-dicykloheksylokarbodiimid		
DCM	dichlorometan		
del19	mutacja w genie EGFR polegająca na delecji w eksonie 19, powodująca		
	usunięcie sekwencji aminokwasów pomiędzy nicią $eta$ 3 a helisą $lpha$ C płatka		
	N domeny kinazowej receptora EGFR, która znajduje się blisko miejsca wiązania		
	АТР		
DIPEA	N,N-diizopropyloetyloamina		
DMAP	4-(dimetyloamino)pirydyna		
DMSO	dimetylosulfotlenek		
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy		
dTTP	3'-deoksytymidyno-5'-trifosforan		

EGF	naskórkowy czynnik wzrostu (ang. epidermal growth factor)		
EGFR	receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. epidermal growth factor receptor)		
EPR	spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego		
ERK1/2	kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym 1 lub 2 (ang. <i>extracellular signal-regulated kinases 1 or 2</i> )		
Et	grupa etylowa		
FDA	Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)		
FTIR	spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Fourier</i> transform infrared spectroscopy)		
H1299	linia komórkowa niedrobnokomórkowego raka płuc (ang. <i>non-small cell lung</i> <i>carcinoma</i> )		
H1975	linia komórkowa niedrobnokomórkowego gruczolakoraka płuc (ang. <i>non-small</i> cell lung adenocarcinoma)		
HAART	antyretrowirusowa terapia stosowana w zakażeniu wirusem HIV (ang. <i>highly active antiretroviral therapy</i> )		
HBV	wirus zapalenia wątroby typu B		
нсv	wirus zapalenia wątroby typu C		
HDFa	linia komórkowa ludzkich fibroblastów skórnych (ang. human dermal fibroblasts)		
HEK-293T	niezmieniona nowotworowo ludzka embrionalna linia komórkowa nerek (ang. human embryonic kidney)		
HepG2	linia komórkowa ludzkiego nowotworu wątroby (ang. human hepatocellular carcinoma)		
HIV-1	ludzki wirus nabytego niedoboru odporności 1 (ang. <i>human immunodeficiency virus 1</i> )		

HIV-2	ludzki wirus nabytego niedoboru odporności 2 (ang. human immunodeficienc	
	virus 2)	
HL-60	linia komórkowa białaczki promielocytowej (ang. promyelocytic leukemia)	
HPV	wirus brodawczaka ludzkiego (ang. human papilloma virus)	
HRMS	wysokorozdzielcza spektrometria mas (ang. high-resolution mass spectrometry)	
HT-29	linia komórkowa gruczolakoraka jelita grubego (ang. colon cancer)	
IC <sub>50</sub>	wartość definiowana jako stężenie związku powodujące 50% zahamowanie proliferacji komórek w odniesieniu do kontroli (ang. <i>half maximal effective concentration</i> )	
IrAAC	reakcja cykloaddycji pomiędzy alkinem a azydkiem katalizowana irydem (ang. <i>iridium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i> )	
IVCT	pasmo z przeniesieniem ładunku (ang. intervalence charge transfer band)	
L858R	punktowa mutacja eksonu 21 w receptorze naskórkowego czynnika wzrostu	
	polegająca na zastąpieniu leucyny przez argininę w pozycji 858	
MCF-7	linia komórkowa estrogenozależnego gruczolakoraka piersi (ang. estrogen- responsive breast adenocarcinoma)	
MDA-MB-231	linia komórkowa hormononiezależnego gruczolakoraka piersi (ang. hormone- negative breast adenocarcinoma)	
MDCK	niezmieniona nowotworowo linia komórkowa nerki psa Madina-Darby'ego	
MERS-CoV	koronawirus bliskowschodniego zespołu oddechowego (ang. Middle East respiratory syndrome coronavirus)	
<sup>3</sup> MLCT	przejście z przeniesieniem ładunku z metalu do liganda (ang. metal to ligand charge transfer band)	
MonoMac6	niezmieniona nowotworowo linia komórkowa ludzkich monocytów (ang. <i>human monocyte line</i> )	

N3dTTP	3'-azydo-3'-deoksytymidyno-5'-trifosforan	
NAAF	<i>N</i> -alkiloaminoferrocen	
NAC	N-acetylocysteina	
NBS	N-bromosukcynoimid	
NCN	Narodowe Centrum Nauki	
NHBE	niezmieniona nowotworowo linia komórkowa ludzkiego nabłonka oskrzeli (ang. <i>normal human bronchial epithelial</i> )	
NIR	spektroskopia w bliskiej podczerwieni (ang. near-infrared spectroscopy)	
NMR	spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i> )	
NRTI	nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (ang. nucleoside reverse transcriptase inhibitors)	
NSCLC	niedrobnokomórkowy rak płuc (ang. non-small cell lung cancer)	
oksaliPt	oksaliplatyna	
OTTLE	optycznie transparentna cela elektrochemiczna (ang. optically transparent thin-layer electrochemical cell)	
PcAAC	fotokatalizowana reakcja cykloaddycji pomiędzy alkinem a azydkiem	
	(ang. photocatalyzed azide-alkyne cycloaddition)	
PDT	terapia fotodynamiczna (ang. <i>photodynamic therapy</i> )	
Ph	grupa fenylowa	
РІ	inhibitory proteazy (ang. protease inhibitors)	
PL <sup>Pro</sup>	proteaza podobna do papainy (ang. papain-like protease)	
RBD	domena wiążąca receptor (ang. receptor-binding domain)	
RC-124	niezmieniona nowotworowo linia komórkowa ludzkiej nerki (ang. <i>kidney</i> primary epithelial cells)	

RdRp	RNA-zależna polimeraza RNA (ang. RNA-dependent RNA polymerase)	
RNA	kwas rybonukleinowy	
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)	
RuAAC	reakcja cykloaddycji pomiędzy alkinem a azydkiem katalizowana rutenem	
	(ang. ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition)	
SARS-CoV-1	pierwszy koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. <i>severe</i> acute respiratory syndrome coronavirus 1)	
SARS-CoV-2	drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. severe	
	acute respiratory syndrome coronavirus 2)	
SCLC	drobnokomórkowy rak płuc (ang. small cell lung cancer)	
S <sub>N</sub> 2	dwucząsteczkowa substytucja nukleofilowa	
T790M	punktowa mutacja genetyczna eksonu 20 w receptorze naskórkowego	
	czynnika wzrostu polegająca na zastąpieniu treoniny przez metioninę	
	w pozycji 790	
TBDPS	grupa <i>tert</i> -butylodifenylosililowa	
TDS	grupa teksylodimetylosililowa	
THF	tetrahydrofuran	
тк	kinazy tyrozynowe (ang. tyrosine kinases)	
TLC	chromatografia cienkowarstwowa (ang. thin layer chromatography)	
TMPRSS-2	transbłonowa proteaza serynowa 2 (ang. transmembrane serine protease 2)	
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)	
WWA	wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne	
ZnAAC	reakcja cykloaddycji pomiędzy alkinem a azydkiem katalizowana cynkiem	
	(ang. zinc-catalyzed azide-alkyne cycloaddition)	
λ <sub>abs</sub>	maksimum absoprcji	
λρι	maksimum emisji	

- ${\it P}_{\sf PL}$  wydajność kwantowa luminescencji
- τ czas zaniku emisji

1. Streszczenie w języku polskim

Płuca to narząd narażony na działanie licznych czynników chorobotwórczych. Są wśród nich czynniki toksykologiczne wywołujące choroby nowotworowe oraz wirusowe odpowiedzialne za choroby zakaźne.

Tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej obejmuje syntezę metaloorganicznych pochodnych erlotynibu (leku przeciwnowotworowego) w celu zbadania ich aktywności przeciwnowotworowej oraz jako tzw. inhibitorów wejścia wirusów SARS-CoV-1/2 do ludzkich komórek.

Od strony chemicznej cel niniejszej rozprawy doktorskiej został osiągnięty poprzez zastosowanie katalizowanych miedzią (CuAAC) lub rutenem (RuAAC) reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji pomiędzy odpowiednimi azydkami a alkinami. Reakcje te są szeroko stosowane w chemii medycznej oraz biologii molekularnej, co przekonało mnie do ich wyboru jako podstawowego narzędzia syntetycznego w swoich badaniach.

Erlotynib, którego modyfikacji się podjąłem należy do I generacji inhibitorów EGFR. Ze względu na niekorzystne terapeutycznie mutacje w genie receptora EGFR związek ten często staje się nieskuteczny. Aby temu przeciwdziałać wprowadzane są kolejne generacje inhibitorów EGFR. Ideą syntezy metaloorganicznych pochodnych erlotynibu było wprowadzenie do cząsteczki drugiego mechanizmu aktywności przeciwnowotworowej, który byłby niezależny od mutacji EGFR. Mechanizm ten zależałby od fragmentu metaloorganicznego i opierał się o generowanie stresu oksydacyjnego w komórkach raka płuc. Cel ten osiągnąłem, ponieważ niektóre z otrzymanych przeze mnie związków były bardziej aktywne wobec opornych na działanie erlotynibu komórek nowotworu płuc linii H1650 i H1975.

Dodatkowo stosując chemię "click" otrzymałem również diferrocenylową pochodną AZT o dużej aktywności przeciwnowotworowej wobec komórek raka płuc A549 i H1975. Podobnie jak w przypadku aktywnych pochodnych erlotynibu mechanizm jej aktywności polegał na generowaniu reaktywnych form tlenu i stresu oksydacyjnego.

Ważnym osiągnięciem mojej pracy jest odkrycie, że jedna z otrzymanych pochodnych rutenocenylowych erlotynibu hamuje wnikanie wirusów SARS-CoV-1/2 do niezmienionych nowotworowo komórek człowieka HEK293T.

2. Streszczenie w języku angielskim

The lungs are organs exposed to numerous pathogens, including toxicological factors causing cancer and viral factors responsible for infectious diseases.

The area of interest of this PhD thesis pertains to the synthesis of organometallic erlotinib (anticancer drug) conjugates and the examination of these bioconjugates as anticancer agents and SARS-CoV-1/2 entry inhibitors to human cells.

Chemically, the goal of my thesis was achieved through the use of Cu(I)-catalyzed or Ru-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reactions (CuAAC and RuAAC). These reactions are widely used in medicinal chemistry and molecular biology, which convinced me to choose them as the basic synthetic tools in my research.

Erlotinib, a first-generation EGFR inhibitor, can become ineffective due to therapeutically unfavorable mutations in the EGFR receptor gene. To circumvent this problem, subsequent generations of EGFR inhibitors were developed and introduced into clinical practice. The idea behind the synthesis of organometallic conjugates of erlotinib was to introduce a second mechanism of anticancer activity into the molecule, which would be independent of EGFR mutations. This mechanism relies on the organometallic entity and is based on generating oxidative stress in lung cancer cells. I successfully achieved this goal, as some of my compounds exhibited greater activity against erlotinib-resistant lung cancer cells (specifically, cell lines H1650 and H1975) compared to erlotinib itself.

Additionally, using click chemistry, I obtained a diferrocenyl derivative of AZT with high activity against lung cancer cells. As in the case of active erlotinib derivatives, the mechanism of its activity was based on the generation of reactive oxygen species and oxidative stress.

Another important achievement of my work is the discovery of a ruthenocenyl erlotinib conjugate, which acts as a SARS-CoV-1/2 virus entry inhibitor to human HEK293T cells.

# 3. Spis publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

P1. P. Biegański, M. Godel, C. Riganti, D. F. Kawano, J. Kopecka, K. Kowalski

"Click ferrocenyl-erlotinib conjugates active against erlotinib-resistant non-small cell lung cancer cells *in vitro*"

*Bioorganic Chemistry*, **2022**, *119*, 105514

Impact factor (IF) = **5,10** 

**P2.** <u>P. Biegański</u>, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski

"Electronic Coupling in 1,2,3-Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells"

Inorganic Chemistry, 2022, 61, 9650 – 9666

Impact factor (IF) = 4,60

**P3.** <u>P. Biegański</u>, M. Gazecka, R. Nowak, A. Gorski, N. Dutkiewicz, D. F. Kawano, P. Zmora, K. Kowalski

"Organometallic-erlotinib conjugates active against lung cancer cells and as emerging viruses entry inhibitors"

Organometallics, 2024 – artykuł w trakcie recenzji

Impact factor (IF) = 2,80

#### Publikacja niewchodząca w cykl prac do doktoratu:

1. P. Biegański, Ł. Szczupak, M. Arruebo, K. Kowalski

"Brief survey on organometalated antibacterial drugs and metal-based materials with antibacterial activity"

RSC Chemical Biology, 2021, 2, 368 – 386

Impact factor (IF) = 4,10

4. Wprowadzenie literaturowe w tematykę badawczą

#### 4.1. Płuca i ich choroby

Płuca stanowią parzysty narząd, którego zadaniem jest wymiana gazowa zachodząca pomiędzy wprowadzanym do płuc powietrzem a krwią. Zasadniczo zbudowane są one z trzech typów komórek zwanych pneumocytami. Pneumocyty typu I są płaskimi komórkami wyściełającymi, których zadaniem jest wymiana gazowa pomiędzy pęcherzykami płucnymi a krwią, natomiast rozproszone pomiędzy nimi mniejsze i grubsze komórki pneumocytów typu II są odpowiedzialne za wydzielanie sufraktantu płucnego, który między innymi pomaga rozszerzać się płucom podczas oddychania [1]. Pneumocyty typu III są nielicznymi komórkami o sześciennym kształcie, które prawdopodobnie pełnią funkcję chemoreceptorów [2]. Płuca wraz z jamą nosową, gardłem, krtanią, tchawicą oraz oskrzelami stanowią układ oddechowy człowieka [1].

Płuca uczestnicząc w wymianie gazowej są bezpośrednio narażone na zawarte w powietrzu toksyny, nanocząstki, patogeny wirusowe oraz bakteryjne, które mogą prowadzić do wielu chorób tego narządu. Należy zaznaczyć, że zawarte w dymie papierosowym substancje smoliste stanowią jeden z głównych czynników wywołujących nowotwory płuc [3].

#### 4.1.1. Choroby nowotworowe we współczesnym świecie

Choroby nowotworowe należą do chorób niezakaźnych, w przebiegu których obserwuje się niekontrolowany podział i wzrost zmienionych komórek własnych organizmu, spowodowany utratą kontroli nad prawidłowym przebiegiem cyklu komórkowego. W wyniku nadmiernej proliferacji komórek powstają guzy pierwotne o charakterze łagodnym lub złośliwym. W przypadku guzów o charakterze łagodnym powstałe zmiany nie tworzą przerzutów, oddzielone są wyraźną granicą od reszty tkanek i charakteryzują się powolnym wzrostem, dzięki czemu najczęściej nie stanowią bezpośredniego zagrożenia dla życia. W przeciwieństwie do łagodnych zmian nowotworowych, te o charakterze złośliwym stanowią bezpośrednie zagrożenie dla życia. Wynika to z faktu, że nowotwory złośliwe charakteryzują się m.in. zdolnością do tworzenia tzw. przerzutów, co znacząco utrudnia lub uniemożliwia skuteczną terapię [4-6].

Przyjmuje się, iż przyczyną procesów nowotworowych są różnego rodzaju mutacje, powielanie lub wyłączanie genów odpowiadających za kontrolę nad prawidłową proliferacją komórek i cyklem komórkowym oraz zmiany epigenetyczne [7]. Czynniki wywołujące nowotwory możemy podzielić na [5]:

- biologiczne związane z zakażeniami wirusowymi (m.in. wirusy HPV, HBV, HCV oraz HIV-1) i bakteryjnymi (np. bakteria *Helicobacter pylori*),
- **chemiczne** związane z działaniem substancji o właściwościach kancerogennych np. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA),
- **fizyczne** związane z ekspozycją na promieniowanie jonizujące.

Wyróżnia się następujące terapie przeciwnowotworowe [5, 7, 8]:

- **zabiegi chirurgiczne** mające na celu wycięcie guza wraz z marginesem zdrowej, niezmienionej nowotworowo tkanki,
- radioterapia opierająca się na zastosowaniu promieniowania jonizującego w celu niszczenia i utrudnienia namnażania się komórek nowotworowych,
- terapie fotodynamiczne (PDT) opierające się na generowaniu substancji czynnej pod wpływem światła,
- chemioterapia opierająca się o zastosowanie leków przeciwnowotworowych np. cis-platyny 1, 5-fluorouracylu 2, gemcytabiny 3, doksorubicyny 4 (Rys. 1),
- hormonoterapia opierająca się na zastosowaniu modulatorów receptorów np. estrogenowych takich jak tamoksyfen 5 lub toremifen 6 (Rys. 1),
- **immunoterapia** opierająca się na stymulacji naturalnych mechanizmów zwalczania komórek nowotworowych przez układ odpornościowy,
- terapia celowana opierająca się o zastosowanie przeciwciał monoklonalnych oraz małocząsteczkowych związków organicznych głównie inhibitorów białek z grupy kinaz tyrozynowych np. erlotynib 7, gefitynib 8, afatynib 9 (Rys. 1),
- terapie oparte o technologię RNA (mikroRNA, siRNA) opierające się na wyciszaniu genów odpowiedzialnych za powstawanie zmian nowotworowych za pomocą krótkich cząsteczek RNA.



Rys. 1. Przykłady leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej [5,7].

Choroby nowotworowe należą do tzw. chorób cywilizacyjnych. Według danych opublikowanych przez National Cancer Institute w 2023 roku zarejestrowano ponad 1 500 000 nowych przypadków różnych rodzajów nowotworów. Wśród najczęściej występujących są: nowotwory piersi, prostaty oraz płuc (Rys. 2) [9].



Rys. 2. Nowe przypadki nowotworów w 2023 roku [9].

Nowotwory płuc należą do nowotworów złośliwych wywodzących się z pneumocytów [3]. Stanowią one trzeci najczęściej występujący rodzaj nowotworu na świecie [9]. Według ogólnej klasyfikacji nowotwory płuc możemy podzielić na niedrobnokomórkowy nowotwór płuc NSCLC (ang. *non-small cell lung cancer*) oraz drobnokomórkowy nowotwór płuc SCLC (ang. *small cell lung cancer*), przy czym około 80 % przypadków wszystkich nowotworów płuc to NSCLC [10].

Głównymi środowiskowymi czynnikami wywołującymi nowotwory płuc są substancje smoliste, związki niklu, chromu, arsenu oraz azbest [3].

Nowotwór płuc jest chorobą trudną w leczeniu, co wynika nie tylko z przyczyn biologicznych ale też z faktu, że objawy bardzo często pojawiają się w jej zaawansowanej fazie. Wśród objawów występujących w chorobie nowotworowej płuc możemy wymienić uporczywy kaszel, krwioplucie, duszności, bóle w klatce piersiowej, bóle stawów, ogólne rozbicie i osłabienie oraz utratę masy ciała [3]. Rokowania w nowotworach płuc są niezbyt optymistyczne, o czym świadczą statystyki wskazujące, że 5-letnia przeżywalność wśród pacjentów, u których zdiagnozowano raka płuc w latach 2014 - 2020 wynosiła 26,7% [11].

W ramach terapii raka płuc stosowane są kombinacje różnych metod leczenia obejmujące zabiegi chirurgiczne, chemioterapię, immunoterapię, radioterapię jak i również terapię celowaną. W chemioterapii i terapii celowanej zmian nowotworowych płuc stosowane są w zależności od rodzaju i zaawansowania nowotworu m.in. wspomniane powyżej leki takie jak: **cisPt**, gemcytabina **3**, erlotynib **7**, gefitynib **8**, afatynib **9** [3, 5, 12 – 15].

#### 4.2. Inhibitory EGFR w terapii nowotworów płuc

Znaczącym postępem otwierającym nowy etap w farmakoterapii nowotworów płuc były badania nad rodziną receptorów kinaz tyrozynowych (TK), które w komórce uczestniczą m.in. w kontroli podziałów komórkowych [5]. Aktywność katalityczna kinaz zależy od ATP **10**, ponieważ odpowiadają one za fosforylację reszt tyrozynowych, co uruchamia kaskadę sygnałową i stymuluje proliferację komórek [5].

Opisany w 1978 roku receptor naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) należy do rodziny kinaz tyrozynowych i ulega nadekspresji w nowotworach płuc, przełyku, piersi, jamy ustnej, pęcherza [16 – 18]. W zależności od typu niedrobnokomórkowego raka płuc obserwuje się nadekspresję EGFR w zakresie od 65% do 100% przypadków, natomiast w drobnokomórkowych nowotworach płuc nadekspresji EGFR się nie obserwuje [19, 20].

Naturalnym ligandem receptora EGFR jest naskórkowy czynnik wzrostu (EGF). Białko to jest ligandem umożliwiającym dimeryzację dwóch receptorów EGFR, co prowadzi do aktywacji ich domen kinazowych (Schemat 1) [21]. W wyniku aktywacji następuje fosforylacja reszt tyrozynowych, w której źródłem grupy fosforanowej jest ATP **10**. Po procesie fosforylacji następuje transdukcja sygnału do jądra komórkowego, gdzie transkrypcji ulegają odpowiednie geny odpowiadające za wzrost i podział komórki [21].



#### Schemat 1. Mechanizm aktywacji EGFR [21].

Receptor naskórkowego czynnika wzrostu EGFR stanowi cel molekularny wielu małocząsteczkowych inhibitorów, których najliczniejszą grupę stanowią pochodne o szkielecie 4-aminochinazoliny **11** (Rys. 3) [5, 22, 23].



Rys. 3. 4-aminochinazolina 11.

Obecnie klinicznie stosowane są trzy generacje inhibitorów EGFR. Inhibitory I generacji oraz część inhibitorów EGFR II generacji należą do pochodnych 4-aminochinazoliny **11**, natomiast do inhibitorów III generacji zalicza się pochodne anilinopirymidyny **12**, które nie są w strefie zainteresowań niniejszej rozprawy doktorskiej [5]. Inhibitory EGFR wykazują skuteczność w terapii nowotworów gdy obecna jest co najmniej jedna mutacja receptora EGFR (L858R lub del19) [24]. Konieczność projektowania kolejnych inhibitorów EGFR wynika z faktu powstawania nowych mutacji w genie tego receptora, co powoduje oporność na działanie obecnie stosowanych inhibitorów EGFR [24]. Inhibitory I generacji wiążą się z receptorem EGFR na sposób niekowalencyjny w miejscu wiązania ATP **10**. Inhibitory te wykazują znaczącą aktywność w leczeniu pacjentów z mutacjami del19 i L858R. Odpowiedź kliniczna na terapię inhibitorami tej generacji wynosi 50 – 80% [24]. Kluczowymi przedstawicielami inhibitorów EGFR I generacji są erlotynib **7**, gefitynib **8** oraz lapatynib **13** (Rys. 4) [5, 25 – 28].



rok zatwierdzenia przez FDA: 2007

Rys. 4. Inhibitory EGFR I generacji [5].

Inhibitory EGFR II generacji mają charakter inhibitorów kowalencyjnych. Zawdzięczają to obecności w pozycji C-6 reaktywnej grupy akrylowej (akceptora Michaela) [5]. Grupa ta umożliwia utworzenie wiązania kowalencyjnego ze znajdującą się w sąsiedztwie domeny wiążącej ATP grupą tiolową cysteiny (Cys-797), co prowadzi do nieodwracalnej inhibicji receptora [29]. Pierwotnie II generacja inhibitorów EGFR zaprojektowania została w celu przełamywania oporności komórek NSCLC na działanie inhibitorów I generacji [24]. Oporność ta związana jest z mutacją T790M w eksonie 20, w wyniku której następuje zastąpienie treoniny 790 przez metioninę, co powoduje zwiększenie zawady sterycznej uniemożliwiającej inhibicję receptora przez inhibitory I generacji [24, 30, 31]. Niestety większość z inhibitorów II generacji ma niedopuszczalnie niską maksymalną tolerowaną dawkę, co znacząco ogranicza ich zastosowanie kliniczne [24]. Do nielicznej grupy inhibitorów II generacji stosowanych klinicznie zaliczamy afatynib **9** oraz neratynib **14** (Rys. 5) [5, 29, 32].



Rys. 5. Inhibitory EGFR II generacji [5].

Przedstawicielem III generacji inhibitorów EGFR jest ozymertynib **15** (Rys. 6) [5, 25]. Podobnie jak inhibitory II generacji związek ten posiada w swojej strukturze fragment stanowiący akceptor Michaela, przez co również ma zdolność do tworzenia wiązania kowalencyjnego z grupą tiolową cysteiny (Cys-797), co prowadzi do nieodwracalnej inhibicji receptora [29]. Ozymertynib **15** w odróżnieniu do inhibitorów EGFR II generacji posiada w swojej strukturze pierścień aminopirymidynowy i wykazuje aktywność wobec niedrobnokomórkowego raka płuc z mutacją T790M [24, 33]. Niestety dalsze mutacje genetyczne EGFR powodują oporność na działanie III generacji inhibitorów EGFR, czego przykładem jest mutacja punktowa C797S [24]. W wyniku tej mutacji następuje zastąpienie reaktywnej reszty cysteiny w pozycji 797 przez mniej reaktywną resztę seryny, co zapobiega tworzeniu się wiązania kowalencyjnego z fragmentem akceptora Michaela cząsteczki inhibitora III generacji [24].



rok zatwierdzenia przez FDA: 2015

Rys. 6. Inhibitor EGFR III generacji [5].

#### 4.2.1. Erlotynib

Erlotynib **7** (*Tarceva<sup>TM</sup>*) jest jednym z leków stosowanych w terapii niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC). Powstał on w wyniku wspólnych prac firm OSI Pharmaceuticals, Genentech oraz Roche i został dopuszczony do obrotu przez FDA w 2004 roku [26, 34]. Erlotynib **7** w postaci chlorowodorku podawany jest doustnie, jego biodostępność wynosi 60%, natomiast okres półtrwania wynosi 36 godzin [4, 35]. Związek ten jest niekowalencyjnym inhibitorem EGFR i wiążę się on w miejscu wiązania ATP **10** zmutowanej domeny kinazowej receptora EGFR, występującej w zmienionych nowotworowo komórkach [4, 5, 36].

Rysunek 7 przedstawia struktury krystalograficzne erlotynibu **7** związanego z domeną kinazową receptora EGFR [37, 38].



Rys. 7. Struktury krystalograficzne domeny kinazowej EGFR związanej z erlotynibem 7.
a) Struktura PDB 1M17 [37] b) Struktura PDB 4HJO [38].
Źródło: baza PDB (https://www.rcsb.org)

Z przedstawionych struktur krystalograficznych wynika, że cząsteczka erlotynibu **7** wiąże się z białkiem w obszarze między tzw. *N*-terminalnym a *C*-terminalnym "płatkiem" (ang. *lobe*) domeny kinazowej EGFR [37, 38].

Porównując budowę chemiczną ATP **10** oraz cząsteczki erlotynibu **7** można odnaleźć podobieństwa strukturalne między nimi. Umożliwiają one dopasowanie erlotynibu **7** do miejsca wiązania ATP **10** w domenie kinazowej EGFR. Wśród motywów strukturalnych występujących w cząsteczce erlotynibu **7** odpowiadających fragmentom strukturalnym obecnych w ATP **10** można wyróżnić [5]:

- Pierścień chinazoliny odpowiadający uczestniczącemu w wiązaniu z receptorem fragmentowi adeniny w cząsteczce ATP 10 (fragmenty cząsteczek zaznaczone kolorem niebieskim na Rys. 8).
- Podstawniki alkoksylowe w położeniu 6 oraz 7 pierścienia chinazoliny, które odpowiadają fragmentowi rybozy w cząsteczce ATP 10 (fragmenty cząsteczek zaznaczone kolorem różowym na Rys. 8) i stabilizują kompleks aktywny inhibitorenzym.



Rys. 8. Porównanie strukturalne cząsteczki ATP 10 oraz erlotynibu 7 [5].

Erlotynib **7** selektywniej wiąże się z domeną kinazową receptora posiadającego onkogenne mutacje w eksonie 19 oraz 21 [24]. Dzięki temu skuteczność terapii erlotynibem **7** wynosi nawet 80% [5]. Niestety pojawienie się kolejnych mutacji domeny TK receptora EGFR np. mutacji T790M w eksonie 20, czyni komórki nowotworowe opornymi na erlotynib **7**, a terapię nieskuteczną [31].

Jednym z fragmentów cząsteczki erlotynibu **7** jest podstawnik etynylowy. Stanowi on dogodny element umożliwiający jej modyfikację za pomocą reakcji typu "click".

#### 4.2.2. Pochodne erlotynibu zawierające atomy metali o aktywności przeciwnowotworowej

Chemia biometaloorganiczna stanowi gałąź chemii, której obszar zainteresowań obejmuje zagadnienia związane z syntezą oraz badaniem aktywności biologicznej związków metaloorganicznych, których cechą charakterystyczną jest obecność co najmniej jednego wiązania metal-węgiel [39].

Pierwszym opisanym w literaturze przykładem metaloorganicznej pochodnej erlotynibu **7** jest kompleks złota (I) **16** (Rys. 9) [40].



Rys. 9. Kompleks erlotynibu z Au(I) 16 [40].

Został on zbadany pod kątem aktywności przeciwnowotworowej wobec linii komórkowych nowotworów piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231, raka jelita grubego HT-29 oraz niezmienionych nowotworowo komórek nerek RC-124 i BGM. Badania wykazały, że kompleks **16** (IC<sub>50</sub> = 1,64 ± 0,13  $\mu$ M) jest około 42-krotnie aktywniejszy od erlotynibu **7** (IC<sub>50</sub> = 68,11 ± 11,15  $\mu$ M) wobec komórek MDA-MB-231 [40]. W przeciwieństwie do erlotynibu **7** związek **16** wykazuje również wysoką aktywność wobec linii komórek MCF-7 oraz HT-29. Niestety problemem okazała się wysoka toksyczność **16** wobec komórek RC-124 (IC<sub>50</sub> = 0,96 ± 0,28  $\mu$ M) [40]. Przeprowadzone badania wykazały, że mechanizm działania **16** związany jest z generowaniem reaktywnych form tlenu (ROS), które powodowały uszkodzenia DNA oraz redukcję potencjału transbłonowego w mitochondriach, co w konsekwencji prowadziło do skierowania komórek na drogę apoptozy [40].

Kolejnymi przykładami analogów erlotynibu **7** zawierającymi atomy metali są kompleksy platyny (IV) **17** i **18** (Rys. 10) [41].



Rys. 10. Kompleksy Pt (IV) pochodnej 4-aminochinazoliny 17 i 18 [41].

Kompleksy **17** i **18** stanowią ciekawe połączenie dwóch różniących się mechanizmem działania leków przeciwnowotworowych jakimi są oksaliplatyna **19** (Rys. 11) i erlotynib **7**.



**Rys. 11.** Oksaliplatyna **19** [41].

Terapii **cisPt** towarzyszą znaczące efekty uboczne związane m.in. z neurotoksycznością, nefrotoksycznością oraz ototoksycznością [42]. W związku z tym coraz częściej podczas projektowania nowych pochodnych **cisPt** stosuje się kompleksy platyny (IV), które działają jako proleki i wykazują niższą ogólnoustrojową toksyczność od kompleksów platyny (II). W strategii tej zakłada się, iż po wniknięciu do komórek nowotworowych kompleksy platyny (IV) ulegają redukcji do kompleksów platyny (II) [41, 42].

Aktywność przeciwnowotworowa kompleksów **17** i **18** została zbadana wobec komórek linii A549, A431, H1299 oraz H1975. Oznaczone wartości IC<sub>50</sub> mieściły się w zakresie  $6 - 8 \mu$ M, czyli podobnym co dla **cisPt** i **oksaliPt** (7 – 9  $\mu$ M) [41].

Innym przykładem kompleksu metalu zawierającego fragment erlotynibu jest porfirynoid **20**, którego aktywność przeciwnowotworowa została przebadana wobec komórek raka wątroby linii HepG2 (Rys. 12) [43].



Rys. 12. Kompleks erlotynibu 20 [43].

Związek **20** posiada właściwości fotocytotoksyczne. Po naświetlaniu światłem o długości fali  $\lambda$ = 670 nm eliminował on komórki HepG2 (IC<sub>50</sub>= 9,61 ± 2,49 nM) [43, 44].

W literaturze opisany został również kompleks **21**, w którym erlotynib został przyłączony do radioaktywnego fragmentu zawierającego izotop <sup>68</sup>Ga (Rys. 13) [45]. Przeprowadzone badania aktywności cytotoksycznej dla ligandu kompleksu **21** wobec linii komórkowej nowotworu skóry A431 wykazały, że cytotoksyczność po 72 godzinnej inkubacji wynosiła 87,5 ± 0,3%. Dodatkowo stwierdzono, że wchłanialność kompleksu **21** przez komórki linii A431 wynosiła 9,8 ± 0,4% [45].



**Rys. 13.** Kompleks **21** erlotynibu z radioaktywnym izotopem <sup>68</sup>Ga [45].

#### 4.3. Azydotymidyna (AZT)

Azydotymidyna (AZT, 3'-azydo-3'-deoksytymidyna) **22** znana powszechnie pod nazwą handlową *Zidovudine* jest azydkowym analogiem tymidyny **23** stosowanym w terapii AIDS (Rys. 14) [21]. Różnica strukturalna pomiędzy AZT a tymidyną **23**, polega na obecności grupy azydkowej -N<sub>3</sub> w pozycji C3'pierścienia deoksyrybozy zamiast grupy hydroksylowej -OH obecnej w tymidynie **23**.



Rys. 14. Porównanie strukturalne AZT i tymidyny 23 [21].

Historia AZT rozpoczyna się w 1964 roku kiedy została ona otrzymana jako potencjalny lek przeciwnowotworowy przez J. Horowitza [46]. Ze względu na niską aktywność oraz liczne skutki uboczne została ona wycofana z programu dalszych badań [47]. W roku 1985 H. Mitsuya dowiódł, że AZT wykazuje efektywne działanie wobec retrowirusów HIV-1 i HIV-2, a mechanizm jej działania polega na inhibicji odwrotnej transkryptazy wirusa [47, 48]. Odkrycie to dało nowy impuls do zastosowania azydotymidyny **22** w terapii przeciwwirusowej, dzięki czemu w 1987 roku została ona dopuszczona do użytku klinicznego [47].

Okres półtrwania AZT jest krótki i po podaniu dożylnym wynosi około 1 godziny [4]. W organizmie AZT ulega enzymatycznej fosforylacji do aktywnego metabolitu jakim jest 3'-azydo-3'-deoksytymidyno-5'-trifosforan (N3dTTP) **24** (Rys. 15) [47]. Trifosforan **24** jest wbudowywany przez odwrotną transkryptazę wirusa w rosnący łańcuch DNA. Wbudowany nukleotyd **24** nie posiada grupy hydroksylowej w pozycji C3', co skutkuje brakiem możliwości elongacji łańcucha oligonukleotydowego i wstrzymaniem replikacji wirusa [21, 47].



Rys. 15. Porównanie strukturalne N3dTTP 24 oraz dTTP 25 [47].

Ze względu na toksyczność, liczne skutki uboczne (anemia, neutropenia, miopatia) oraz zdolność wirusów do nabywania lekooporności, obecnie AZT stosuje się w terapii skojarzonej z innymi lekami przeciwwirusowymi [47, 49]. Takie podejście leczenia określane jest jako HAART (ang. *highly active antiretroviral therapy*). W ramach terapii HAART stosuje się najczęściej kombinację dwóch nukleozydowych inhibitorów wirusowej odwrotnej transkryptazy (NRTI) oraz inhibitor proteazy (PI). Wśród NRTI stosowanych razem z AZT możemy wyróżnić takie substancje jak: didanozyna **26**, lamiwudyna **27**, stawudyna **28**, natomiast jako PI stosuje się m.in. rytonawir **29** i sakwinawir **30** (Rys. 16) [21, 49].



Rys. 16. Wybrane substancje stosowane w ramach terapii HAART wraz z AZT [21, 49].

Ze względu na obecność grupy azydkowej, cząsteczka azydotymidyny **22** może być modyfikowana za pomocą reakcji typu "click". Fakt ten postanowiłem wykorzystać w swoich badaniach stosując reakcję CuAAC do otrzymania ferrocenylowych pochodnych AZT.

# **4.3.1**. Wybrane metaloorganiczne pochodne nukleozydów pirymidynowych o aktywności przeciwnowotworowej

Chemia zawierających atomy metali przejściowych pochodnych nukleozydów (w tym ich koniugatów metaloorganicznych) stanowi interesujący obszar badań [50].

Spośród opisanych w literaturze metaloorganicznych pochodnych nukleozydów pirymidynowych są kobalto-karbonylkowe pochodne 5-etynylo-2'-deoksyurydyny **31**, **32** oraz **33** (Rys. 17) [51].



Rys. 17. Kompleksy kobalto-karbonylkowe 5-etynylo-2'-deoksyurydyny 31, 32 i 33 [51].

Aktywność cytotoksyczna kompleksów **31** – **33** była badana *in vitro* wobec linii komórkowych ludzkich nowotworów piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231 (Tabela 1) [51]. Mimo znaczącej aktywności związki **31** – **33** były mniej aktywne niż **cisPt** [51].

Związek	Wartości IC <sub>50</sub> ± SD (μM)	
	MCF-7	MDA-MB-231
31	6,8 ± 1,0	10,6 ± 0,6
32	10,9 ± 2,0	6,8 ± 3,2
33	6,7 ± 4,6	19,4 ± 4,5
cisPt	2,0 ± 0,3	4,0 ± 1,5

**Tabela 1.** Wartości IC<sub>50</sub> kompleksów **31 – 33** [51].
Innymi opisanymi w literaturze przykładami są kompleksy **34 – 38** (Rys. 18), których aktywność przeciwnowotworowa była badana wobec komórek raka płuc A549 [52]. Związkami referencyjnymi były AZT (IC<sub>50</sub> = 1800 ± 220  $\mu$ M) oraz 5-FU (IC<sub>50</sub> = 42 ± 7  $\mu$ M) [52].



Rys. 18. Pochodne trikarbonylkorenowe tymidyny 34 – 38 [52].

Najwyższą cytotoksyczność wykazał kompleks **38** ( $IC_{50} = 6,6 \pm 3,0 \mu M$ ) [52]. Badania dowiodły również, że skrócenie długości łącznika pomiędzy fragmentem tymidynowym i metaloorganicznym prowadzi do znaczącego spadku aktywności zarówno w przypadku kompleksów podstawionych w położeniu N3 (**34** i **35**) jak i C5' (**36** – **38**) [52].

Kolejnymi ciekawymi przykładami są pochodne cytydyny zawierające atom żelaza **39 – 42** (Rys. 19). Ich aktywność przeciwnowotworowa była badana wobec komórek chłoniaka typu Burkitta (BJAB) [53, 54].



Rys. 19. Pochodne cytozyny zawierające fragment Fe(CO)<sub>3</sub> 39 – 42 oraz pochodna cytozyny 43 [53, 54].

Najbardziej aktywnym spośród nich był związek **40** (IC<sub>50</sub> = 10  $\mu$ M). Jego mechanizm działania polega na indukcji apoptozy [53]. Przeprowadzone badania wykazały również, że pozbawiony fragmentu metaloorganicznego nukleozyd **43** nie wykazuje aktywności przeciwnowotworowej. Wskazuje to na zasadnicze znaczenie fragmentu Fe(CO)<sub>3</sub> jako induktora aktywności przeciwnowotworowej [53].

W literaturze opisano również siarkowe pochodne 44 i 45 (Rys. 20) [55].



Rys. 20. Związki 44 i 45 [55].

Aktywność przeciwnowotworową związków **44** i **45** badano wobec komórek linii HT-29, MCF-7, MDA-MB-231, białaczki promielocytowej HL-60 oraz wobec linii ludzkich monocytów MonoMac6, która pochodziła od pacjentów z ostrą białaczką monocytową [55]. Wykazano, że związek **45** był bardziej aktywny od **cisPt** wobec linii MCF-7, MDA-MB-23, HL-60 oraz MonoMac6, natomiast aktywność cytotoksyczna związku **44** była niższa od związku **45** i **cisPt** (Tabela 2) [55].

Związek	Wartości IC₅₀ ± SD (μM)				
	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	HL-60	MonoMac6
44	>100	11,1 ± 12,6	>100	88,3 ± 15,7	28,6 ± 5,4
45	23,2 ± 4,0	5,1 ± 1,4	8,3 ± 0,6	4,5 ± 0,3	17,4 ± 4,2
cisPt	7,5 ± 1,8	8,3 ± 2,7	18,6 ± 5,3	3,6 ± 0,2	36,5 ± 10,2

Tabela 2. Wyniki aktywności cytotoksycznej związków 44 i 45 [55].

### 4.4. Reakcje CuAAC i RuAAC

Termin chemia "click" wprowadzony został przez K. B. Sharplessa i współpracowników w 2001 roku i odnosi się do reakcji, które przebiegają z wysoką wydajnością, w warunkach "tlenowych" i rozpuszczalnikach zawierających wodę lub zachodzących bez udziału rozpuszczalnika. Reakcje te cechują się również tolerancją wobec szerokiej gamy grup funkcyjnych, przebiegają z wysoką selektywnością i bardzo często w temperaturze pokojowej [56].

Założenia chemii "click" spełnione są przez kilka klas reakcji chemicznych, wśród których w pierwszej kolejności należy wymienić katalizowaną jonami miedzi (I) reakcję [3+2] cykloaddycji azydków do alkinów (CuAAC) (Schemat 2) [57].



Schemat 2. Schemat ogólny reakcji CuAAC [57].

Jako katalizatory w reakcjach CuAAC stosuje się sole Cu (I) lub (II). Te ostatnie ulegają redukcji w środowisku reakcji do Cu(I).

Reakcje dipolarnej [3+2] cykloaddycji znane są chemikom od długiego czasu i dzięki pracom zespołu R. Huisgena ich zrozumienie znacząco wzrosło w drugiej połowie XX wieku [58, 59]. Jednak dopiero odkrycie reakcji CuAAC przez zespoły K. B. Sharpless'a i M. Meldal'a otworzyło drogę do szerokiego zastosowania koncepcji chemii "click" w wielu obszarach [60 – 71].

Zanim odkryto reakcje CuAAC, reakcje [3+2] cykloaddycji azydek-alkin przeprowadzane były w warunkach podwyższonej temperatury. Przebiegały one długo i prowadziły do mieszaniny izomerycznych 1,4 i 1,5 triazolowych produktów, czego przykładem może być opisana w 1951 roku reakcja azydku fenylu **49** z 3,3-dietoksyprop-1-ynem **50** (Schemat 3) [72].



Schemat 3. Reakcja azydku fenylu 49 z 3,3-dietoksyprop-1-ynem 50 [72].

Zastosowanie miedzi umożliwiło selektywne otrzymywanie 1,4-dipodstawionych 1,2,3-triazoli z wysoką wydajnością (Schemat 4) [60, 61].



**Schemat 4.** Schemat reakcji CuAAC (azydometylo)benzenu **53** z eterem fenylowo-propargilowym **54** [60].

Kolejnym etapem w rozwoju chemii "click" była opisana w 2005 roku przez zespół K. B. Sharplessa katalizowana rutenem reakcja cykloaddycji azydków do alkinów (RuAAC). Umożliwia ona regioselektywne otrzymanie 1,5-dipodstawionych pochodnych triazolowych (Schemat 5) [73].



Schemat 5. Schemat ogólny reakcji RuAAC [73].

Jako katalizator tej reakcji stosuje się  $\eta^5$ -pentametylocyklopentadienylowy kompleks rutenu **57** (Rys. 21) [73].



**Rys. 21.** Cp<sup>\*</sup>RuCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> **57** [73].

Dalsze badania nad reakcją cykloaddycji azydków do alkinów zaowocowały odkryciem innych odmian tych reakcji, w których rolę katalityczną pełni iryd (IrAAC) [74], srebro (AgAAC) [75 – 77], cynk (ZnAAC) [78] oraz złoto (AuAAC) [79]. Interesującym przykładem są też fotokatalityczne odmiany tych reakcji (PcAAC) [80].

#### 4.4.1. Mechanizm reakcji CuAAC i RuAAC

Mechanizm reakcji CuAAC był przedmiotem licznych badań, a ten zaproponowany przez Bertranda oraz współpracowników przedstawia Schemat 6 [81 – 83].



Schemat 6. Mechanizm reakcji CuAAC zaproponowany przez G. Bertranda [81].

Mechanizm zakłada istnieje dwóch cyklów katalitycznych A i B. Cykl B jest kinetycznie preferowany. W pierwszym, determinującym szybkość reakcji etapie powstaje  $\sigma$ -Cu alkinowy kompleks **58**. Ulega on następnie odwracalnemu przekształceniu w  $\pi$ , $\sigma$  – bis(Cu) alkilowy kompleks **59**. Następnie zakłada się, iż kompleks **59** przyłącza się do azydku **47** tworząc cykliczny "dimetaloaddukt" **60**. Addukt ten w reakcji z alkinem **46** zostaje przekształcony do 1,4-dipodstawionego 1,2,3-triazolu **48** oraz odtwarza się kompleks **59**. który rozpoczyna kolejny cykl katalityczny. W cyklu A  $\sigma$ -Cu alkinowy kompleks **58** ulegając reakcji addycji do azydku **47** tworzy trwały termodynamicznie pośredni cykliczny kompleks **61**. Następnie kompleks ten zostaje przekształcony na drodze reakcji z alkinem **46** w 1,4-dipodstawiony 1,2,3-triazol **48** oraz odtwarza się  $\sigma$ -Cu alkinowy kompleks **58**, który rozpoczyna kolejny cykl katalityczny.

Warto podkreślić, że budowę kompleksu **59** potwierdzono za pomocą rentgenografii strukturalnej monokryształów [81].





Schemat 7. Mechanizm reakcji RuAAC zaproponowany przez V. Fokina [84].

Pierwszy etap mechanizmu obejmuje substytucję ligandów PPh<sub>3</sub> w strefie koordynacyjnej Ru przez cząsteczki alkinu **46** i azydku **47**. Powstały kompleks **62** ulega sprzęganiu oksydacyjnemu, w wyniku czego tworzy się rutenocykliczny kompleks **63**. Ulega on przegrupowaniu dając związek **64**. Eliminacja triazolu **56** i odtworzenie katalizatora **57** zamyka cykl katalityczny [57, 84].

# 4.4.2. Metaloorganiczne 1,2,3-triazole o aktywności przeciwnowotworowej – wybrane przykłady.

W ostatnich latach reakcja CuAAC znajduje coraz szersze zastosowanie w chemii biometaloorganicznej [85]. W niniejszej dysertacji nie sposób omówić wszystkie opisane przykłady aktywnych przeciwnowotworowo biometalokoniugatów otrzymanych za jej pomocą. Omówione więc zostaną tylko wybrane z nich.

43

Jako pierwsze na uwagę zasługują kompleksy platyny (IV) **65** i **66** (Rys. 22 i Rys. 23) [86, 87]. Ich cechą charakterystyczną jest obecność aktywowanego przez ROS fragmentu *N*-alkiloaminoferrocenylowego (NAAF)



Rys. 22. Kompleks N-alkiloaminoferrocenylowy Pt (IV) 65 [86].



Rys. 23. Kompleks N-alkiloaminoferrocenylowy Pt (IV) 66 [87].

Cząsteczki te są prolekami i po wniknięciu do komórek nowotworowych ulegają aktywacji przez reaktywne formy tlenu (ROS) i dysocjacji zgodnie z równaniem przedstawionym na Schemacie 8 [86].



Schemat 8. Schemat aktywacji kompleksu 65 przez ROS [86].

Powstałe w wyniku tej reakcji **67**<sup>+</sup>, **68** oraz **cisPt** wykorzystują swoiste i różniące się od siebie mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej. **CisPt** działa jako czynnik alkilujący DNA [7]. Związek **68** blokuje aktywność występujących w organizmie zmiataczy wolnych rodników, co skutkuje zmniejszeniem ochrony komórek nowotworowych przed działaniem ROS. Kation **67**<sup>+</sup> działa natomiast jako generator wolnych rodników wykorzystując cykl Fentona (Schemat 9) [86 – 88].



Schemat 9. Cykl Fentona [88].

Warto zwrócić również uwagę, że aktywacja omawianych kompleksów **65** i **66** zachodzi o wiele efektywniej w komórkach nowotworowych, ze względu na fakt wysokiego stężenia ROS wewnątrz tych komórek. Przyjmuje się, iż w niezmienionych nowotworowo komórkach stężenie ROS jest na ogół niższe, dzięki czemu kompleksy **65** i **66** cechują się selektywnością wobec komórek nowotworowych [86, 87, 89].

Badania aktywności przeciwnowotworowej związków **65** i **66** zostały przeprowadzone wobec linii komórek A2780 oraz A2780cis, jak i również wobec niezmienionej nowotworowo linii HDFa (Tabela 3) [87].

Związek	Wartości IC₅₀ ± SD (μM)		
	A2780	A2780cis	HDFa
65	2,5 ± 0,5	6,0 ± 1,0	>25
66	$0,4 \pm 0,1$	0,7 ± 0,2	18,0 ± 3,0
cisPt	2,1 ± 0,3	13,0 ± 1,0	41,0 ± 4,0

Tabela 3. Wyniki aktywności cytotoksycznej związków 65 i 66 [87].

Badania wykazały, że kompleks **65** wykazuje wyższą aktywność wobec komórek A2780cis oraz zbliżoną aktywność wobec komórek A2780 w porównaniu do **cisPt**. Jednocześnie nie wykazuje on aktywności wobec niezmienionych nowotworowo komórek HDFa [87]. Kompleks **66** wykazuje znaczącą cytotoksyczność zarówno wobec komórek A2780 i A2780cis jak i wobec nienowotworowych komórek HDFa [87].

W literaturze opisana została bimetaliczna sól **69** zawierająca grupę ferrocenylową oraz złoto (I) (Rys. 24) [90].



Rys. 24. Związek 69 [90].

Kompleks **69** wykazał znaczącą aktywność przeciwnowotworową wobec linii A549 jak i H1975 (IC<sub>50</sub> = 0,89  $\mu$ M dla A549 i 0,23  $\mu$ M dla H1975). Niestety związek ten wykazał również znaczącą toksyczność wobec niezmienionych nowotworowo komórek HEK-293 (IC<sub>50</sub> = 5,43  $\mu$ M) [90].

W kontekście omawianych koniugatów na uwagę zasługują ferrocenylowe i rutenocenylowe pochodne sulfonoamidów **70 – 83** (Rys. 25) [91, 92].



**Rys. 25.** Metalocenylowe sulfonoamidy zawierające pierścień 1,2,3-triazolowy **70 – 83** [91, 92].

W celach porównawczych otrzymano również ich organiczne analogi **84** – **89** (Rys. 26) [91].



Rys. 26. Organiczne sulfonoamidy zawierające pierścień 1,2,3-triazolowy 84 – 89 [91].

Badania aktywności biologicznej związków **70** – **89** dotyczyły ich aktywności inhibitorowej wobec anhydraz węglanowych (CA) [91, 92]. Enzymy te ulegają nadekspresji w komórkach wielu rodzajów nowotworów. Stanowią więc atrakcyjny cel dla potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Obecność ugrupowania fenylosulfonoamidowego w **70** – **89** implikuje ich zdolność do wiązania się z anhydrazami poprzez koordynację do jonów Zn<sup>2+</sup> obecnych w ich centrum aktywnym [91, 92]. Przeprowadzone badania biologiczne wykazały, że część z otrzymanych metaloorganicznych pochodnych **70** – **83** wykazuje większą zdolność do inhibicji różnych typów CA w porównaniu do ich organicznych analogów **84** – **89** [91, 92].

W literaturze opisano również *ansa*-ferrocenylowe pochodne **90** i **91** zawierające pierścień 1,2,3-triazolowy (Rys. 27) [93].



Rys. 27. Ansa-ferrocenylowe pochodne 90 i 91 zawierające pierścień 1,2,3-triazolowy [93].

Aktywność cytotoksyczną **90** i **91** badano wobec komórek linii MCF-7, A549 oraz MDA-MB-231. Badania wykazały, że związek **90** wykazuje niższą aktywność wobec badanych linii komórkowych w odniesieniu do **cisPt**, natomiast aktywność przeciwnowotworowa związku **91** była zbliżona do tej wykazanej przez **cisPt** (Tabela 4) [93].

Związek	Wartości IC₅₀ ± SD (μM)		
	A549	MCF-7	MDA-MB-231
90	28,5 ± 2,2	47,1 ± 1,1	89,6 ± 7,5
91	10,9 ± 1,7	28,7 ± 2,0	30,3 ± 4,3
cisPt	4,6 ± 1,4	32,9 ± 0,8	23,0 ± 4,6

Tabela 4. Wyniki aktywności cytotoksycznej związków 90 i 91 [93].

#### 4.5. Wirus SARS-CoV-2 – wyzwanie współczesnej cywilizacji

Pandemia Covid-19 rozpoczęła się w grudniu 2019 roku w mieście Wuhan w Chinach i wywołana została przez wirusa zespołu ostrej niewydolności oddechowej SARS-CoV-2, który wraz z wirusami SARS-CoV-1 i MERS-CoV należy do rodziny tzw. koronawirusów [94]. Zgodnie z danymi WHO do października 2023 roku zostało potwierdzonych ponad 771 mln przypadków zakażeń SARS-CoV-2 na całym świecie, z czego ponad 7 mln z nich zakończyło się zgonem [95]. W Polsce według danych opublikowanych przez Ministerstwo Zdrowia do października 2023 roku potwierdzono ponad 6,5 mln przypadków zakażenia SARS-CoV-2, z czego około 120 tys. zakażonych zmarło [96].

Wirus SARS-CoV-2 jest wirusem (+)-RNA. Kluczowym elementem jego budowy umożliwiającym wnikanie do wnętrza komórek gospodarza jest białko kolca S (ang. *spike*) [97–100]. Białko S należy do tzw. białek transmembranowych typu I. Składa się z podjednostek S1 i S2 o całkowitej długości 1273 aminokwasów [101]. Domena wiążąca receptor (RBD) podjednostki S1 odpowiada za wiązanie z receptorem ACE2, natomiast podjednostka S2 uczestniczy w fuzji wirusa do komórki gospodarza [97, 102–104]. Proces wiązania białka S z receptorem ACE2 i wnikanie wirionów SARS-CoV-2 wymaga proteolitycznej aktywacji (rozczepienie białka S w pozycji S1/S2 i S2') oraz znaczącej reorganizacji konformacyjnej białka S [97, 105]. W procesie tym uczestniczą proteazy komórek gospodarza takie jak: TMPRSS-2, furyna oraz katepsyna L [97, 105]. Wyróżnia się dwa podstawowe mechanizmy wnikania wirusa SARS-CoV-2 do komórek gospodarza: drogę endosomalną (ścieżka A) oraz poprzez fuzję z błoną komórkową gospodarza za pomocą receptorów ACE2 (ścieżka B) przedstawione na Schemacie 10 [97, 106, 107].



Schemat 10. Cykl życiowy wirusa SARS-CoV-2 [106].

W drodze endosomalnej wiriony SARS-CoV-2 zostają zamknięte w endosomach utworzonych z błony komórkowej gospodarza (etap 1A). Wewnątrz nich następuje aktywacja kolca S wirusa poprzez działanie katepsyny L w środowisku kwasowym (etap 2A) i uwolnienie wirusowego RNA do wnętrza komórek gospodarza (etap 3A) [97, 106, 107].

W przypadku ścieżki B wirus wnika poprzez wiązanie się z receptorem ACE2 za pomocą kolca S (etap 1B). Następnie pod wpływem proteazy serynowej TMPRSS2 znajdującej się blisko receptora ACE2 białko kolca S ulega aktywacji, co umożliwia fuzję z błoną komórkową gospodarza (etap 2B) i uwolnienie wirusowego RNA do wnętrza komórki (etap 3B) [97, 106].

Po uwolnieniu materiału genetycznego wirusa kolejne etapy cyklu replikacyjnego są wspólne dla obu mechanizmów i obejmują [106 – 109]:

- translację poliprotein pp1a oraz pp1ab (etap 4), które są rozcinane przez wirusowe proteazy 3CL<sup>Pro</sup> i PL<sup>Pro</sup>, w wyniku czego tworzone są niestrukturalne białka funkcjonalne m.in RdRp (etap 5)
- replikację mRNA (etap 6)
- translację białek strukturalnych wirusa: kolca (S), osłonki (E) i błony (M) na szorstkiej siateczce śródplazmatycznej (etap 7)
- translację białka nukleokapsydu (N) w cytoplazmie (etap 8) i połączenie go z genomowym RNA wirusa, w wyniku czego powstaje nukleokapsyd (etap 9)
- składanie wirionu poprzez połączenie nukleokapsydu z białkami kolca, osłonki i błony w aparacie Golgiego (etap 10)
- zamknięcie dojrzałego wirionu w pęcherzyku i uwolnienie go z aparatu Golgiego (etap 11)
- egzocytozę wirionu zdolnego do infekcji kolejnej komórki gospodarza (etap 12)

Oprócz omówionych powyżej mechanizmów wnikania wirusa SARS-CoV-2 podejrzewa się, że w jego internalizację może być zaangażowany również receptor EGFR [110]. Jest to tym bardziej uzasadnione, iż są dowody na to, że receptor EGFR jest zaangażowany we wnikanie wirusa grypy typu A do ludzkich komórek raka płuc A549 [111]. Podjednostka S1 glikoproteiny S wirusa SARS-CoV-2 ma zdolność do aktywacji receptora EGFR i jego szlaku sygnałowego związanego z aktywacją AKT oraz ERK1/2 [110]. Dowiedziono również, że aktywacja AKT indukowana przez wirusa SARS-CoV-2 zależna jest od receptora EGFR, ponieważ jego inhibicja prowadzi również do zahamowania aktywności AKT [110]. Pewnym dowodem potwierdzającym słuszność tego alternatywnego mechanizmu wnikania wirusa jest fakt, że nasilenie objawów Covid-19 obserwuje się nie tylko u pacjentów cierpiących na nadciśnienie i choroby sercowo-naczyniowe, co związane jest z nadekspresją receptorów ACE2, ale również u pacjentów cierpiących na nowotwór płuc, u których obserwuje się nadekspresję receptora EGFR [110, 112]. Dodatkowo przeprowadzone badania kliniczne wskazują, że śmiertelność z powodu Covid-19 u pacjentów onkologicznych leczonych inhibitorami EGFR jest niższa w porównaniu z pacjentami leczonymi chemioterapią, immunoterapią lub zabiegami chirurgicznymi [113, 114].

Należy podkreślić, że mechanizm wnikania wirusa SARS-CoV-2 angażujący receptor EGFR jest bardzo mało poznany.

## 4.5.1. Wybrane związki o aktywności przeciw SARS-CoV-2

Chemia medyczna intensywnie poszukuje nowych leków o aktywności przeciw wirusom z rodziny SARS-CoV. W pierwszej kolejności wymienić tu należy inhibitor polimerazy RdRp jakim jest remdesiwir **92** (Rys. 28) [115].



Rys. 28. Remdesiwir 92 [115].

Innymi celami molekularnymi dla związków o aktywności przeciw SARS-CoV-2 są proteazy 3CL<sup>Pro</sup> i PL<sup>Pro</sup> [116].

Firma Pfizer opracowała związek o nazwie nirmatrelwir **93**, który jest kowalencyjnym inhibitorem proteazy 3CL<sup>Pro</sup> stosowanym w leczeniu Covid-19. Związek ten sprzedawany jest razem z rytonawirem **29** w postaci preparatu doustnego o nazwie *Paxlovid* (Rys. 29) [117].



Rys. 29. Nirmatrelwir 93 [117].

Innymi literaturowymi przykładami inhibitorów 3CL<sup>Pro</sup> o potencjalnym zastosowaniu w terapii Covid-19 mogą być pochodne izochinolin-5-olu **94** i izochinoliny **95** (Rys. 30) [118].



Rys. 30. Pochodne izochinolin-5-olu 94 i izochinoliny 95 [118].

Opisane związki **94** i **95** wykazują zbliżoną zdolność do inhibicji enzymu  $3CL^{Pro}$  ( $IC_{50} = 71 \pm 4$  nM dla **94** i  $IC_{50} = 72 \pm 6$  nM dla **95**) [118]. Stwierdzono, że związek **95** jest niekowalencyjnym, kompetencyjnym inhibitorem  $3CL^{Pro}$  [118]. W ramach badań przeciwwirusowych zbadano zdolność blokowania replikacji wirusa SARS-CoV-2 przez związki **94** i **95** na zakażonej tym wirusem komórek linii A549-hACE2. Wyniki wskazują, że związki te mają wysoką zdolność do blokowania replikacji SARS-CoV-2 (wartość IC<sub>50</sub> dla związku **94** wynosiła 54 ± 10 nM, natomiast dla związku **95** 12 ± 1 nM) [118]. Podobną zależność zaobserwowano również dla związku **95** wobec niezmienionych nowotworowo komórek nabłonka oskrzeli (NHBE) zakażonych wirusem SARS-CoV-2 (IC<sub>50</sub> = 3 ± 1 nM) [118].

Przykładami związków, które zawierają atom metalu i wykazują zdolność do inhibicji wirusowej proteazy PL<sup>Pro</sup> są kompleksy złota **96** i **97** oraz srebra **98** (Rys. 31) [119].



Rys. 31. Inhibitory proteazy PL<sup>pro</sup> zawierające atom złota 96 i 97 oraz srebra 98 [119].

W przypadku związków złota **96** i **97** wartości IC<sub>50</sub> wyniosły odpowiednio 0,09  $\pm$  0,04  $\mu$ M oraz 0,14  $\pm$  0,09  $\mu$ M, natomiast dla kompleksu srebra **97** wartość ta wynosiła 0,18  $\pm$  0,07  $\mu$ M [119].

Metaloorganicznym przykładem inhibitora  $3CL^{Pro}$  opisanym w literaturze jest ferrocenylowa pochodna chinoliny **99** (IC<sub>50</sub> = 2,32 ± 0,21 µM) (Rys. 32) [120].



Rys. 32. Związek 99 [120].

Innym podejściem do hamowania wnikania wirusa SARS-CoV-2 do komórek gospodarza jest inhibicja białka TMPRSS-2. Tutaj znaczenie zyskały inhibitory wejścia z grupy pochodnych kwasu 4-guanidynobenzoesowego **100** takie jak mesylan kamostatu **101** oraz mesylan nafamostatu **102** (Rys. 33) [121, 122].



**Rys. 33.** Kwas 4-guanidynobenzoesowy **100**, mesylan kamostatu **101** i mesylan nafamostatu **102** [121, 122].

Mesylan kamostatu **101** i mesylan nafamostatu **102** wykazują dużą zdolność do inhibicji TMPRSS-2 (IC<sub>50</sub> = 4,2 nM dla **101** i IC<sub>50</sub> = 2,2 nM dla **102**) oraz hamowania wnikania wirusa SARS-CoV-2 do komórek linii Calu-3 (IC<sub>50</sub> = 107 nM dla **101** i IC<sub>50</sub> w zakresie 1 – 10 nM dla **102**) [121, 122].

5. Hipoteza badawcza i uzasadnienie podjęcia badań

Nowotwory płuc są jednym z czterech najczęściej diagnozowanych nowotworów na całym świecie. Ich terapia jest trudna, a jednym z wykorzystywanych w niej leków jest erlotynib. Aktywność tego niekowalencyjnego inhibitora EGFR jest ograniczona powstawaniem erlotynibo-opornych klonów komórek nowotworowych. Kolejne generacje inhibitorów domeny TK receptora EGFR mają na celu wyeliminowanie niekorzystnego wpływu tych mutacji. Strategia ta nie jest jednak w pełni satysfakcjonująca i skuteczna.

Mając na względzie powyższe fakty, w ramach moich badań postanowiłem otrzymać metaloorganiczne koniugaty erlotynibu o dualnym mechanizmie działania. Pierwszy z nich polegał na inhibicji EGFR, a drugi na generowaniu reaktywnych form tlenu i stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych. Założyłem, że podwójny mechanizm działania pozwoli na przezwyciężenie lekoopornych (erlotynibo-opornych) komórek nowotworowych raka płuc. Badaniami objąłem również ferrocenylowe pochodne AZT.

Tak postawioną hipotezę badawczą postanowiłem zweryfikować poprzez:

- a) otrzymanie i charakterystykę ferrocenylowych, rutenocenylowych, "renowo-karbonylkowych" oraz organicznych (bez fragmentu metaloorganicznego) pochodnych erlotynibu
- b) otrzymanie i charakterystykę ferrocenylowych pochodnych AZT

Do syntezy wymienionych w punktach a) i b) związków wykorzystałem reakcje katalizowanej miedzią lub rutenem 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydków i alkinów. Wybór tego narzędzia syntetycznego nie był przypadkowy. Wymienione reakcje "click", cechują się tolerancją w odniesieniu do obecnych w moich substratach grup funkcyjnych, i były w stanie dostarczyć mi biblioteki nowych związków w relatywnie krótkim czasie.

W odniesieniu do badań biologicznych cele mojej pracy obejmowały badanie aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych przeze mnie związków wobec różnych linii komórkowych nowotworów płuc (w tym linii opornych na erlotynib). Dodatkowym celem badań biologicznych było określenie aktywności inhibitorowych moich związków względem wnikania wirusów SARS-CoV-1 oraz SARS-CoV-2 do modelowych komórek ludzkich HEK293T.

57

6. Omówienie wyników badań własnych

#### 6.1. Informacje wstępne

W czasie realizacji rozprawy doktorskiej otrzymałem szesnaście nowych połączeń metaloorganicznych i organicznych erlotynibu **7** oraz AZT.

Najistotniejszą grupą związków były dla mnie metalocenylotriazolowe pochodne erlotynibu. Otrzymałem je głównie na drodze reakcji CuAAC i RuAAC. Wykorzystując reakcje CuAAC pomiędzy AZT i etynyloferrocenem **103** otrzymałem również di i mono ferrocenylowe pochodne tymidyny.

Budowę czterech otrzymanych przeze mnie związków potwierdzono za pomocą rentgenografii strukturalnej monokryształów. Pomiary te były przeprowadzone przez dr D. Trzybińskiego w laboratorium prof. K. Woźniaka (Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego).

Badania fotofizyczne były przeprowadzone w laboratorium prof. A. Gorskiego (Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa).

Mój doktorat ma charakter interdyscyplinarny. Większość z otrzymanych związków było badanych pod względem aktywności przeciwnowotworowej wobec różnych linii ludzkich komórek nowotworów płuc. Biorąc pod uwagę ciągle aktualny problem pandemii Covid-19, niektóre z moich koniugatów zostały przebadane jako potencjalne inhibitory wejścia wirusów SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 do modelowych ludzkich komórek HEK293T. Badania biologiczne prowadzone były w wyspecjalizowanych laboratoriach kierowanych przez prof. J. Kopecką (Katedra Onkologii Uniwersytetu w Turynie we Włoszech) oraz dr P. Zmorę (Zakład Wirusologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu).

Wyniki moich badań opublikowałem w dwóch artykułach oryginalnych. Jestem również współautorem jednego artykułu przeglądowego. Jeden z oryginalnych artykułów jest w trakcie recenzji w czasopiśmie *Organometallics* (IF = 2,80).

59

Przeprowadzone przeze mnie badania pozwoliły na odkrycie kilku nowych biometalokoniugatów charakteryzujących się znaczącą aktywnością przeciw ludzkim komórkom nowotworów płuc (w tym lekoopornych). Ich mechanizm działania opiera się o generowanie stresu oksydacyjnego i apoptozę. W kontekście badań przeciwwirusowych całkiem nieoczekiwanie udało się zidentyfikować rutenocenylową pochodną erlotynibu zdolną do inhibicji wejścia wirusów SARS-CoV-1/2 do ludzkich komórek HEK293T.

Poniżej przedstawiam skrócony opis najważniejszych wyników opublikowanych w poszczególnych pracach.

## 6.2. Synteza i aktywność biologiczna metalocenylowych pochodnych erlotynibu (Praca P1)

Schematy 11 i 12 przedstawiają syntezę pięciu ferrocenylowych koniugatów erlotynibu 104 – 108. Izomery 1,4 (104 – 106) zostały otrzymane na drodze reakcji CuAAC elotynibu 7 z azydkami 109 – 111, natomiast izomery 1,5 (107 i 108) otrzymałem na drodze reakcji RuAAC erlotynibu 7 z azydkami 109 i 110.



Schemat 11. Synteza 1,4-dipodstawionych ferrocenylowych pochodnych erlotynibu 104 – 106.

Reakcje prowadzące do otrzymania izomerów 1,4 prowadzone były w mieszaninie THF/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. W przypadku związku **106** w celu zwiększenia wydajności reakcja prowadzona była w temperaturze 60<sup>0</sup>C przez 4 godziny.



Schemat 12. Synteza 1,5-dipodstawionych ferrocenylowych pochodnych erlotynibu 107 i 108.

Reakcje prowadzące do otrzymania izomerów 1,5 prowadzone były w 1,4-dioksanie przez 24 godziny w temperaturze 60°C. W przypadku próby reakcji erlotynibu **7** z azydometyloferrocenem **111** nie udało się uzyskać oczekiwanego produktu, co można prawdopodobnie uzasadnić zbyt dużą zawadą steryczną w strefie koordynacyjnej Ru generowaną przez grupę ferrocenylową azydku **111**.

Produkty reakcji **104** – **108** wydzieliłem na drodze ekstrakcji i chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> z wydajnościami przedstawionymi w Tabeli 5.

Numer związku	Wydajność reakcji [%]
104	77%
105	82%
106	46%
107	46%
108	50%

Tabela 5. Zestawienie wydajności uzyskanych produktów 104 – 108.

Analityczne czyste związki **104**, **105**, **107** i **108** były pomarańczowymi ciałami stałymi, natomiast związek **106** był żółtym ciałem stałym. Produkty **104** – **108** scharakteryzowałem za pomocą metod spektroskopowych (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, FTIR), HRMS oraz analizy elementarnej.

Zastosowane w reakcjach CuAAC i RuAAC azydki **109** i **110** otrzymałem w dwóch etapach obejmujących: a) reakcję acylowania Friedla-Craftsa ferrocenu **112** za pomocą chlorku **113** lub **114** oraz b) reakcję podstawienia nukleofilowego atomu chloru w **115** lub **116** za pomocą anionu  $N_3^-$  (Schemat 13) [123 – 125].



Schemat 13. Synteza azydków 109 i 110.

Nieznany literaturowo azydek **110** wydzieliłem na drodze ekstrakcji i chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> z wydajnością 47% w postaci pomarańczowego oleju oraz poddałem wyżej wymienionym analizom.

Azydek **111** otrzymałem również w dwóch etapach. W pierwszym etapie za pomocą NaBH<sub>4</sub> przeprowadziłem redukcję grupy karbonylowej w aldehydzie **117** otrzymując alkohol **118** z wydajnością 99% [126]. Następnie przeprowadziłem reakcje podstawienia grupy hydroksylowej w **118** za pomocą azydku sodu w lodowatym kwasie octowym, co pozwoliło mi na otrzymanie azydku **111** z wydajnością 81% (Schemat 14) [127].



Schemat 14. Synteza azydku 111.

Badania aktywności przeciwnowotworowej związków **104** – **108** wobec panelu ludzkich komórek nowotworu płuc (linie H1650, H1975, H1395, A549) wykazały, że koniugaty te są mniej toksyczne wobec nienowotworowych komórek linii BEAS-2B niż erlotynib **7**. Najszersze spectrum aktywności wykazał związek **104** (IC<sub>50</sub> = 12 ± 0,13 wobec H1650 i IC<sub>50</sub> = 27 ± 0,08 wobec H1975). Związek **107** był również bardziej aktywny wobec lekoopornych komórek linii H1975 (IC<sub>50</sub> = 27 ± 0,10) i H1650 (IC<sub>50</sub> = 18 ± 0,09) niż erlotynib **7** (IC<sub>50</sub> = 40 ± 0,16 wobec H1650 i IC<sub>50</sub> = 37 ± 0,08 wobec H1975).

Badania mechanizmu aktywności przeciwnowotworowej koniugatu **104** wykazały, iż generuje on reaktywne formy tlenu, zmniejsza potencjał mitochondrialny ( $\Delta \Psi_m$ ), aktywuje kaspazy 3 i 9 oraz powoduje uszkodzenie DNA w komórkach nowotworowych. Uzyskane wyniki pozwoliły również sformułować wniosek, że związki **104**, **107** i **108** mają właściwości proapoptyczne (kierują komórki na drogę apoptozy).

# 6.3. Synteza, badania aktywności biologicznej i zjawiska "komunikacji elektronowej" ferrocenylowych pochodnych AZT 119 – 121 i pochodnych 122 – 124 (Praca P2)

W pracy opisałem m.in. syntezę diferrocenylowej pochodnej AZT **119** oraz jej monoferrocenylowego analogu **120** (Schematy 15 i 16).

Moja pierwotna koncepcja syntetyczna zakładała otrzymanie jodopochodnej **121** na drodze reakcji AZT z etynyloferrocenem **103** w obecności Cul, NBS oraz DIPEA, a następnie przekształcenia jej w produkt **119** za pomocą katalizowanej palladem reakcji tworzenia wiązania węgiel-węgiel (Schemat 15) [128, 129].

63



Schemat 15. Koncepcja syntezy związku 119.

Reakcję prowadziłem w temperaturze pokojowej w THF jako rozpuszczalniku przez okres 24 godzin. Na drodze ekstrakcji i chromatografii kolumnowej wydzieliłem trzy produkty; oczekiwaną jodopochodną **121**, monoferrocenylowy kompleks **120** oraz ku mojemu zadowoleniu diferrocenylowy kompleks **119** (Schemat 16). Wydajności otrzymanych produktów **119 – 121** przedstawia Tabela 6.



Schemat 16. Synteza ferrocenylowych pochodnych AZT 119 – 121.

Numer związku	Wydajność reakcji [%]
119	39%
120	6%
121	9%

 Tabela 6. Zestawienie wydajności uzyskanych produktów 119 – 121.

Zastąpienie AZT przez (3-azydopropanoilo)ferrocen **109** również prowadziło do otrzymania trzech produktów: triferrocenylowego kompleksu **122**, jodopochodnej **123** oraz diferrocenylowej pochodnej **124** (Schemat 17). Wydajności otrzymanych produktów **122 – 124** przedstawia Tabela 7.



Schemat 17. Synteza związków 122 – 124.

Numer związku	Wydajność reakcji [%]
122	22%

Tabela 7. Zestawienie wydajności uzyskanych produktów 122 – 124.

123

124

Powstawanie produktów **119** i **122** tłumaczyłem reakcją między jodopochodną **121** lub **123** a etynyloferrocenem **103**. W celu weryfikacji tej hipotezy przeprowadziłem szereg reakcji zgodnie ze Schematem 18.

24%

15%



Schemat 18. Weryfikacja hipotezy tworzenia produktów 119 i 122.

W żadnej z przedstawionych reakcji nie wydzieliłem jednak produktów 119 i 122.

Kontynuując moje badania postanowiłem zweryfikować moją pierwotną koncepcję (Schemat 15) i spróbować otrzymać związki **119** i **122** za pomocą reakcji Sonogashiry. Schemat 19 przedstawia przykładowe warunki reakcji, które stosowałem.



Schemat 19. Próba przeprowadzenia reakcji Sonogashiry.

Niestety w żadnych ze stosowanych przeze mnie warunkach nie zaobserwowałem nawet śladowych ilości produktów **119** i **122**.

Analitycznie czyste próbki kompleksów **119**, **122**, **123** i **124** były pomarańczowymi ciałami stałymi, natomiast związki **120** i **121** były żółtymi ciałami stałymi. Produkty **119 – 124** scharakteryzowałem za pomocą metod spektroskopowych (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, FTIR), HRMS oraz analizy elementarnej.

Ferrocenylowe pochodne **120** i **124** otrzymałem również na drodze reakcji CuAAC odpowiednio AZT lub (3-azydopropanoilo)ferrocenu **109** z etynyloferrocenem **103** zgodnie ze Schematem 20. Wydajność produktu **120** wynosiła 69%, a produktu **124** 75%.



Schemat 20. Synteza związków 120 i 124.

Dla związków **119**, **122** i **124** udało mi się otrzymać monokryształy metodą dyfuzji par heksanu do nasyconych roztworów związków w dichlorometanie w temperaturze pokojowej. Analiza rentgenostrukturalna została przeprowadzona w Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego przez dr D. Trzybińskiego i potwierdziła budowę **119**, **122** oraz **124** (Rys. 34 – 36).



Rys. 34. Konformery A oraz B obecne w sieci krystalicznej związku 119 [130].



Rys. 35. Konformery A oraz B obecne w sieci krystalicznej związku 122 [130].



Rys. 36. Struktura krystalograficzna związku 124 [130].

Wartym zaznaczenia jest fakt, że w sieci krystalicznej związków **119** i **122** zaobserwowano obecność dwóch konformerów (oznaczonych jako A i B na Rys. 34 i Rys. 35).

Kompleksy **119**, **120**, **122** i **124** były dla mnie potencjalnie ciekawymi obiektami do badań (spektro)elektrochemicznych. Obecność dwóch skoniugowanych centrów redoks (grup ferrocenylowych) w związkach **119** i **122** pozwala przypuszczać, iż w ich monoutlenionych formach **119**<sup>+</sup> i **122**<sup>+</sup> może wystąpić zjawisko tzw. komunikacji elektronowej [131 – 136]. Ze względu na brak dostępu do odpowiedniej infrastruktury badawczej związki **119**, **120**, **122** i **124** zostały wysłane na badania (spektro)elektrochemiczne do laboratorium prof. H. Langa (TU Chemnitz, Niemcy), w którym odbyłem również krótką wizytę naukową.

Badania właściwości elektrochemicznych związków 119, 120, 122 i 124 przeprowadzono metodą woltamperometrii cyklicznej oraz woltamperometrii fali prostokątnej w bezwodnym DCM z zastosowaniem szklistej elektrody węglowej i [NBu<sub>4</sub>][B(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>4</sub>] jako elektrolitu podstawowego. Wartości potencjałów wyznaczono w odniesieniu do potencjału redoks FcH/FcH<sup>+</sup>. Kompleks **120** ulegał odwracalnej reakcji utlenienia-redukcji przy potencjalne  $E^{0/+}$ = 60 mV ( $\Delta E_0$ = 66 mV). Dla diferrocenylowego związku 124 zarejestrowano dwa odwracalne procesy utlenienia-redukcji przy potencjałach  $E^{0/+}= 20 \text{ mV}$  ( $\Delta E_p= 61 \text{ mV}$ ) i  $E^{+/2+}= 330 \text{ mV}$  ( $\Delta E_p= 67 \text{ mV}$ ). Również dla kompleksu diferrocenylowego **119** zarejestrowano dwa elektrodowe procesy utlenienia-redukcji przy wartościach potencjału  $E^{0/+}$ = 80 mV ( $\Delta E_p$ = 60 mV) i  $E^{+/2+}$ = 280 mV ( $\Delta E_p$ = 66 mV), natomiast dla związku 122 zarejestrowano trzy procesy utlenienia-redukcji o wartościach potencjałów  $E^{0/+}= 45 \text{ mV} (\Delta E_p = 60 \text{ mV}) \text{ i } E^{+/2+}= 280 \text{ mV} (\Delta E_p = 61 \text{ mV}) \text{ oraz } E^{2+/3+}= 365 \text{ mV} (\Delta E_p = 63 \text{ mV}).$ Analiza wartości potencjałów redoks pozwoliła stwierdzić, że kompleks 122 jest bogatszy w elektrony niż **119** ( $E^{0/+}$ = 45 mV dla **122** i  $E^{0/+}$ = 80 mV dla **119**). Rysunek 37 prezentuje jak przyporządkowałem poszczególne do odpowiednich potencjały podstawników **119** i **122** oraz ferrocenylowych w cząsteczkach wyliczone wartości stałej komproporcjonowania K<sub>c</sub> (Schemat 21).



Rys. 37. Wartości potencjałów utlenienia-redukcji oraz wartości K<sub>c</sub> związków 119 i 122.

Wartość K<sub>c</sub> opisuje równanie:

$$K_c = \exp(nF/RT)\Delta E_{1/2}$$

**F** – stała Faradaya 96485  $\frac{C}{mol}$ ; **R** – stała gazowa 8,314  $\frac{J}{K \cdot mol}$ ; **T** – temperatura; **n** – liczba przenoszonych elektronów, **ΔE**<sub>1/2</sub> – różnica potencjałów półfali.

Stała K<sub>c</sub> pozwala określić położenie stanu równowagi i względną trwałość monokationów **119**<sup>+</sup> i **122**<sup>+</sup> względem **119**<sup>2+</sup> i **122**<sup>2+</sup> dla reakcji ogólnie przedstawionej na Schemacie 21.

$$K_{c} = 119(122) + 119^{2+}(122^{2+}) = 119^{+}(122^{+}) + 119^{+}(122^{+})$$

Schemat 21. Równanie reakcji opisywane przez wartość stałej komproporcjonowania Kc.

Wartości K<sub>c</sub> wskazują, że **119**<sup>+</sup> jest mniej trwały niż **122**<sup>+</sup>.

Obecność pasma absorpcji IVCT (ang. *inter valence charge transfer*) w obszarze bliskiej podczerwieni (NIR) jest zwykle diagnostyczna dla zjawiska tzw. komunikacji elektronowej w związkach o mieszanej wartościowości (ang. *mixed-valence species*) [132]. Dlatego też kompleksy **119** i **122** były badane w celi spektroelektrochemicznej OTTLE (ang. *optically transparent thin-layer electrochemical cell*). Na widmach generowanych w OTTLE monoutlenionych form **119**<sup>+</sup> i **122**<sup>+</sup> (Rys. 38 i Rys. 39) widoczne były szerokie pasma IVCT w zakresie NIR ( $\lambda$  = 1000 – 1700 nm zaznaczone linią czerwoną na Rys. 38 i Rys. 39). Pasma te zanikały gdy **119**<sup>+</sup> i **122**<sup>+</sup> uległy reakcji utlenienia tworząc kationy **119**<sup>2+</sup> i **122**<sup>2+</sup>.



Rys. 38. Widmo UV–Vis/NIR dla 119 przy potencjale w zakresie 0–250 mV (wykres A)i 250–500 mV (wykres B) vs Ag/AgCl w OTTLE [130].



**Rys. 39.** Widmo UV–Vis/NIR dla **122** przy potencjale w zakresie 150–275 mV (wykres A) i 275–800 mV (wykres B) vs Ag/AgCl w OTTLE [130].

Zgodnie z formalizmem Allena i Hush'a [132, 133] obliczone wartości  $\tilde{v}_{IVCT}$ ,  $\varepsilon_{max}$  i  $\Delta \tilde{v}_{1/2}$ wynosiły odpowiednio 9255 cm<sup>-1</sup>, 80 L·mol·cm<sup>-1</sup> i 6125 cm<sup>-1</sup> dla **122** oraz 9040 cm<sup>-1</sup>, 65 L·mol·cm<sup>-1</sup> i 4795 cm<sup>-1</sup> dla **119**. Obliczone na ich podstawie wartości H<sub>ab</sub> (ang. *electronic matrix coupling element*) wynoszą 100 cm<sup>-1</sup> dla **119** i 127 cm<sup>-1</sup> dla **122**. Na tej podstawie **119**<sup>+</sup> i **122**<sup>+</sup> zakwalifikowano do tzw. II grupy związków o mieszanej wartościowości według klasyfikacji Robina i Day'a [137]. Pomiary z wykorzystaniem spektroskopii EPR dla **119**, **120** i **122** wykazały natomiast, że w obecności tlenu cząsteczkowego związki te generują reaktywne formy tlenu oraz, że ferrocenylowe kompleksy **119** i **122** są bardziej efektywnymi generatorami reaktywnych form tlenu niż monoferrocenylowy kompleks **120**.

W końcowym etapie projektu zbadana została aktywność przeciwnowotworowa związków **119, 120, 122** i **124** wobec ludzkich komórek nowotworowych płuc linii A549 i lekoopornej linii H1975 jak i również wobec niezmienionej nowotworowo linii komórkowej BEAS-2B. Diferrocenylowy nukleozyd **119** wykazał dużo lepszą aktywność wobec linii A549 w porównaniu do **cisPt** ( $IC_{50} = 57 \pm 18 \mu$ M dla **119** i  $IC_{50} = 108 \pm 12 \mu$ M dla **cisPt**). Wobec komórek linii H1975 związek **119** wykazał porównywalną do **cisPt** aktywność cytotoksyczną ( $IC_{50} = 5 \pm 2 \mu$ M dla **119** i  $IC_{50} = 4 \pm 0,1 \mu$ M dla **cisPt**). Bardzo istotną obserwacją było, iż związek **119** nie wykazał toksyczności wobec komórek BEAS-2B, podczas gdy **cisPt** była dla nich bardzo toksyczna ( $IC_{50} = 469 \pm 10 \mu$ M dla **119** i  $IC_{50} = 3 \pm 0,1 \mu$ M dla **cisPt**). W eksperymencie z zastosowaniem NAC dla związku **119** udało się również wykazać korelację między poziomem ROS, które generuje wewnątrz komórek linii H1975 a ich przeżywalnością (zmniejszone stężenie ROS po dodaniu NAC zwiększało przeżywalność komórek linii H1975).

Dokładany mechanizm aktywności przeciwnowotworowej będzie przedmiotem dalszych badań.

# 6.4. Synteza i aktywność biologiczna pochodnych erlotynibu zawierających atomy metali (Praca P3)

Opisana w tym rozdziale część badań doktoranckich była realizowana dzięki wsparciu NCN (grant Preludium 20 pt. "Zwalczanie raka płuc za pomocą metaloorganicznych koniugatów erlotynibu – synteza i badania *in vitro*"). W ich trakcie przeprowadziłem syntezę trzech ferrocenylowych (**125 – 127**), dwóch rutenocenylowych (**128 i 129**) oraz dwóch direnowych (**130 i 131**) pochodnych erlotynibu **7**. Przeprowadziłem również syntezę jednej organicznej pochodnej erlotynibu **132**, w celu określenia wpływu grupy ferrocenylowej na aktywność przeciwnowotworową otrzymanych przeze mnie metaloorganicznych pochodnych. Wyniki przedstawione w tym podrozdziale stanowią materiał badawczy Pracy P3, która na chwilę obecną jest w trakcie recenzji w czasopiśmie *Organometallics*.

72
Schemat 22 przedstawia syntezę ferrocenylowych i rutenocenylowych koniugatów erlotynibu **125**, **126**, **128** i **129**. Izomery 1,4 (**125** i **128**) zostały otrzymane na drodze reakcji CuAAC elotynibu **7** z azydkami **133** i **134**, natomiast izomery 1,5 (**126** i **129**) otrzymałem z tych samych substratów na drodze reakcji RuAAC.



Schemat 22. Synteza 1,4- i 1,5-dipodstawionych ferrocenylowych i rutenocenylowych pochodnych erlotynibu 125, 126, 128 i 129.

Reakcje służące do otrzymania związków **125** i **128** prowadzone były w mieszaninie THF/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) przez 4 godziny w temperaturze pokojowej dla pochodnej **125** oraz w celu zwiększenia wydajności dla związku **128** prowadzona była w temperaturze 60°C przez 3 godziny. W przypadku związków **126** i **129** reakcje prowadzone były w temperaturze 60°C przez 24 godziny.

Produkty reakcji **125**, **126**, **128** i **129** wydzieliłem na drodze ekstrakcji i chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> z wydajnościami przedstawionymi w Tabeli 8.

Numer związku	Wydajność reakcji [%]
125	78%
126	68%
128	70%
129	74%

Tabela 8. Zestawienie wydajności uzyskanych produktów 125, 126, 128 i 129.

Analityczne czyste związki **125** i **126** były pomarańczowymi ciałami stałymi, natomiast związki **128** i **129** były żółtymi ciałami stałymi. Produkty **125**, **126**, **128** i **129** scharakteryzowałem za pomocą metod spektroskopowych (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, FTIR), HRMS oraz analizy elementarnej.

Zastosowane w reakcjach CuAAC i RuAAC azydki **133** i **134** otrzymałem w dwóch etapach obejmujących: a) reakcję acylowania Friedla-Craftsa ferrocenu **112** lub rutenocenu **135** za pomocą chlorku **114** lub **136** oraz b) reakcję podstawienia nukleofilowego atomu chloru w **137** lub **138** za pomocą anionu  $N_3^-$  (Schemat 23) [138, 139].





Nieznane literaturowo pochodne rutenocenu **138** i **134** wydzieliłem na drodze ekstrakcji i chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> z wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 90% i 48% w postaci żółtych ciał stałych. Związki te scharakteryzowałem za pomocą metod spektroskopowych (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, FTIR), HRMS oraz analizy elementarnej.

W celu porównania wpływu obecności grupy ferrocenylowej na aktywność przeciwnowotworową przeprowadziłem syntezę organicznej pochodnej erlotynibu **132**, w której grupa ferrocenylowa została zastąpiona grupą fenylową. Pochodną **132** otrzymałem z wydajnością wynoszącą 99% w postaci białego ciała stałego, stosując warunki reakcji przedstawione na Schemacie 24.



Schemat 24. Synteza związku 132.

Zastosowany w reakcji przedstawionej na Schemacie 24 azydek **139** otrzymałem na drodze reakcji  $S_N 2$  z handlowo dostępnego chloroketonu **140** zgodnie ze Schematem 25 [140].



Schemat 25. Synteza związku 139.

W czasie dalszych prac w dwóch etapach otrzymałem również nową ferrocenylową pochodną erlotynibu **127**, która w swojej strukturze posiada wiązanie amidowe. W pierwszym etapie na drodze reakcji CuAAC erlotynibu **7** i chlorowodorku 2-azydoetano-1-aminy **141** otrzymałem aminę **142** z wydajnością 61%. Reakcję prowadziłem w mieszaninie THF/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) przez 20 minut w temperaturze pokojowej (Schemat 26). Dodatkowo do reakcji wprowadziłem również równomolową ilość NaOH względem chlorowodorku 2-azydoetano-1-aminę **143**. Brak dodatku NaOH uniemożliwiał otrzymanie aminy **142**.



Schemat 26. Synteza aminy 142.

W drugim etapie amina **142** została przekształcona w amid **127** na drodze reakcji z kwasem ferrocenokarboksylowym **144** (Schemat 27). Reakcję prowadziłem w DCM przez 24 godziny w temperaturze pokojowej i z DCC jako odczynnikiem kondensującym. Następnie po oczyszczeniu za pomocą chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> otrzymałem analitycznie czysty amid **127** z wydajnością 61% w postaci żółtego ciała stałego.



Schemat 27. Synteza ferrocenylowego amidu 127.

Aminę **142** wykorzystałem również do syntezy renowych pochodnych erlotynibu **130** i **131** (Schemat 28). Związki **130** i **131** otrzymałem z wydajnościami odpowiednio 48% i 74% na drodze kondensacji aminy **142** z kwasami **145** i **146**, z zastosowaniem DCC. Reakcje prowadziłem w DCM, przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Otrzymane produkty oczyściłem za pomocą chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> otrzymując czyste analitycznie próbki związków **130** oraz **131** (żółte ciała stałe).



**131** n= 4

Schemat 28. Synteza renowych pochodnych erlotynibu 130 i 131.

Użyte w procedurze kwasy **145** i **146** otrzymałem na drodze dwuetapowej syntezy [141, 142]. Schemat 29 przedstawia syntezę kwasu **145**. W pierwszym etapie kwas heks-5-ynowy **147** został poddany reakcji Dielsa-Aldera z 1,2,4,5-tetrazyną **148**. Otrzymany w tej reakcji kwas **149** poddałem w drugim etapie termicznej reakcji z Re(CO)<sub>5</sub>Cl, w wyniku czego otrzymałem kompleks **145** z wydajnością 60% [142].



Schemat 29. Synteza kwasu direnowego 145.

Wymaganą do reakcji przedstawionej na Schemacie 29 1,2,4,5-tetrazynę **148** otrzymałem w oparciu o procedurę literaturową [143].

Dla kompleksów renu **130** i **131** przeprowadzono pomiary fotofizyczne, których wyniki przedstawia Tabela 9. Widma absorbcji i emisji związku **130** w DCM i DMSO przedstawia Rysunek 40. Na widmach absorbcji UV/Vis obydwu kompleksów renu widoczne są pasma przy ok. 380 nm (w DCM) lub 420 nm (w DMSO). Są to pasma <sup>3</sup>MLCT fragmentów ( $d\pi(\text{Re})-\pi^*(\text{pirydazyna})$ ). Przy wyższej energii (ok. 330 nm) widać intensywne pasmo absorbcji związane z przejściem  $\pi-\pi^*$  pirydazyny. Widma emisji obydwu kompleksów są szerokie i nieustrukturalizowane z maximum emisji przy około 590 nm (w DCM) i 515 nm (w DMSO). W połączeniu z długimi czasami zaniku emisji ( $\tau$ ) (Tabela 9) emisja kompleksów **130** i **131** została zakwalifikowana jako fosforescencja.

**Tabela 9.** Dane fotofizyczne dla związków **130** i **131** w DCM i DMSO (\*) w temperaturze pokojowej.

Związek	λ <sub>abs</sub> [nm]	λ <sub>PL</sub> [nm]	λ <sub>abs</sub> * [nm]	λ <sub>ΡL</sub> * [nm]	₫ <sub>₽1</sub> (±10%)	τ [ns]	τ[ns]*
130	380 (7,4)	590	420	515	5,4	486	605
131	380 (8,0)	590	420	515	6,2	596	596



Rys. 40. Widmo absorbcji (linia niebieska) i emisji (linia czerwona) związku 130w DCM (rysunek lewy) i DMSO (rysunek prawy).

Badania aktywności przeciwnowotworowej związków **125** – **131** przeprowadzone zostały w laboratorium dr P. Zmory w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu wobec ludzkich komórek nowotworów płuc A549 i Calu-3 oraz wobec niezmienionych nowotworowo ludzkich komórek nerki HEK-293T i niezmienionych nowotworowo komórek nerki psa MDCK (Tabela 10). Badania wykazały, iż ferrocenylowe pochodne **125**, **126** i **127** wykazują wyższą aktywność wobec linii A549 w porównaniu do erlotynibu **7**, natomiast pochodne rutenocenylowe **128** i **129** oraz pochodne direnowe **130** i **131** nie wykazują aktywności cytotoksycznej wobec tej linii nowotworu płuc (Tabela 10). Wobec linii Calu-3 znaczącą aktywność, lecz niższą od erlotynibu **7** wykazał jedynie związek **126**. Niestety otrzymane ferrocenylowe pochodne **125** – **127** oraz rutenocenylowa pochodna **129** wykazały również ostrą toksyczność wobec komórek linii MDCK oraz HEK-293T.

Związek	Wartości IC₅₀ (µM)					
	A549	Calu-3	MDCK	HEK-293T		
125	2,33 ± 0,94	44,60 ± 18,81	2,37 ± 3,25	2,83 ± 0,89		
126	6,56 ± 5,87	6,13 ± 0,35	2,49 ± 3,33	3,46 ± 2,04		
127	13,96 ± 2,13	>100	>100	33,12 ± 6,29		
128	<b>128</b> >100		>100	>100		
129	>100	>100	2,04 ± 2,09	16,93 ± 1,23		
130	>100	>100	>100	>100		
131	>100	>100	>100	>100		
erlotynib	>100 15,70 ± 1,95*	0,69 ± 0,23	>100	>100		

Tabe	a 10.	Wyniki	aktywnośc	ci cytoto	ksycznej	związków	/ <b>125 – 131</b> .	Czas in	kubacji 24	godziny.
------	-------	--------	-----------	-----------	----------	----------	----------------------	---------	------------	----------

\*czas inkubacji 48 godzin.

Warto również zauważyć, że pochodna ferrocenylowa **104** opisana w podrozdziale 6.2. niniejszej rozprawy wykazuje około 13-krotnie wyższą aktywność w porównaniu do jej organicznego analogu **132** wobec linii A549 (IC<sub>50</sub> = 3,11  $\mu$ M dla **104** i IC<sub>50</sub> = 40,91  $\mu$ M dla **132**). Pozwala to wnioskować, że grupa ferrocenylowa w otrzymanych przeze mnie metaloorganicznych pochodnych erlotynibu odgrywa znaczącą rolę w aktywności przeciwnowotworowej tych związków. W ramach badań biologicznych dla ferrocenylowych pochodnych **125** – **127** przeprowadzono również test określający ich zdolność do wiązania się z receptorem EGFR. Badania wykazały, że związki te podobnie jak erlotynib **7** mają zdolność do inhibicji tego receptora (Rys. 41). Wszystkie trzy pochodne **125** – **127** w przeciwieństwie do erlotynibu **7** wykazują zdolność do inhibicji receptora EGFR już przy najniższym zastosowanym stężeniu 1  $\mu$ M. Spośród nich najwyższą aktywność inhibicyjną przy zastosowaniu stężenia 10  $\mu$ M wykazał związek **125** (aktywność receptora EGFR zahamowana w ok. 80%), natomiast najsłabszą analog amidowy **127** (aktywność receptora EGFR zahamowana w ok. 40%). Wyniki przeprowadzonego testu wskazują, że erlotynib **7** jest silniejszym inhibitorem EGFR niż otrzymane ferrocenylowe analogi **125** – **127** (dla stężenia 10  $\mu$ M aktywność receptora EGFR zahamowana w ok. 95%).



Rys. 41. Wyniki zdolności inhibicji receptora EGFR przez związki 125 – 127.
\*P<0,05 w odniesieniu do próby kontrolnej (C).</li>

Dla ferrocenylowych pochodnych **125** – **127** przeprowadzono również badania wpływu zdolności generowania ROS na ich aktywność przeciwnowotworową wobec komórek A549. W tym celu zbadano wpływ zmiatacza wolnych rodników NAC na aktywność cytotoksyczną związków **125** – **127** wobec komórek A549 (Rys. 42). Badania wykazały, że obecność NAC spowodowała obniżenie aktywności cytotoksycznej pochodnych **125** – **127**, jednocześnie nie wpływając na aktywność erlotynibu **7**. Pozwala to wnioskować, że mechanizm działania ferrocenylowych pochodnych **125** – **127** opiera się zarówno na wiązaniu z receptorem EGFR jak i również na generowaniu ROS.





Ciekawym wynikiem było odkrycie, że rutenocenylowa pochodna **128** wykazuje zdolność do inhibicji wejścia wirusów SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 do komórek człowieka HEK-293T. Mechanizm aktywności przeciwwirusowej związku **128** jest przedmiotem dalszych badań biologicznych. Wiadomo już, iż związek ten hamuje proteolizę białka S wirusa, uniemożliwiając jego aktywację. Jednocześnie nie ma on zdolności hamowania interakcji białka S wirusa z receptorem ACE2. Dodatkowo ustalono, iż związek **128** nie ma zdolności hamowania proteolizy hemaglutyniny przez TMPRSS2. Białko to uczestniczy we wnikaniu wirusa grypy typu A do komórek gospodarza. W przypadku proteolizy hemaglutyniny przez TMPRSS2 receptor ACE2 nie odgrywa roli, a brak zdolności hamowania tego procesu przez związek **128** pozwala wnioskować, że związek ten nie ma zdolności bezpośredniego hamowania aktywności TMPRSS2. Jednak jest to tylko hipoteza. Interakcja związku **128** z receptorem ACE2 oraz inne aspekty mechanizmu działania związku **128** stanowią przedmiot dalszych badań wirusologicznych.

7. Podsumowanie i wnioski

- Zsyntezowałem dwanaście pochodnych erlotynibu zawierających takie metale jak: żelazo, ruten i ren oraz jedną pochodną organiczną, wykorzystując jako podstawowe narzędzie syntetyczne reakcje "click" (CuAAC i RuAAC).
- Aktywność otrzymanych pochodnych erlotynibu została przebadana wobec panelu linii komórkowych raka płuc (A549, H1395, H1650, H1975, Calu-3) oraz wobec niezmienionych nowotworowo linii komórkowych (BEAS-2B, HEK293T i MDCK). Badania wykazały, że pochodne ferrocenylowe 104, 107, 108, 125, 126 i 127 wykazują wyższą aktywność wobec linii A549 w porównaniu do erlotynibu 7. Dodatkowo związki 104, 107 i 108 mają zdolność do przełamywania lekooporności komórek linii H1650 i H1975. Związki 104, 107 i 108 wykazują również niską cytotoksyczność wobec niezmienionych nowotworowo komórek płuc.
- Związek 104 wykazał około 13-krotnie wyższą aktywność niż jego organiczny analog
   132 wobec komórek linii A549.
- 4. Stosując reakcję "click" zsyntezowałem również diferrocenylową pochodną AZT 119, która wykazała wyższą niż cisPt aktywność wobec komórek linii A549 i zbliżoną wobec linii H1975. Związek ten nie wykazuje aktywności cytotoksycznej wobec niezmienionych nowotworowo ludzkich komórek BEAS-2B (w przeciwieństwie do cisPt, która jest wobec nich toksyczna).
- 5. Mechanizm aktywności przeciwnowotworowej otrzymanej pochodnej 104 polega na generowaniu reaktywnych form tlenu, zmniejszeniu potencjału mitochondrialnego, aktywacji kaspaz 3 i 9 oraz uszkodzeniu DNA w komórkach nowotworowych prowadząc do ich apoptozy. Przeprowadzone badania dla otrzymanych ferrocenylowych pochodnych erlotynibu 125 – 127 wykazały, że mechanizm ich aktywności związany jest z ich zdolnością do wiązania się z receptorem EGFR i generowania reaktywnych form tlenu. Podobnie jak w przypadku związku 104 mechanizm aktywności diferrocenylowej pochodnej AZT 119 również opiera się o generowanie reaktywnych form tlenu.

83

 Nieaktywna przeciwnowotworowo rutenocenylowa pochodna erlotynibu 128 wykazuje zdolność do inhibicji wejścia wirusów SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 do ludzkich komórek linii HEK-293T.

## 8. Część eksperymentalna

W ramach tej części niniejszej rozprawy doktorskiej przedstawione zostały opisy procedur syntetycznych oraz charakterystyka spektroskopowa związków, które stanowią podstawę publikacji P3, która w chwili obecnej jest w trakcie recenzji w czasopiśmie *Organometallics*.

Zastosowane do syntez rozpuszczalniki były jakości czda i zostały użyte bez dodatkowego oczyszczania. Rozdziały chromatograficzne przeprowadzono przy użyciu żelu krzemionkowego 60 (Merck, 230–400 mesh ASTM) i płytek preparatywnych TLC (Merck Silica Gel 60). Erlotynib 7, kwas ferrocenokarboksylowy 144, chlorowodorek 2-azydoetyloaminy 141, Cp\*RuCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> **57**, *N*,*N*'-dicykloheksylokarbodiimid, 4-dimetyloaminopirydyna i askorbinian sodu zostały zakupione od komercyjnych dostawców i stosowane były bez wcześniejszego oczyszczania. Widma NMR były rejestrowane na spektrometrze Bruker AV600 Kryo (600 MHz). Przesunięcia chemiczne  $\delta$  wyrażone są w ppm. Jako sygnały referencyjne zastosowano sygnały DMSO (<sup>1</sup>H  $\delta$  = 2,50 ppm i <sup>13</sup>C  $\delta$  = 39,52 ppm) lub CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H  $\delta$  = 7,26 ppm). Widma masowe zostały zarejestrowane w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk (Łódź) na spektrometrze mas Synapt G2-Si (Waters), stosując metodę TOF-ESI. Spektrometr masowy pracował w trybie detekcji jonów dodatnich i ujemnych. Pomiar przeprowadzono przy napięciu kapilarnym ustawionym na 2,7 kV i stożku próbkującym na 20 V. Temperatura źródła wynosiła 110°C. Wyniki pomiarów opracowano przy użyciu oprogramowania MassLynx 4.1 (Waters). Widma FTIR zostały zarejestrowane na aparacie FTIR Nexus Nicolet. Mikroanaliza została wykonana w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk (Łódź) oraz na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego.

86



## Procedura syntetyczna:

2-azydoacetyloferrocen 133 (40 mg, 0,15 mmol, 1,0 eq), askorbinian sodu (24 mg, 0,12 mmol, 0,8 eq) i CuSO<sub>4</sub>· 5H<sub>2</sub>O (7 mg, 0,03 mmol, 0,2 eq) zostały dodane do roztworu erlotynibu 7 (59 mg, 0,15 mmol, 1,0 eq) w 2 ml mieszaniny THF/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v). Uzyskana mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Następnie do mieszaniny dodano 25 ml H<sub>2</sub>O i wykonano ekstrakcję stosując  $3 \times 25$  ml mieszaninę chloroform/metanol (10:1 v/v). Warstwe organiczną oddzielono, osuszono nad bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, przeniesiono do kolby okrągłodennej i wszystkie substancje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Po odparowaniu pozostały olej poddano chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> stosując jako eluent mieszanine octan etylu/chloroform/metanol 30:7:3 v/v. Oczyszczony chromatograficznie związek **125** krystalizowano z mieszaniny dichlorometan/heksan. W wyniku krystalizacji otrzymano analitycznie czystą próbkę w postaci pomarańczowego ciała stałego z wydajnością 78% (77 mg).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$ = 9,56 (s, 1H, NH), 8,60 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 8,49 (s, 1H, N=CH-N chinazolina), 8,32 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,93 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 7,90 (dd, *J*<sub>H,H</sub> = 8,4, 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,62 (dt, *J*<sub>H,H</sub> = 7,8, 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,48 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 7,8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,23 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 5,87 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,99 (pt, *J*<sub>H,H</sub> = 1,8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,73 (pt, *J*<sub>H,H</sub> = 1,8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,39 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 4,32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ= 195,2, 156,3, 153,5, 152,8, 148,0, 146,9, 146,1, 140,0, 131,0, 128,9, 123,3, 121,7, 120,2, 118,8, 108,9, 108,2, 103,3, 75,5, 72,9, 70,1, 70,0, 70,0, 69,1, 68,3, 68,0, 58,3, 58,2, 55,8 ppm.

HRMS (ESI+): m/z = 663,2018 (M + H<sup>+</sup>) (obliczone dla C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Fe: 663,2018).

**FTIR (KBr v [cm-1]):** 3360, 3100, 2929, 2891, 1680, 1621, 1579, 1524, 1503, 1452, 1428, 1242, 1206, 1125, 1068, 925, 863, 787.

**Analiza elementarna:** wartości określone dla C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Fe: **C**, 61,64%; **H**, 5,17%; **N**, 12,69%. Wartości zbadane: **C**, 61,64%; **H**, 5,24%; **N**, 12,65%.



Katalizator rutenowy **57** (6 mg, 0,008 mmol, 0,02 eq) został dodany do roztworu 2-azydoacetyloferrocenu **133** (161 mg, 0,60 mmol, 1,5 eq) i erlotynibu **7** (157 mg, 0,40 mmol, 1,0 eq) w 5 ml 1,4-dioksanu. Uzyskana mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze  $60^{\circ}$ C przez 24 godziny. Następnie 1,4-dioksan i wszystkie substancje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość poddano chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> octan etylu/chloroform/metanol 30:7:2 v/v. Oczyszczony chromatograficznie związek **126** krystalizowano z mieszaniny dichlorometan/heksan. W wyniku krystalizacji otrzymano analitycznie czystą próbkę w postaci pomarańczowego ciała stałego z wydajnością 68% (180 mg).

<sup>1</sup>**H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta = 9,57$  (s, 1H, NH), 8,34 (s, 1H, N=CH-N chinazolina), 8,10 (t,  $J_{H,H} = 1,8$  Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7,99 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 7,86 (s, 1 H, CH Ar chinazolina), 7,83 (ddd,  $J_{H,H} = 8,1,1,8,1,2$  Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,53 (t,  $J_{H,H} = 7,8$  Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,26 (dt,  $J_{H,H} = 7,8,1,2$  Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,21 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 5,90 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,95 (pt,  $J_{H,H} = 1,8$  Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,68 (pt,  $J_{H,H} = 1,8$  Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,28 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4,18 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 3,77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO-d6): δ= 195,2, 156,0, 153,6, 152,6, 148,0, 146,9, 140,0, 138,9, 132,3, 129,2, 126,6, 123,0, 122,5, 121,5, 108,8, 108,2, 103,2, 75,4, 72,9, 70,0, 69,9, 69,8, 69,0, 68,3, 68,0, 58,3, 58,2, 54,4 ppm.

**HRMS (ESI+):**  $m/z = 663,2017 (M + H^+)$  (obliczone dla C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Fe: 663,2018).

**FTIR (KBr v [cm<sup>-1</sup>]):** 3380, 3096, 2933, 2889, 1682, 1622, 1581, 1524, 1504, 1456, 1426, 1390, 1253, 1210, 1125, 1070, 1030, 925, 858, 827, 788.

**Analiza elementarna:** wartości określone dla C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Fe: **C**, 61,64%; **H**, 5,17%; **N**, 12,69%. Wartości zbadane: **C**, 61,45%; **H**, 5,12%; **N**, 12,50%.



Kwas ferrocenokarboksylowy 144 (37 mg; 0,16 mmol; 1,0 eq) dodano do roztworu aminy 142 (77 mg; 0,16 mmol, 1,0 eq) w 8 ml dichlorometanu. Następnie N,N'-dicykloheksylokarbodiimid (50 mg; 0,24 mmol; 1,5 eq) i 4-dimetyloaminopirydyna (2 mg; 0,016 mmol; 0,1 eq) zostały dodane do mieszaniny. Uzyskana mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie wszystkie substancje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostały po odparowaniu olej poddano chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> stosując jako eluent mieszaninę dichlorometan/metanol 12:1 v/v. Oczyszczony chromatograficznie związek 127 krystalizowano z mieszaniny dichlorometan/heksan. W wyniku krystalizacji otrzymano analitycznie czystą próbkę w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 61% (68mg).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 9,54 (s, 1H, NH), 8,60 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 8,47 (s, 1H, N=CH-N chinazolina), 8,29 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 1,8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,98 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 6,0 Hz, 1H, C(O)NH), 7,92 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 7,87 (ddd, *J*<sub>H,H</sub> = 7,8, 1,8, 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,53 (dt, *J*<sub>H,H</sub>= 7,8, 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,44 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 7,8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,22 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 4,73 (pt, *J*<sub>H,H</sub>= 1,8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,60 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 6,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,31 (pt, *J*<sub>H,H</sub>= 1,8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,29 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4,09 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 3,78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,71 (q, *J*<sub>H,H</sub>= 6,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO-d6): δ = 169,5, 156,3, 153,5, 152,9, 148,0, 146,9, 146,2, 140,0, 131,1, 128,9, 121,6, 120,2, 118,6, 108,2, 108,2, 103,2, 76,1, 70,1, 70,0, 69,9, 69,3, 68,3, 68,1, 68,0, 58,3, 58,3, 49,1 ppm.

HRMS (ESI+): m/z = 692,2279 (M + H<sup>+</sup>) (obliczone dla C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Fe: 692,2284).
FTIR (KBr v [cm<sup>-1</sup>]): 3323, 3094, 2930, 2888, 1622, 1580, 1526, 1506, 1447, 1427, 1391, 1296, 1241, 1206, 1126, 925, 863, 788.

**Analiza elementarna:** wartości określone dla C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Fe: **C**, 60,79%; **H**, 5,39%; **N**, 14,18%. Wartości zbadane: **C**, 60,68%; **H**, 5,25%; **N**, 14,00%.



(4-azydobutanoilo)rutenocen 134 (99 mg, 0,29 mmol, 1,0 eq), askorbinian sodu (46 mg, 0,23 mmol, 0,8 eq) i CuSO<sub>4</sub>· 5H<sub>2</sub>O (15 mg, 0,06 mmol, 0,2 eq) zostały dodane do roztworu erlotynibu 7 (114 mg, 0,29 mmol, 1,0 eq) w 4 ml mieszaniny THF/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v). Uzyskana mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze 60°C przez 3 godziny. Następnie do mieszaniny dodano 25 ml H<sub>2</sub>O i wykonano ekstrakcję stosując 3 x 25 ml chloroformu. Warstwę organiczną oddzielono, osuszono nad bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, przeniesiono do kolby okrągłodennej odparowano wszystkie substancje lotne pod zmniejszonym ciśnieniem. i Po odparowaniu pozostały olej poddano chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> stosując jako etylu/chloroform/metanol eluent mieszanine octan 30:7:4 v/v. Oczyszczony chromatograficznie związek **128** krystalizowano z mieszaniny dichlorometan/heksan. W wyniku krystalizacji otrzymano analitycznie czystą próbkę w postaci bladożółtego ciała stałego z wydajnością 70% (149 mg).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 9,54$  (s, 1H, NH), 8,63 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 8,47 (s, 1H, N=CH-N chinazolina), 8,28 (t,  $J_{H,H} = 1,8$  Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,92 (s, 1 H, CH Ar chinazolina), 7,89 (ddd,  $J_{H,H} = 7,8, 1,8, 1,2$  Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,56 (dt,  $J_{H,H} = 7,8, 1,2$  Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,45 (t,  $J_{H,H} = 7,8$  Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,22 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 5,10 (pt,  $J_{H,H} = 1,8$  Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,83 (pt,  $J_{H,H} = 1,8$  Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,60 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 4,44 (t,  $J_{H,H} = 7,2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>) 3,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,70 (t,  $J_{H,H} = 7,2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,15 (quin,  $J_{H,H} = 7,2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 200,3, 156,3, 153,5, 152,8, 148,0, 146,9, 146,3, 140,0, 131,0, 128,9, 121,6, 121,3, 120,2, 118,7, 108,9, 108,2, 103,3, 83,5, 73,4, 71,8, 70,4, 70,1, 70,0, 68,3, 68,0, 58,3, 58,3, 48,9, 34,5, 24,6 ppm.

**HRMS (ESI+):**  $m/z = 737,2037 (M+H^+)$  (obliczone dla C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Ru: 737,2025).

**FTIR (KBr v [cm<sup>-1</sup>]):** 3345, 3101, 2931, 2890, 2821 1669, 1621, 1579, 1504, 1452, 1427, 1392, 1241, 1205, 1126, 925, 864, 788.

**Analiza elementarna:** wartości określone dla C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Ru: **C**, 58,76%; **H**, 5,21%; **N**, 11,42%. Wartości zbadane: **C**, 58,53%; **H**, 5,13%; **N**, 11,27%.



Katalizator rutenowy **57** (7 mg, 0,009 mmol, 0,02 eq) został dodany do roztworu (4-azydobutanoilo)rutenocenu **134** (237 mg, 0,69 mmol, 1,5 eq) i erlotynibu **7** (181 mg, 0,46 mmol, 1,0 eq) w 6 ml 1,4-dioksanu. Uzyskana mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze 60°C przez 24 godziny. Następnie 1,4-dioksan i wszystkie substancje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość poddano chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> octan etylu/chloroform/metanol 30:7:2 v/v. Oczyszczony chromatograficznie związek **129** krystalizowano z mieszaniny dichlorometan/heksan. W wyniku krystalizacji otrzymano analitycznie czystą próbkę w postaci bladożółtego ciała stałego z wydajnością 74% (252 mg).

<sup>1</sup>**H NMR** (600 MHz, **DMSO-d**<sub>6</sub>):  $\delta = 9,59$  (s, 1H, NH), 8,50 (s, 1H, N=CH-N chinazolina), 8,13 (t,  $J_{H,H} = 1,8$  Hz, 1H,  $C_6H_4$ ), 7,93 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 7,91 (ddd,  $J_{H,H} = 8,4, 1,8, 1,2$  Hz, 1H,  $C_6H_4$ ), 7,89 (s, 1 H, CH Ar chinazolina), 7,56 (t,  $J_{H,H} = 8,4$  Hz, 1H,  $C_6H_4$ ), 7,30 (dt,  $J_{H,H} = 7,8, 1,2$ Hz, 1H,  $C_6H_4$ ), 7,24 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 4,99 (pt,  $J_{H,H} = 1,8$  Hz, 2H,  $C_5H_4$ ), 4,75 (pt,  $J_{H,H} = 1,8$  Hz, 2H,  $C_5H_4$ ), 4,52 (s, 5H,  $C_5H_5$ ), 4,51 (t,  $J_{H,H} = 7,2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,29 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>) 3,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,63 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 7,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,04 (quin, *J*<sub>H,H</sub> = 7,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 200,1, 156,1, 153,7, 152,7, 148,1, 147,0, 140,1, 137,2, 132,6, 129,2, 126,7, 123,0, 122,4, 121,6, 108,9, 108,2, 103,4, 83,3, 73,3, 71,7, 70,3, 70,0, 70,0, 68,4, 68,0, 58,3, 58,2, 47,3, 34,7, 24,4 ppm.

**HRMS (ESI+):**  $m/z = 737,2028 (M+H^+)$  (obliczone dla C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Ru: 737,2025).

FTIR (KBr v [cm<sup>-1</sup>]): 3370, 3099, 2930, 2891, 2820, 1670, 1622, 1577, 1523, 1505, 1452, 1435, 1424, 1246, 1208, 1126, 1031, 925, 894, 788.

**Analiza elementarna:** wartości określone dla C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Ru: **C**, 58,76%; **H**, 5,21%; **N**, 11,42%. Wartości zbadane: **C**, 58,71%; **H**, 5,11%; **N**, 11,40%.



130

Kwas **145** (81 mg; 0,10 mmol; 1,0 eq) dodano do roztworu aminy **142** (50 mg; 0,10 mmol, 1,0 eq) w 5 ml dichlorometanu. Następnie *N*,*N'*-dicykloheksylokarbodiimid (31 mg; 0,15 mmol; 1,5 eq) i 4-dimetyloaminopirydyna (1,2 mg; 0,010 mmol; 0,1 eq) zostały dodane do mieszaniny. Uzyskana mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Następnie wszystkie substancje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostały po odparowaniu olej poddano chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> stosując jako eluent mieszaninę dichlorometan/metanol 11:1 v/v. Oczyszczony chromatograficznie związek **130** krystalizowano z mieszaniny dichlorometan/heksan. W wyniku krystalizacji otrzymano analitycznie czystą próbkę w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 48% (60mg).

<sup>1</sup>**H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$ = 10,12 (d, *J*<sub>H,H</sub>= 2,4 Hz, 1H, H-pirydazyna), 9,99 (dd, *J*<sub>H,H</sub>= 6,0 Hz, 0,6 Hz, 1H, H-pirydazyna), 9,52 (s, 1H, NH), 8,54 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 8,47 (s, 1H, N=CH-N chinazolina), 8,28 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 1,8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,13 (dd, *J*<sub>H,H</sub>= 6,0, 2,4 Hz, 1H,

92

H-pirydazyna), 8,07 (t,  $J_{H,H}$ = 6,0 Hz, 1H, C(O)NH), 7,91 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 7,82 (dd,  $J_{H,H}$ = 7,8, 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,51 (dt,  $J_{H,H}$ = 7,8, 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>) 7,41 (t,  $J_{H,H}$ = 7,8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,22 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 4,49 (t,  $J_{H,H}$ = 6,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,30 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,57 (q,  $J_{H,H}$ = 6,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,84 (t,  $J_{H,H}$ = 7,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,18 (t,  $J_{H,H}$ = 7,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,91 (quin,  $J_{H,H}$ = 7,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm. <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$ = 190,3, 190,1, 171,9, 164,1, 162,2, 156,4, 153,6, 152,8, 150,3, 148,1, 146,2, 140,0, 133,0, 131,0, 128,9, 121,7, 120,2, 118,8, 108,1, 108,1, 103,3, 70,1, 70,0, 68,4, 68,0, 58,4, 58,3, 49,1, 38,8, 34,2, 31,0, 24,8 ppm. HRMS (ESI+): m/z = 1240,1208 (M + H<sup>+</sup>) (obliczone dla C<sub>38</sub>H<sub>38</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>Re<sub>2</sub>: 1240,1183).

**FTIR (KBr v [cm<sup>-1</sup>]):** 3322, 3067, 2930, 2047, 2029, 1937, 1911, 1668, 1621, 1594, 1581, 1522, 1506, 1450, 1428, 1390, 1241, 1205, 1125, 926, 864, 788.

Analiza elementarna: wartości określone dla C<sub>38</sub>H<sub>37</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>Re<sub>2</sub>: C, 36,84%; H, 3,01%;
 N, 10,17%. Wartości zbadane: C, 36,77%; H, 3,11%; N, 10,02%.



Kwas **146** (103 mg; 0,13 mmol; 1,0 eq) dodano do roztworu aminy **142** (62 mg; 0,13 mmol, 1,0 eq) w 5 ml dichlorometanu. Następnie *N*,*N'*-dicykloheksylokarbodiimid (41 mg; 0,20 mmol; 1,5 eq) i 4-dimetyloaminopirydyna (1,6 mg; 0,013 mmol; 0,1 eq) zostały dodane do mieszaniny. Uzyskana mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Następnie wszystkie substancje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostały po odparowaniu olej poddano chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> stosując jako eluent mieszaninę dichlorometan/metanol 12:1 v/v. Oczyszczony chromatograficznie związek **131** krystalizowano z mieszaniny dichlorometan/n-heksan. W wyniku krystalizacji otrzymano analitycznie czystą próbkę w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 74% (121mg).

<sup>1</sup>**H NMR (600 MHz, DMSO**-*d*<sub>6</sub>): δ =10,13 (d, *J*<sub>H,H</sub>=2,4 Hz, 1H, H-pirydazyna), 10,01 (dd, *J*<sub>H,H</sub>= 6,0, 0,6 Hz, 1H, H-pirydazyna), 9,53 (s, 1H, NH), 8,54 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 8,47 (s, 1H, N=CH-N chinazolina), 8,28 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,16 (dd, *J*<sub>H,H</sub> = 6,0, 2,4 Hz, 1H, H-pirydazyna), 8,03 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 6,0 Hz, 1H, C(O)NH), 7,91 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 7,83 (dd, *J*<sub>H,H</sub>= 7,8, 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,51 (dt, *J*<sub>H,H</sub>= 7,8, 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,42 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 7,8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,22 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 4,48 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 6,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,30 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,57 (q, *J*<sub>H,H</sub> = 6,0 Hz 2H, CH<sub>2</sub>), 3,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,87 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 7,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,13 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 7,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,66 – 1,55 (m, 4H, CH<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 190,3, 190,1, 172,3, 164,1, 162,2, 156,3, 153,6, 152,8, 150,7, 148,0, 146,8, 146,2, 140,0, 132,9, 131,0, 128,9, 121,7, 121,6, 120,2, 118,7, 108,9, 108,1, 103,2, 70,1, 70,0, 68,3, 68,0, 58,3, 58,3, 49,0, 38,7, 34,7, 31,3, 28,4, 24,5 ppm.

**HRMS (ESI+):** m/z = 1254,1317 (M + H<sup>+</sup>) (obliczone dla C<sub>39</sub>H<sub>40</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>Re<sub>2</sub>: 1254,1339).

**FTIR (KBr v [cm<sup>-1</sup>]):** 3324, 3067, 2933, 2047, 2030, 1937, 1912, 1666, 1621, 1581, 1523, 1505, 1450, 1428, 1390, 1241, 1125, 926, 863, 788.

Analiza elementarna: wartości określone dla C<sub>39</sub>H<sub>39</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>Re<sub>2</sub>: C, 37,38%; H, 3,14%;
 N, 10,06%. Wartości zbadane: C, 37,40%; H, 3,09%; N, 10,01%.



3-azydo-1-fenylpropan-1-on **139** (116 mg, 0,66 mmol, 2,0 eq), askorbinian sodu (52 mg, 0,26 mmol, 0,8 eq) i CuSO<sub>4</sub>· 5H<sub>2</sub>O (17 mg, 0,07 mmol, 0,2 eq) zostały dodane do roztworu erlotynibu **7** (130 mg, 0,33 mmol, 1,0 eq) w 5 ml mieszaniny THF/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v). Uzyskana mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Następnie do mieszaniny dodano 25 ml H<sub>2</sub>O i wykonano ekstrakcję stosując 3 x 25 ml dichlorometanu. Warstwę organiczną oddzielono, osuszono nad bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, przeniesiono do kolby okrągłodennej i wszystkie substancje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem.

Po odparowaniu pozostały olej poddano chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> stosując jako eluent mieszaninę octan etylu/chloroform/metanol 30:7:2 v/v. Oczyszczony chromatograficznie związek **132** krystalizowano z mieszaniny dichlorometan/n-heksan. W wyniku krystalizacji otrzymano analitycznie czystą próbkę w postaci białego ciała stałego z wydajnością 99% (186 mg).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 9,54 (s, 1H, NH), 8,62 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 8,47 (s, 1H, N=CH-N chinazolina), 8,24 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 1,8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8,02 (dd, *J*<sub>H,H</sub> = 8,4, 1,2 Hz, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7,92 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 7,89 (dd, *J*<sub>H,H</sub> = 7,8, 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,66 (tt, *J*<sub>H,H</sub> = 1,2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7,56-7,52 (m, 3H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> i C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7,45 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 7,8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,22 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 4,78 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,30 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3,83 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>) 3,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C{1H} NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 197,0, 156,3, 153,5, 152,8, 148,0, 146,9, 146,1, 140,0, 136,0, 133,4, 131,0, 128,9, 128,7, 127,9, 121,7, 121,6, 120,1, 118,6, 108,9, 108,2, 103,3, 70,1, 70,0, 68,3, 68,0, 58,3, 58,3, 44,8, 37,8 ppm.

**HRMS (ESI+):**  $m/z = 569,2513 (M+H^+)$  (obliczone dla C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: 569,2512).

**FTIR (KBr v [cm<sup>-1</sup>]):** 3377, 3135, 3064, 2929, 2889, 2820, 1684, 1621, 1580, 1524, 1505, 1448, 1427, 1391, 1240, 1208, 1125, 926, 864, 787.

**Analiza elementarna:** wartości określone dla C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>: **C**, 65,48%; **H**, 5,67%; **N**, 14,78%. Wartości zbadane: **C**, 65,17%; **H**, 5,42%; **N**, 14,65%.



Rutenocen **135** (451 mg; 1,95 mmol; 1,0 eq) w dichlorometanie (10 ml) potraktowano chlorkiem 4-chlorobutyrylu **114** (0,10 ml, 0,89 mmol; 0,5 eq.) i chlorkiem glinu (312 mg; 2,34 mmol; 1,2 eq). Po 45 minutach mieszania w temperaturze pokojowej dodano 25 ml wody i wykonano ekstrakcję stosując 3 x 25 ml dichlorometanu. Uzyskane fazy dichlorometanu i wody rozdzielono. Warstwę organiczną osuszono nad bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, przeniesiono do kolby okrągłodennej i wszystkie substancje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem.

Pozostałość poddano chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> stosując jako eluent mieszaninę dichlorometan/heksan 30:1 v/v. Oczyszczony chromatograficznie analitycznie czysty związek **138** otrzymano jako żółte ciało stałe z wydajnością 90% (269 mg).

<sup>1</sup>**H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 5,12 (pt,  $J_{H,H}$  = 1,8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,78 (pt,  $J_{H,H}$  = 1,8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,60 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 3,62 (t,  $J_{H,H}$  = 6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,82 (t,  $J_{H,H}$  = 6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,12 (quin,  $J_{H,H}$  = 6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 201,1, 83,9, 73,6, 72,1, 70,7, 44,8, 35,3, 27,2 ppm.

**HRMS (ESI+):** m/z = 336,9940 (M + H<sup>+</sup>) (obliczone dla C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>OClRu: 336,9933).

**FTIR (KBr v [cm<sup>-1</sup>]):** 3320, 3097, 2975, 2958, 2932, 2906, 1671, 1457, 1410, 1377, 1352, 1248, 1084, 1050, 1030, 996, 878, 810, 723.

**Analiza elementarna:** wartości określone dla C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>OClRu: **C**, 50,08%; **H**, 4,50%. Wartości zbadane: **C**, 50,03%; **H**, 4,68%.



Azydek sodu (203 3,12 mmol, 4,0 eq) został dodany do roztworu mg, (4-chlorobutanoilo)rutenocen **138** (262 mg, 0,78 mmol, 1,0 eq) w 5 ml dimetylosulfotlenku. Uzyskana mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze pokojowej przez 24 godziny w atmosferze argonu. Następnie do mieszaniny dodano 25 ml H<sub>2</sub>O i wykonano ekstrakcję stosując 3 x 25 ml eteru dietylowego. Warstwę organiczną oddzielono, osuszono nad bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, przeniesiono do kolby okrągłodennej i wszystkie substancje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem (Uwaga! Azydki są potencjalnie wybuchowe). Pozostały żółty poddano chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu 5:1 v/v. Po odparowaniu eluentu otrzymano surowy związek 134 w postaci żółtego oleju. Następnie przeprowadzono oczyszczanie związku 134 za pomocą HPLC w normalnym układzie faz z kolumną preparatywną Luna 5u Silica (2) 100A, AXIA Packed 150 X 21.1 mm. Jako eluent zastosowano mieszaninę heksanu (98%) i octanu etylu (2%)

o całkowitym przepływie 7 ml/min. Po odparowaniu eluentu otrzymano analitycznie czysty związek **134** w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 48% (128 mg).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5,11 (bs, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,78 (bs, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4,59 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 3,36 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,72 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,94 (quin, *J*<sub>H,H</sub> = 6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 201,2, 83,8, 73,7, 72,1, 70,7, 50,9, 35,4, 23,8 ppm. HRMS (ESI+): *m*/*z* = 366,0163. (M + Na<sup>+</sup>) (obliczone dla C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>ONaRu: 366,0156). FTIR (KBr v [cm<sup>-1</sup>]): 3303, 3095, 3084, 2977, 2961, 2931, 2903, 2880, 2080, 1657, 1452, 1414, 1372, 1290, 1246, 1221, 1044, 985, 904, 821, 738.

**Analiza elementarna:** wartości określone dla C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>ORu: **C**, 49,12%; **H**, 4,42%; **N**, 12,27%. Wartości zbadane: **C**, 49,13%; **H**, 4,24%; **N**, 12,06%.



Wodorotlenek sodu (20 mg; 0,50 mmol; 1,0 eq) został dodany do roztworu chlorowodorku 2-azydoethyloaminy **141** (61 mg; 0,50 mmol; 1,0 eq) w 3 ml mieszaniny THF/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v). Uzyskana mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Następnie erlotynib **7** (197 mg; 0,50 mmol; 1,0eq), askorbinian sodu (79 mg; 0,40 mmol, 0,8 eq) i CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (25 mg, 0,10 mmol, 0,2 eq) zostały dodane do mieszaniny. Uzyskana mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Następnie dodano dichlorometan oraz bezwodny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w celu usunięcia wody. Warstwę organiczną przesączono, a pozostały na lejku Schotta Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> przemyto 3 x 30 ml metanolu. Warstwę organiczną przeniesiono do kolby okrągłodennej i wszystkie substancje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Po odparowaniu pozostały olej poddano chromatografii kolumnowej na SiO<sub>2</sub> stosując jako eluent mieszaninę dichlorometan/metanol 5:1 v/v. Analitycznie czysta próbka została otrzymana przez preparatywne TLC (dichlorometan/metanol 5:2 v/v). Następnie związek **142** wykrystalizowano z mieszaniny TLC (dichlorometan/metanol 10:1 v/v i heksanu jako białe ciało stałe z wydajnością 61% (147 mg).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ =9,56 (s, 1H, NH), 8,55 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 8,47 (s, 1H, N=CH-N chinazolina), 8,26 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 1,8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,94 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 7,89 (ddd, *J*<sub>H,H</sub>= 7,8, 1,8, 0,6 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,54 (dt, *J*<sub>H,H</sub>= 7,8, 1,8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,45 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 7,8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7,22 (s, 1H, CH Ar chinazolina), 4,37 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 6,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,02 (t, *J*<sub>H,H</sub>= 6,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO-d6): δ = 156,3, 153,5, 152,9, 148,0, 146,9, 146,0, 140,0, 131,1, 128,9, 121,6, 121,6, 120,2, 118,7, 108,9, 108,2, 103,2, 70,1, 70,0, 68,3, 68,0, 58,3, 58,3, 52,9, 41,7 ppm. HRMS (ESI+): m/z = 480,2355 (M + H<sup>+</sup>) (obliczone dla C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>: 480,2359).

**FTIR (KBr v [cm<sup>-1</sup>]):** 3292, 2928, 2889, 1621, 1580, 1523, 1505, 1447, 1428, 1393, 1242, 1206, 1125, 927, 864, 788.

9. Bibliografia

[1] D. U. Silverthorn, B. Ponikowska (Redaktor naukowy polskiego wydania), Fizjologia człowieka zintegrowane podejście, *PZWL Wydawnictwo Lekarskie*, Warszawa, **2018**.

[2] W. Sawicki, J. Małejczyk, Histologia, PZWL Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa, 2018.

[3] M. Krzakowski, J. Jassem, A. Antczak, J. Chorostowska-Wynimko, R. Dziadziuszko, M. Głogowski, T. Grodzki, D. Kowalski, W. Olszewski, T. Orłowski, W. Rzyman, *Oncol. Clin. Pract.* **2019**, *15*, 20-50.

[4] M. Zając, A. Jelińska, I. Muszalska, Chemia leków z elementami chemii medycznej dla studentów farmacji i farmaceutów, *Wydawnictwo naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,* Poznań, **2018**.

[5] M. Pawłowski (Redaktor naukowy), Chemia leków, *PZWL Wydawnictwo Lekarskie*, Warszawa, **2020**.

[6] E. P. Solmon, L. R. Berg, D. W. Martin, Biologia wg IX wydania amerykańskiego, *MULTICO Oficyna Wydawnicza*, Warszawa, **2014**.

[7] J. M. Ritter, R. Flower, G. Henderson, Y. K. Loke, D. MacEwan, H. P. Rang, Rang i Dale Farmakologia, *Edra Urban & Partner*, Wrocław, **2021**.

[8] J. K. W. Lam, M. Y. T. Chow, Y. Zhang, S. W. S. Leung, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **2015**, *4*, e252.

[9] National Cancer Institute: https://www.cancer.gov/types/common-cancers.

[dostęp: 12.06.23]

[10] S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, D. A. Haber, Nat. Rev. Cancer, 2007, 7, 169-181.

[11] National Cancer Institute: https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html [dostęp 24.05.2024]

[12] N. Murray, A. T. Turrisi, J. Thorac. Oncol., 2006, 1, 270-278.

[13] C. Noni, G. Cocconi, G. Bisagni, G. Geci, G. Peracchia, *Cancers*, **1989**, *63*, 638-642.

[14] P. Comella, G. Frasci, N. Panza, L. Manzione, V. Lorusso, G. Di Rienzo, R. Cioffi, G. De Cataldis, L. Maiorino, D. Bilancia, G. Nicolella, M. Natale, F. Carpagnano, C. Pacilio, M. De Lena, A. Bianco, G. Comella, *J. Clin. Oncol.*, **1999**, 1526-1534.

[15] A. D. Fuld, K. H. Dragnev, J. R. Rigas, *Exp. Opin. Pharmacotherapy*, **2010**, *11*, 1387-1402.

[16] T. Mitsudomi, Y. Yatabe, *FEBS Journal*, **2010**, *277*, 301-308.

[17] F. R. Hirsch, M. Varella-Garcia, P. A. Bunn Jr, M. V. Di Maria, R. Veve, R. M. Bremnes, A. E. Barón, C. Zeng, W. A. Franklin, *J. Clin. Oncol.*, **2003**, *21*, 3798-3807.

[18] D. D. Krause, R. A. Van Etten, N. Engl. J. Med., 2005, 353, 172-187.

[19] P. Steiner, C. Joynes, R. Bassi, S. Wang, J. R. Tonra, Y. R. Hadari, D. J. Hicklin, *Clin. Cancer Res.*, **2007**, *13*, 1540-1551.

[20] W. A. Franklin, R. Veve, F. R. Hirsch, B. A. Helfrich, P. A. Bunn Jr, *Seminars in Oncology*, **2002**, *29*, 3-14.

[21] P. L. Graham, Chemia medyczna, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa, 2019.

[22] V. G. Pawar, M. L. Sos, H. B. Rode, M. Rabiller, S. Heynck, W. A. L. van Otterlo, R. K. Thomas,D. Rauh, J. Med. Chem., 2010, 53, 2892-2901.

[23] A. C. Backes, B. Zech, B. Felber, B. Klebl, G. Müller, *Expert Opin. Drug Discov.*, **2008**, *3*, 1409-1425.

[24] A. Ayati, S. Moghimi, S. Salarinejad, M. Safavi, B. Pouramiri, A. Foroumadi, *Bioorg. Chem.*, **2020**, *99*, 103811.

[25] H. Zhang, Drug Des. Devel. Ther., 2016, 10, 3867-3872.

[26] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/nda/2004/21-743\_Tarceva.cfm [dostęp: 21.06.2023].

[27] M. H. Cohen, G. A. Williams, R. Sridhara, G. Chen, R. Pazdur, Oncologist., 2003, 8, 303-306.

[28] Q. Ryan, A. Ibrahim, M. H. Cohen, J. Johnson, C. Ko, R. Sridhara, R. Justice, R. Pazdur, *Oncologist.*, **2008**, *13*, 1114-1119.

[29] C-H. Yu, C-C. Chou, H-F. Tu, W-C. Huang, Y-Y. Ho, K-H. Khoo, M-S. Lee, G-D. Chang, Oncotarget, **2018**, *9*, 21512-21529.

[30] C-H. Yun, K. E. Mengwasser, A. V. Toms, M. S. Woo, H. Greulich, K-K. Wong. M. Meyerson,
 M. J. Eck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, 2070-2075.

[31] W. Pao, V. A. Miller, K. A. Politi, G. J. Riely, R. Somwar, M. F. Zakowski, M. G. Kris, H. Varmus, *PloS Medicine*, **2005**, *2*, e73.

[32] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/label/2017/208051s000lbl.pdf
[dostęp: 28.12.2023]

[33] C. Tan, N. B. Kumarakulasinghe, Y. Huang, Y. L. E. Ang, J. R. Choo, B. Goh, R. A. Soo, *Molecular Cancer*, **2018**, *17*, 29.

[34] Adis International Ltd, Drugs in R & D, 2003, 4, 243-248.

[35] R. Iyer, A. Bharthuar, Expert Opin. Pharmacother., 2010, 11, 311-320.

[36] Rejestr produktów leczniczych, charakterystyka produktu leczniczego Erlotinib Glenmark https://rejestrymedyczne.ezdrowie.gov.pl/rpl/search/public [dostęp: 21.06.2023].

[37] J. Stamos, M. X. Sliwkowski, C. Eigenbrot, J. Biol. Chem., 2002, 277, 46265-46272.

[38] J. H. Park, Y. Liu, M. A. Lemmon, R. Radhakrishnan, Biochem. J., 2012, 448, 417-423.

[39] G. Jaouen (Ed.), Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine, *Wiley-VCH*, Weinheim, Germany, **2006**.

[40] E. Ortega, A. Zamora, U. Basu, P. Lippmann, V. Rodriguez, C. Janiak, I. Ott, J. Ruiz, *J. Inorg. Biochem.*, **2020**, *203*, 110910.

[41] R. Li, W. Zhao, C. Jin, H. Xiong, *Bioorg. Chem.*, **2023**, 135, 106499.

[42] Z. Liu, M. Wang, L. Fang, S. Gou, J. Med. Chem., 2020, 63, 186-204.

[43] F-L. Zhang, Q. Huang, K. Zheng, J. Li, J-Y. Liu, J-P. Xue, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9570-9572.

[44] F-L. Zhang, Q. Huang, J-Y. Liu, M-D. Huang, J-P. Xue, ChemMedChem, 2015, 10, 312-320.

[45] A. Jain, M. Kameswaran, U. Pandey, K. Prabhash, H. D. Sarma, A. Dash, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2017**, *27*, 4552-4457.

[46] J. P. Horowitz, M. J. Noel, Org. Chem. Sem. Monogr., 1964, 29, 2076-2078.

[47] A. Bozzi, G. D'Andrea, F. Brisdelli, Curr. Clin. Pharmacol., 2008, 3, 20-37.

[48] H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, S. Broder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 7096-7100.

[49] R. W. Shafer, D. Vuitton, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **1999**, 53, 73-86.

[50] K. Kowalski, Coord. Chem. Rev., 2021, 432, 213705.

[51] C. D. Sergeant, I. Ott, A. Sniady, , S. Meneni, R. Gust, A. L. Rheingold, R. Dembinski, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 73-80.

[52] M. D. Bartholomä, A. R. Vortherms, S. Hiller, B. Ploier, J. Joyal, J. Babich, R. P. Doyle, J. Zubieta, *ChemMedChem*, **2010**, *5*, 1513-1529.

[53] D. Schwalbe, A. Majdalani, J. Velcicky, E. Heßler, T. Wieder, A. Prokop, H-G. Schmalz, *Agnew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 1731-1734.

[54] C. Hirschhäuser, J. Velcicky, D. Schlawe, E. Hessler, A. Majdalani, J-M. Neudörfl, A. Prokop,T. Wieder, H-G. Schmalz, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 13017-13029.

[55] J. Skiba, R. Karpowicz, I. Szabó, B. Therrien, K. Kowalski, J. Organomet. Chem., 2015, 794, 216-222.

[56] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, Angew. Chem. Int. Ed., 2001, 40, 2004-2021.

[57] S. Chandrasekaran (Editor), Click Reactions in Organic Synthesis, *Wiley-VCH*, Weinheim Germany, **2016**.

[58] R. Huisgen, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1963, 2, 565-598.

[59] M. Breugst, H. U. Reissig, Angew. Chem. Int. Ed., 2020, 12293-12307.

[60] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596-2599.

[61] C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, J. Org. Chem., 2002, 67, 3057-3064.

[62] E. Haldón, M. C. Nicasio, P. J. Pérez, Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 9528-9550.

[63] D. Pasini, *Molecules*, **2013**, *18*, 9512-9530.

[64] H. Durmaz, A. Sanyal, G. Hizal, U. Tunca, *Polym. Chem.*, **2012**, *3*, 825-835.

[65] W. D. G. Brittain, B. R. Buckley, J. S. Fossey, ACS Catal., 2016, 6, 3629–3636.

[66] V. K. Tiwari, B. B. Mishra, K. B. Mishra, N. Mishra, A. S. Singh, Xi Chen, *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 3086–3240.

[67] A. H. El-Sagheer, T. Brown, Acc. Chem. Res., 2012, 45, 1258–1267.

[68] N. Z. Fantoni, A. H. El-Sagheer, T. Brown, Chem. Rev., 2021, 121, 7122-7154.

[69] F. Amblard, J. H. Cho, R. F. Schinazi, Chem. Rev., 2009, 109, 4207–4220.

[70] C. Testa, A. Ma. Papini, M. Chorev, Paolo Rovero, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2018**, *18*, 591-610.

[71] P. Gao, L. Sun, J. Zhou, X. Li, P. Zhan, X. Liu, *Expert Opin. Drug Discov.*, **2016**, *11*, 857-871.

[72] J. C. Sheehan, C. A. Robinson, J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1207-1210.

[73] L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, L. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 15998-15999.

[74] S. Ding, G. Jia, J. Sun, Angew. Chem. Int. Ed., 2014, 53, 1877-1880.

[75] J. McNulty, K. Keskar, R. Vemula, Chem. Eur. J., 2011, 17, 14727-14730.

[76] A. A. Ali, M. Chetia, B. Saikia, P. J. Saikia, D. Sarma, *Tetrahedron Lett.*, **2015**, *56*, 5892-589.

[77] J. McNulty, K. Keskar, Eur. J. Org. Chem., 2012, 2012, 5462-5470.

[78] X. Meng, X. Y. Xu, T. T. Gao, B. Chen, Eur. J. Org. Chem., 2010, 2010, 5409-5414.

[79] M. Boominathan, N. Pugazhenthiran, M. Nagaraj, S. Muthusubramanian, S. Murugesan,N. Bhuvanesh, ACS Sustainable Chem. Eng., 2013, 1, 1405-1411.

[80] Z-G. Wu, X-J. Liao, L. Yuan, Y. Wang, Y-Z. Zheng, J-L. Zuo, Y. Pan, *Chem. Eur. J.*, **2020**, *26*, 5694-5700.

[81] L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, G. Bertrand, Sci. Adv., 2015, 1, e1500304.

[82] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 210–216.

[83] V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, Angew. Chem. Int. Ed., 2005, 44, 2210-2215.

[84] B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, H. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 8923-8930.

[85] K. Kowalski, Coord. Chem. Rev., 2023, 479, 214996.

[86] V. Reshetnikov, S. Daum, A. Mokhir, Chem. Eur. J., 2017, 23, 5678-5681.

[87] V. Reshetnikov, A. Arkhypov, P. R. Julakanti, A. Mokhir, Dalton Trans., 2018, 47, 6679-6682.

[88] S. Top, A. Vessieres, C. Cabestaing, I. Laios, G. Leclercq, C. Provot, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.*, **2001**, *637-639*, 500-506.

[89] C. R. Rzeczek, N. S. Chandel, Ann. Rev. Cancer Biol., 2017, 1, 79-98.

[90] D. Aucamp, S. V. Kumar, D. C. Liles, M. A. Fernandes, L. Harmse, D. I. Bezuidenhout, *Dalton Trans.*, **2018**, *47*, 16072-16081.

[91] A. J. Salmon, M. L. Williams, Q. K. Wu, J. Morizzi, D. Gregg, S. A. Charman, D. Vullo, C. T. Supuran, S. A. Poulsen, *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 5506-5517.

[92] A. J. Salmon, M. L. Williams, A. Innocenti, D. Vullo, C. T. Supuran, S. A. Poulsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 5032-5035.

[93] M. Mazur, M. Mrozowicz, W. Buchowicz, M. Koszytkowska-Stawińska, R. Kamiński, Z. Ochal, P. Wińska, M. Bretner, *Dalton Trans.*, **2020**, *49*, 11504-11511.

[94] N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu,
F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G. F. Gao, W. Tan, *N. Engl. J. Med.*, **2020**, *382*, 727-733.

[95] https://covid19.who.int [dostęp 09.10.2023].

[96] https://www.gov.pl/web/koronawirus/wykaz-zarazen-koronawirusem-sars-cov-2 [dostęp 09.10.2023]

[97] D. M. Mellott, C-T. Tseng, A. Drelich, P. Fajtová, B. C. Chenna, D. H. Kostomiris, J. Hsu, J. Zhu, Z. W. Taylor, K. L. Kocurek, V. Tat, A. Katzfuss, L. Li, M. A. Giardini, D. Skinner, K. Hirata, M. C. Yoon, S. Beck, A. F. Carlin, A. E. Clark, L. Beretta, D. Maneval, V. Hook, F. Frueh, B. L. Hurst, H. Wang, F. M. Raushel, A. J. O'Donoghue, J. L. de Siqueira-Neto, T. D. Meek, J. H. McKerrow, *ACS Chem. Biol.*, **2021**, *16*, 642-650.

[98] L. Zhang, D. Lin, X. Sun, U. Curth, C. Drosten, L. Sauerhering, S. Becker, K. Rox, R. Hilgenfeld, *Science*, **2020**, *368*, 409-412.

[99] Y. M. Báez-Santos, S. E. St. John, A. D. Mesecar, Antiviral Res., 2015, 115, 21-38.

[100] D. Wrapp, N. Wang, K. S. Corbett, J. A. Goldsmith, C-L. Hsieh, O. Abiona, B. S. Graham,
 J. S. McLellan, *Science*, **2020**, *367*, 1260-1263.

[101] M. Takeda, *Microbiol and Immunol.*, **2022**, *66*, 15-23.

[102] M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T. S. Schiergens, G. Herrler, N-H. Wu, A. Nitsche, M. A. Müller, C. Drosten, S. Pöhlmann, *Cell*, **2020**, *181*, 271-280.

[103] T. Heald-Sargent, T. Gallagher, Viruses, 2012, 4, 557-580.

[104] J. Shang, Y. Wan, C. Luo, G. Ye, Q. Geng, A. Auerbach, F. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,**2020**, *117*, 11727.

[105] I. Berdowska, M. Matusiewicz, World J. Gastroenterol., 2021, 27, 6590-6600.

[106] https://www.antibodies-online.com/resources/18/5410/sars-cov-2-life-cycle-stagesand-inhibition-targets [dostęp: 21.02.2024].

[107] M. Scudellari, Nature, 2021, 595, 640-644.

[108] G. Lebeau, D. Vagner, É. Frumence, F. Ah-Pine, X. Guillot, E. Nobécourt, L. Raffray,
 P. Gasque, Int. J. Mol. Sci., 2020, 21, 5932.

[109] J. B. Zawilska, K. Kuczyńska, Wszechświat, 2022, 123, 199-211.

[110] A. R. Palakkott, A. Alneyadi, K. Muhammad, A. H. Eid, K. M. A. Amiri, M. A. Ayoub,R. Iratni, *Vaccines*, **2023**, *11*, 768.

[111] T. Eierhoff, E. R. Hrincius, U. Rescher, S. Ludwig, C. Ehrhardt, *PLoS Pathogens*, **2010**, *6*, e1001099.

[112] M. Engler, D. Albers, P. Von Maltitz, R. Groß, J. Münch, I. C. Cirstea, *Life Sci. Alliance*, **2023**, *6*, e202201880.

[113] L. Albiges, S. Foulon, A. Bayle, B. Gachot, F. Pommeret, C. Willekens, A. Stoclin, M. Merad,
F. Griscelli, L. Lacroix, F. Netzer, T. Hueso, C. Belleyguier, S. Ammari, E. Colomba, G. Baciarello,
A. Perret, A. Hollebecque, J. Hadoux, J. M. Michot, N. Chaput, V. Saada, M. Hauchecome,
J. B. Micol, R. Sun, D. Valteau-Couanet, F. André, F. Scotte, B. Besse, J. C. Soria, F. Barlesi, *Nat. Cancer*, **2020**, *1*, 965-975.

[114] M. Dai, D. Liu, F. Zhou, G. Li, Z. Chen, Z. Zhang, H. You, M. Wu, Q. Zheng, *Cancer Discov.*, 2020, 10, 783-791.

[115] G. Kokic, H. S. Hillen, D. Tegunov, C. Dienemann, F. Seitz, J. Schmitzova, L. Farnung, A. Siewert, C. Höbartner, P. Cramer, *Nat. Commun.*, **2021**, *12*, 279.

[116] J. Xu, Y. Hue, R. Zhou, P. Y. Shi, H. Li, J. Zhou, Med. Res. Rev., 2021, 41, 1375-1426.

[117] S. M. R. Hashemian, A. Sheida, M. Taghizadieh, M. Y. Memar, M. R. Hamblin, B. Baghi,J. S. Nahand, Z. Asemi, H. Mirzaei, *Biomed. Pharmacother.*, 2023, 162, 114367.

[118] N. Hou, L. Shuai, L. Zhang, X. Xie, K. Tang, Y. Zhu, Y. Yu, W. Zhang, Q. Tan, G. Zhong, Z. Wen, C. Wang, X. He, H. Huo, H. Gao, Y. Xu, J. Xue, C. Peng, J. Zou, C. Schindewolf, V. Menachery, W. Su, Y. Yuan, Z. Shen, R. Zhang, S. Yuan, H. Yu, P-Y. Shi, Z. Bu, J. Huang, Q. Hu, ACS Cent. Sci., 2023, 9, 217-227.

[119] M. Gil-Moles, S. Türck, U. Basu, A. Pettenuzzo, S. Bhattacharya, A. Rajan, X. Ma,
R. Büssing, J. Wölker, H. Burmeister, H.Hoffmeister, P. Schneeberg, A. Prause, P. Lippmann,
J. Kusi-Nimarko, S. Hassell-Hart, A. McGown, D. Guest, Y. Lin, A. Notaro, R. Vinck, J. Karges,
K. Cariou, K. Peng, X. Qin, X. Wang, J. Skiba, Ł. Szczupak, K. Kowalski, U. Schatzschneider,
C. Hemmert, H. Gornitzka, E. R. Milaeva, A. A. Nazarov, G. Gasser, J. Spencer, L. Ronconi,
U. Kortz, J. Cinatl, D. Bojkova, I. Ott, *Chem. Eur. J.*, **2021**, *27*, 17928–17940.

[120] D. Graf, N. Farn, J. Klopf, M. Hojjati, U. Schatzschneider, *Metallomics*, **2023**, *15*, mfad023.

[121] M. Hoffmann, H. Hofmann-Winkler, J. C. Smith, N. Krüger, P. Arora, L. K. Sørensen, O. S. Søgaard, J. B. Hasselstrøm, M. Winkler, T. Hempel, L. Raich, S. Olsson, O. Danov, D. Jonigk, T. Yamazoe, K. Yamatsuta, H. Mizuno, S. Ludwig, F. Noé, M. Kjolby, A. Braun, J. M. Sheltzer, S. Pöhlmann, *EBioMedicine*, **2021**, *65*, 103255.

[122] M. P. Hernández Mitre, S. Y. C. Tong, J. T. Denholm, G. J. Dore, A. C. Bowen, S. R. Lewin,
B. Venkatesh, T. E. Hills, Z. McQuilten, D. L. Paterson, S. C. Morpeth, J. A. Roberts, *Clin. Pharmacokinet.*, 2022, *61*, 1331-1343.

[123] D. T. Kozhich, I. A. Prokhorenko, V. A. Korshun, V. N. Staroletov, *Metalloorg. Khim.*, **1993**, *6*, 207-212.

107

[124] L. V. Pavlogradskaya, D. A. Shemyakina, D. V. Eroshenko, I. A. Borisova, V. A. Glushkov, *Rus. J. Org. Chem.*, **2018**, *54*, 126-130.

[125] Y. Fort, P. Caubère, J. C. Gautier, J. C. Mondet, J. Organomet. Chem., 1993, 452, 111-113.

[126] J. F. Hooper, S. Sao, F. R. Truscott, J. D. Neuhaus, M. C. Willis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 1630-1634.

[127] J. Casas-Solvas, E. Ortiz-Salmerón, J. Giménez-Martínez, L. García-Fuentes, L. F. Capitán-Vallvey, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 710-725.

[128] L. Li, G. Zhang, A. Zhu, L. Zhang, J. Org. Chem., 2008, 73, 3630 – 3633.

[129] S. J. Gharpure, S. Naveen, R. S. Chavan, Padmaja, Eur. J. Org. Chem., 2020, 44, 6870-6886.

[130] P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski, *Inorg. Chem.*, **2022**, *61*, 9650-9666.

[131] P. Aquirre-Etcheverry, D. O'Hare, Chem. Rev., 2010, 110, 4839-4864.

[132] G. C. Allen, N. S. Hush, Part 1. Qualitative Evidence for Intervalence-Transfer Absorption in Inorganic Systems in Solution and in the Solid State, Progress in Inorganic Chemistry, *John Wiley & Sons, Inc.*, **1967**.

[133] N. S. Hush, Part 2. Theoretical Considerations and Spectroscopic Data, Progress in Inorganic Chemistry, *John Wiley & Sons, Inc.*, **1967**.

[134] M. D. Ward, Chem. Soc. Rev., 1995, 24, 121-134.

[135] S. D. Glover, J. C. Goeltz, B. J. Lear, C. P. Kubiak, Eur. J. Inorg. Chem., 2009, 2009, 585-594.

[136] A. Ceccon, S. Santi, L. Orian, A. Bisello, Coord. Chem. Rev., 2004, 248, 683-724.

[137] M. B. Robin, P. Day, Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry, *Elsevier*, **1968**.

[138] A. P. Ferreira, J. L. F. da Silva, M. T. Daurte, M. F. M. Piedade, M. P. Robalo, S. G. Harjivan,C. Marzano, V. Gandin, M. M. Marques, *Organometallics*, **2009**, *28*, 5412-5423.

[139] A. Tárraga, P. Molina, D. Curiel, J. L. López, M. D. Velasco, *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 14701-14718.

[140] H. Zhang, M. Riomet, A. Roller, N. Maulide, Org. Lett., 2020, 22, 2376-2380.
[141] J. Skiba, A. Kowalczyk, A. Górski, N. Dutkiewicz, M. Gapińska, J. Stróżek, K. Woźniak, D.Trzybiński, K. Kowalski, *Dalton Trans.*, **2023**, *52*, 1551-1567.

[142] M. Proverbio, E. Q. Procopio, M. Panigati, S. Mercurio, R. Pennati, M. Ascagni, R. Leone,C. La Porta, M. Sugni, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 509-518.

[143] K. V. Domasevitch, I. A. Gural'skiy, P. V. Solntsev, E. B. Rusanov, H. Krautscheid, J. A. K. Howard, A. N. Chernega, *Dalton Trans.*, **2007**, *29*, 3140-3148.

10. Życiorys oraz przebieg pracy naukowej

Mgr inż. Przemysław Biegański urodził się 20 sierpnia 1996 roku w Kutnie. W latach 2012 – 2015 uczęszczał do I Liceum Ogólnokształcącego im. Gen. Jana Henryka Dąbrowskiego w Kutnie, do klasy o profilu biologiczno-chemiczno-fizycznym.

W 2015 roku po zakończeniu kształcenia w liceum rozpoczął studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej na kierunku Chemia ze specjalnością Synteza organiczna.

W 2019 roku uzyskał tytuł inżyniera broniąc pracę inżynierską pt. "Optymalizacja warunków addycji nitrometanu do 3-dietoksyfosforylo-4*H*-chromen-4-onu i jego pochodnych". Praca ta została wykonana w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem dr inż. Jacka Kędzi.

W tym samym roku mgr inż. Przemysław Biegański rozpoczął studia drugiego stopnia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej na kierunku Chemia ze specjalnością Nowoczesna synteza i analiza związków organicznych. Pracę magisterską pt. "Walidacja metody oznaczania tiuramu w glebie mineralnej i organicznej z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)" wykonał w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem dr inż. Doroty Adamczyk-Szabeli, uzyskując tytuł magistra w 2020 roku.

W tym samym roku mgr inż. Przemysław Biegański rozpoczął kształcenie w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego gdzie rozpoczął badania w ramach rozprawy doktorskiej w Katedrze Chemii Organicznej pod kierunkiem prof. dr hab. Konrada Kowalskiego. Temat zrealizowanej rozprawy doktorskiej brzmi: "Metaloorganiczne pochodne typu "click" erlotynibu oraz AZT – synteza i aktywność biologiczna".

Przemysław Biegański jest współautorem dwóch oryginalnych artykułów i jednego artykułu przeglądowego opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz sześciu doniesień naukowych, przedstawionych w ramach konferencji krajowych i zagranicznych. Jeden z oryginalnych artykułów jest w trakcie recenzji w czasopiśmie *Organometallics*.

111

# 11. Działalność naukowa i organizacyjna

Udział w projektach naukowo-badawczych:

- 1. 11.2020 02.2022 Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii; stanowisko doktoranta finansowym w projekcie naukowym przez Narodowe Centrum Nauki OPUS 15: "Funkcjonalne nukleozydy, nukleotydy i oligonukleotydy glikolo-nukleinowe otrzymywanie i właściwości" UMO-2018/29/B/ST5/00055 (fun-GNA): Kierownik projektu: prof. dr hab. Konrad Kowalski
- 03.2022 02.2024 Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii; projekt naukowy finansowy przez Narodowe Centrum Nauki PRELUDIUM 20: "Zwalczanie raka płuc za pomocą metaloorganicznych koniugatów erlotynibu - synteza i badania in vitro" UMO-2021/41/N/ST4/00059 Kierownik projektu: mgr inż. Przemysław Biegański

Wystąpienia konferencyjne:

#### Komunikaty posterowe:

- P. Biegański, J. Kopecka, K. Kowalski, "Ferrocenylowe pochodne erlotynibu o aktywności wobec opornych na erlotynib komórek niedrobnokomórkowego raka płuc", IX Łódzkie Sympozjum Doktorantów; Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 19-20 maja 2022;
- P. Biegański, J. Kopecka, K. Kowalski, "Click ferrocenyl-erlotinib conjugates active against erlotinib-resistant non-small cell lung cancer cells *in vitro*", XXIII International Symposium "Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds"; Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, Łódź; 28 październik 2022;

- P. Biegański, J. Kopecka, K. Kowalski, "Click ferrocenyl-erlotinib conjugates active against erlotinib-resistant non-small cell lung cancer cells *in vitro*", International Symposium on Bioorganometallic Chemistry 2023; Technische University Braunschweig, Brunszwik, Niemcy, 18-21 wrzesień 2023;
- P. Biegański, K. Kowalski, "Click organometallic-erlotinib conjugates active against lung cancer cells", XXIII International Symposium "Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds"; Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, Łódź; 24 listopad 2023;

#### Komunikaty ustne:

- P. Biegański, "Click ferrocenyl-erlotinib conjugates active against erlotinib-resistant non-small cell lung cancer cells *in vitro*", Technische Universitat Chemnitz, Niemcy, 1 grudnia 2022;
- P. Biegański, "Ferrocenylowe pochodne erlotynibu typu "click" o aktywności wobec opornych na erlotynib komórek niedrobnokomórkowego raka płuc", X Łódzkie Sympozjum Doktorantów; Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 18-19 maja 2023;

# 12. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej

## Publikacja P1

P. Biegański, M. Godel, C. Riganti, D. F. Kawano, J. Kopecka, K. Kowalski

"Click ferrocenyl-erlotinib conjugates active against erlotinib-resistant non-small cell lung cancer cells *in vitro*"

Bioorganic Chemistry, 2022, 119, 105514

Impact factor (IF) = 5,10

Contents lists available at ScienceDirect



### **Bioorganic Chemistry**



journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioorg

# Click ferrocenyl-erlotinib conjugates active against erlotinib-resistant non-small cell lung cancer cells *in vitro*

Przemysław Biegański<sup>a</sup>, Martina Godel<sup>b</sup>, Chiara Riganti<sup>b</sup>, Daniel Fábio Kawano<sup>c</sup>, Joanna Kopecka<sup>b,\*,1</sup>, Konrad Kowalski<sup>a,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Łódź, Tamka 12, 91-403 Łódź, Poland

<sup>b</sup> Department of Oncology, University of Torino, via Santena 5/bis, 10126 Turin, Italy

<sup>c</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, 200 Cândido Portinari Street, Campinas, SP 13083-871, Brazil

#### ARTICLE INFO

Keywords: Erlotinib Ferrocene Click chemistry Lung cancer Drug resistance

#### ABSTRACT

Thanks to development of erlotinib and other target therapy drugs the lung cancer treatment have improved a lot in recent years. However, erlotinib-resistant lung cancer remains an unsolved clinical problem which demands for new therapeutics to be developed. Herein we report the synthesis of a library of 1,4- and 1,5-triazole ferrocenyl derivatives of erlotinib together with their anticancer activity studies against erlotinib-sensitive A549 and H1395 as well as erlotinib-resistant H1650 and H1975 cells. Studies showed that extend of anticancer activity is mainly related to the length of the spacer between the triazole and the ferrocenyl entity. Among the series of investigated compounds two isomers commonly bearing C(==O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> spacer have shown superior to erlotinib activity against erlotinib-resistant H1650 and H1975 cells whereas compound with short methylene spacer devoid of any activity. In-depth biological studies for the most active compound showed differences in its mechanism of action in compare to erlotinib. The latter is known EGFR inhibitor whereas their ferrocenyl congener exerts anticancer activity mainly as ROS-inducer which activates mitochondrial pathway of apoptosis in cancer cells. However, docking studies suggested that the most active compound can also binds to the active site of EGFR TK in a similar way as erlotinib.

#### 1. Introduction

Despite of unquestionable progress in prevention, early diagnosis and treatment, cancer still represents a great medical and sociological problem worldwide. According to National Cancer Institute estimation the breast, prostate, lung and colorectal cancer together account for more than 915 000 new cases in 2021 in US alone [1]. Out of these four, the lung cancer has a third position with over 230 000 estimated new cases in 2021 [1]. The most common types of lung cancer are small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). NSCLC comprises 80% and SCLC 20% of lung cancer cases in total [2]. General treatment options include surgery, radiotherapy, target therapy, chemotherapy and immunotherapy or their combination and depend strongly on the type of cancer and its stage of development. Chemotherapy of NSCLC includes treatment with Pt-based drugs, metal-free agents *e.g.*, gemcitabine, paclitaxel, docetaxel and pemetrexed and

combination of them [3-10]. Progress in the studies on receptor tyrosine kinase (TK) family of proteins which function as cellular signal/proliferation mediators open up a new era in cancer pharmacotherapy introducing target therapy [1,11,12]. The epidermal growth factor (EGFR) belongs to TK and is overexpressed in several cancer types [11] including NSCLC [13]. It has been recognized as a target for a number of 4-anilinoquinoline derivatives [14–17] including clinically approved drugs like gefitinib and erlotinib (Erlo) [2–18]. Susceptibility of NSCLC cells toward gefitinib and erlotinib is associated with deletions in exon 19 (results in elimination of amino acids LREA in close proximity to the K745 ATP-binding site), point mutations in exon 21 and nucleotide substitutions in exons 18–21 of EGFR TK domain [18]. The 2.6 Å X-ray crystal structure of EGFR TK domain in complex with erlotinib shows that the drug's molecule binds to the protein in the ATP binding site and is stabilized by hydrogen bonds with the hinge region as well as with the side chain of the gatekeeper residue Y790 (encoded by exon 20) [19].

\* Corresponding authors.

<sup>1</sup> Senior co-authorship.

https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105514 Received 5 October 2021; Accepted 21 November 2021 Available online 24 November 2021 0045-2068/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

*E-mail addresses*: przemyslaw.bieganski@edu.uni.lodz.pl (P. Biegański), martina.godel@unito.it (M. Godel), chiara.riganti@unito.it (C. Riganti), dkawano@ unicamp.br (D.F. Kawano), joanna.kopecka@unito.it (J. Kopecka), konrad.kowalski@chemia.uni.lodz.pl (K. Kowalski).

This interaction is mediated by water molecule [19]. It has been shown that mutation resulting in substitution of threonine790 with methionine results in resistance to erlotinib treatment [20].

Clinical success of cisplatin-type [21] drugs stimulated efforts for searching of new anticancer agents amongst inorganic metal complexes and organometallic compounds [22-37]. One of strategies used in this quest is based on organometallic derivatization of well-established anticancer drugs, natural products and biomacromolecules [38-42]. Amongst the many of organometallic moieties, which have been used for derivatization purposes, the ferrocenyl (Fc) entity received greatest attention [35,40-45]. In that respect compounds called ferrocifenes are relevant examples of Fc-derivatized anticancer drugs [46]. Their structure originated from the substitution of the phenyl ring in the anti-breast cancer drug tamoxifen with the Fc entity [46]. Incorporation of the Fc group into a tamoxifen scaffold activates oxidation-related [37,46] mechanism of action. This mechanism enhanced anticancer potential of ferrocifenes and facilitates their activity against hormone-independent and drug-resistant cancer cells [46]. Further examples of Fc derivatives of anticancer drugs can be found for instance in Ref. [40,44,45].

Metal-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition (click) reaction [47–50] has found great number of applications in the chemistry of nucleic acids [51,52], carbohydrates [53], alkaloids [54], porphyrynoids [55], proteins [56] and so forth [57,58]. Usually it is operationally simple in execution, can be carried out in complicated matrixes including living cell environment [59], produces little or no byproducts and enables for covering of a wide chemical space in cost and timeeffective manner. Click reaction has been successfully applied for derivatization of erlotinib with boron cluster compounds [17,60]. Obtained conjugates showed high anticancer activity against EGFRoverexpressing glioblastoma cancer cells in vitro. In addition, boroncontaining erlotinib conjugates represent an attractive option as agents for boron neutron capture therapy (BNCT). Recently an excellent report on phosphane gold (I) complex of erlotinib has been published [61]. Biological activity of this conjugate was dictated by the phosphane gold entity and differs from that exhibited by erlotinib alone. Whereas erlotinib act as EGFR inhibitor arresting cancer cells in G1 phase its gold derivative exerts potent anticancer activity through different mechanism related to reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial potential imbalance, DNA scission and cell cycle arrest in S and G2/M phases [61].

Keeping in mind the clinical importance of erlotinib for lung cancer treatment and the increasing interest in metal-modified erlotinib conjugates we report herein on the synthesis of five ferrocenyl-erlotinib "click" conjugates and their anticancer activity studies against erlotinib-sensitive A549 and H1395 as well as erlotinib-resistant H1975 (harboring T790M mutation) and H1650 (with phosphatase and tensin homologue loss) NSCLC [2]. Toxicity of obtained compounds was also examined against non-tumoral human bronchial epithelium (BEAS-2B) cells.

#### 2. Results and discussions

#### 2.1. Synthesis of compounds 1-6

Synthetic approach toward 1,4-disubstituted ferrocenyl-erlotinib 1,2,3-triazoles **2–4** is shown in Scheme 1 whereas the synthesis of 1,5isomers **5** and **6** was carried out as shown in Scheme 2. To obtain compounds **2–4** the copper-catalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) was used [51]. First, the synthesis of 4-azidobutanoylferrocene **1** was carried out via substitution of the chloride in commercially available 4-chlorobutanoylferrocene with azide anion (see Experimental Section). The CuAAC reaction of erlotinib (**Erlo**) with **1** afforded conjugate **2** in 82% yield. Likewise, reaction of **Erlo** with literature 3-azidopropanoylferrocene **A** [62] or azidomethylferrocene **B** [63] afforded 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles **3** and **4** in 77% and 46% yield, respectively.

To obtain 1,5-isomers **5** and **6** the ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (RuAAC) reaction was applied with  $Cp*RuCl(PPh_3)_2$  complex **C** as catalyst. Using of **C** was substantiated by literature survey which showed its excellent performance in ability to produce the 1,5-disubstituted 1,2,3-triazoles in good yields [64].

Accordingly the reaction of **Erlo** with azide 1 or **A** afforded the expected 1,5-isomers 5 and 6 as sole products in 50% and 46% yield, respectively. In contrary, the RuAAC reaction of **Erlo** with azidomethylferrocene **B** failed. This can be plausibly explained by the steric



Scheme 1. Synthesis of compounds 2-4.



Scheme 2. Synthesis of compounds 5 and 6.

hindrance in the coordination sphere of the ruthenium catalytic center provided by the catalyst's Cp\* ligand and the ferrocenyl entity of azide **B**. The structure of compounds **1–6** was confirmed by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and IR spectroscopy, high-resolution mass-spectrometry and elemental analysis. Analytical data confirmed the postulated structures. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of 1–6 are given in Fig. S1-12 of the ESI. The following compounds **2–6** have been subjected towards biological studies.

#### 2.2. Biological studies

#### 2.2.1. Antiproliferative activity examination

In the first stage of the studies screening of cytostatic activity of **Erlo** and conjugates **2–6** was carried out against **Erlo**-sensitive (A549, H1395) and **Erlo**-resistant (H1650, H1975) human lung cancer cells as well as against non-tumoral bronchial epithelium (BEAS-2B) cells with colorimetric WST-1 assay. Determined IC<sub>50</sub> concentrations after 48 h treatment time are shown in Table 1.

The IC<sub>50</sub> values for **Erlo** were between  $12\pm0.09$  and  $40\pm0.16~\mu\text{M}$  with the highest value of  $40\pm0.16$  and  $37\pm0.08$  against H1650 and H1975 cells, respectively. The most active among examined compounds were **3** and **6** which both showed superior activity to **Erlo** against H1650 (IC<sub>50</sub> =  $12\pm0.13~\mu\text{M}$ ; IC<sub>50</sub> =  $18\pm0.09~\mu\text{M}$ ) and H1975 (IC<sub>50</sub> =  $27\pm0.08~\mu\text{M}$ , IC<sub>50</sub> =  $27\pm0.1~\mu\text{M}$ ) cells. Compound **5** was more active against H1650 cells than **Erlo** whereas derivative **2** was superior to **Erlo** against H1975 cells. The least active was compound **4** with the IC<sub>50</sub> values

between 228  $\pm$  0.06 and 778  $\pm$  0.18  $\mu M.$  All tested compounds were less toxic than Erlo against BEAS-2B cells. The most anticancer active 3 and 6 had IC\_{50} values of 155  $\pm$  0.94 and 136  $\pm$  0.11  $\mu M$  against BEAS-2B cells, respectively. That was approx. 2 times higher value than the  $IC_{50}$  value for  $\text{Erlo}~(74\pm0.1~\mu\text{M})$  against BEAS-2B cells. Results of the screening showed that the distance between the ferrocenyl and the triazole entity rather than triazole 1,4 vs. 1,5 substitution pattern has a decisive role in exerting of anticancer activity of **2–6** compounds. Both most active derivatives have the same C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> linker between the ferrocenyl and the triazole entities but differ in the triazole substitution pattern. Less active isomers 2 and 5 possess one methylene group longer linkers. On the contrary compound 4 with just a single methylene group between the ferrocenyl and the triazole entity showed no activity against all cell types tested. Therefore, the three-carbon atom linker in 3 and 6 seem to be optimal for observed high activity of both compounds against a panel of assayed cancer cells. Superior to Erlo activity of compound 3 and 6 against Erlo-resistant H1650 and H1975 cells prompted us to focus our studies entirely on these two cell lines. In those cells IC50 value for 3 and 6 was around 20  $\mu M$  (between the 12  $\pm$  0.13 and 27  $\pm$  0.08  $\mu$ M). Thus, in a next stage of work the viability of H1650 and H1975 cells treated with 20  $\mu M$  concentration of compounds for 24 h, 48 h and 72 h time was examined. All assayed compounds with exception for inactive derivative  ${\bf 2}$  showed a time dependent inhibition of H1650 and H1975 cells viability. At 24 h (Fig. 1) the effects of Erlo as well as the compounds were moderate. The only compound, which caused about 23% viability decrease of H1975 cells, was 3.

#### Table 1

Cytostatic activity ( $IC_{50}$ ;  $\mu$ M) of compounds **2–6** and **Erlo** against **Erlo**-sensitive (A549, H1395) and **Erlo**-resistant (H1650, H1975) human lung cancer cells as well as against non-tumoral human bronchial epithelium (BEAS-2B) cells. Results are expressed as means  $\pm$  SD of three independent experiments in four repeats each.  $IC_{50}$  was defined as the concentrations of compound that is required to achieve a 50% decrease in cell viability when compared to the viability of untreated control cells. Treatment time 48 h.

	Erlo	2	3	4	5	6
H1650	$40\pm0.16$	$761\pm0.13$	$12\pm0.13$	$228\pm0.06$	$15\pm0.05$	$18\pm0.09$
H1975	$37\pm0.08$	$26\pm0.10$	$27\pm0.08$	$312\pm0.04$	$48\pm0.06$	$27\pm0.10$
H1395	$33\pm0.11$	$359\pm0.03$	$15\pm0.11$	$355\pm0.04$	$11\pm0.08$	$18\pm0.07$
A549	$12\pm0.09$	$88 \pm 0.04$	$7.9\pm0.10$	$351\pm0.05$	$42\pm0.05$	$17\pm0.04$
BEAS-2B	$74 \pm 0.10$	$84 \pm 0.96$	$155\pm0.94$	$\textbf{778} \pm \textbf{0.18}$	$121\pm0.08$	$136\pm0.11$



Fig. 1. Erlo-resistant H1650 and H1975 cells viability after 24 h treatment time with 20  $\mu$ M of compounds 2–6 and Erlo. Cell viability was measured spectrophotometrically in triplicates. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*p < 0.05: drugs treated cells vs. respective untreated (Ctrl) cells.

After 48 h treatment time the cytostatic effect of **3**, **5** and **6** was clearly visible (Fig. 2). All three compounds were significantly more active than **Erlo** in H1650 cells and compound **3** and **6** were more potent than **Erlo** drug in H1975 cells. In case of H1650 cells compound **3** and **6** caused about 66% and 50% viability decrease, respectively. The cytostatic effect was somehow less pronounced in H1975 as compound **3** and **6** decreased the viability of the cells to about 47% and 46%, respectively (Fig. 2).

The highest impact on viability of the cells was observed after 72 h treatment time. Compounds **2**, **3**, **5** and **6** were all more active than **Erlo** against H1650 and H1975 cells (Fig. 3). The most active compound **3** decreased the viability of the cells to low level of about 14% (H1650) and 19% (H1975) in respect to control. Compound **6** was slightly less active as it caused about 76% and 80% viability decrease in H1650 and H1975 cells, respectively.

# 2.2.2. Reactive oxygen species (ROS) generation and anticancer activity of **3** in the presence of N-acetylcysteine (NAC)

Oxidative stress (OS) and ROS induction have been recognized as key factors that contribute to the anticancer activity of organometallic compounds [61,65,66]. Therefore, we measured the amount of ROS (OH<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROO<sup>•</sup>) generated by **Erlo** and compounds **2–6** at 20  $\mu$ M concentration at 1 h treatment in H1650 and H1975 cells with the fluorescent probe 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate acetyl ester (CM-H2DCF-DA).

Compounds **2**, **3**, **5** and **6** were more effective generators of ROS than **Erlo** in both cell types (Fig. 4). The least active was compound **4**, which induced more ROS than **Erlo** only in H1975 cells. Noticeably all

examined compounds showed lower ability for ROS generation in H1650 than in H1975 cells. The most effective ROS inductor was compound **3** which generated about 3 and 2 times more ROS than **Erlo** in H1650 and H1975 cells, respectively. As proof of concept that ROS mediate the anticancer activity of **3**, the ROS measurement and the viability assays were repeated in the presence of the ROS scavenger *N*-acetylcysteine (NAC). NAC is a natural byproduct of glutathione metabolism and it plays an important role as antioxidant which decrease OS in cells and tissues [67]. NAC had a no effect on ROS generation by **Erlo** (Fig. 5). On the contrary the ROS amount generated by compound **3** in NAC-treated H1650 and H1975 cells was approx. 2 times lower in compare to NAC-non treated cells.

Further support to the pivotal role of ROS in inducing the compound **3** anticancer action was provided by the viability assays. Cells treated with NAC were less sensitive toward compound **3** (Fig. 6). The viability of NAC-treated H1650 cells increased 21% in compared to NAC-non treated cells and analogous increase which amounts to 18% was also observed for H1975 cells (Fig. 6). These results substantiated induction of OS/ROS as a factor in anti-proliferative activity of **3**.

# 2.2.3. Changes in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation

Mitochondria are recognized cellular target for anticancer organometallic compounds [68] including recently reported gold (I) erlotinib complex [61] and the reduction in the mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta \Psi_m$ ) is responsible for apoptosis induction via the intrinsic pathway which in turn is mediated by the activation of caspase 9 and then caspase 3. To evaluate changes in the mitochondrial



Fig. 2. Erlo-resistant H1650 and H1975 cells viability after 48 h treatment time with 20  $\mu$ M of compounds 2–6 and Erlo. Cell viability was measured spectrophotometrically in triplicates. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001: drugs treated cells vs. respective untreated (Ctrl) cells; °p < 0.05: compounds treated cells vs. Erlo treated cells.



Fig. 3. Erlo-resistant H1650 and H1975 cells viability after 72 h treatment time with 20  $\mu$ M of compounds 2–6 and Erlo. Cell viability was measured spectrophotometrically in triplicates. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\*p < 0.001: drugs treated cells vs. respective untreated (Ctrl) cells; °p < 0.05, °°p < 0.01: compounds treated cells vs. Erlo treated cells.



Fig. 4. The relative ROS amount generated by 20  $\mu$ M Erlo and 2–6 in H1650 and H1975 cells. The ROS levels were measured by a fluorimetric assay in duplicates. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\*p < 0.001: compounds treated cells vs. respective untreated (Ctrl) cells; °p < 0.05, °°p < 0.01, °°°p < 0.001: compounds treated cells vs. From treated cells.



Fig. 5. The effect of 50  $\mu$ M NAC on relative ROS amount generation by 20  $\mu$ M Erlo or 3 in H1650 and H1975 cells. The ROS levels were measured by a fluorimetric assay in duplicates. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\*p < 0.001: drugs treated cells vs. respective untreated (Ctrl) cells; <sup>ooo</sup>p < 0.001: compound 3 treated cells vs. Erlo treated cells; ###p < 0.001: compounds + NAC treated cells vs. compounds treated cells.

transmembrane potential we employed fluorescent JC-1 dye which is an established probe for detecting depolarization of the mitochondrial membranes in apoptotic cells [69]. The JC-1 aggregates show red fluorescence when accumulated in energized mitochondria with high  $\Delta \Psi_{\rm m}$ . In apoptotic cells where  $\Delta \Psi_{\rm m}$  decreases, dye is released to cytoplasm and shows monomeric green emission. Treatment of H1650 and H1975 cells with compound **3** resulted in 11% and 17% increase in green to red



**Fig. 6.** The effect of NAC on cytostatic (48 h treatment time) activity of **Erlo** and **3** against H1650 and H1975 cells. Cell viability was measured spectro-photometrically in triplicates. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\*p < 0.001: compounds treated cells vs. respective untreated (Ctrl) cells;  $^{\circ\circ}p < 0.001$ ,  $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ : compound **3** treated cells vs. **Erlo** treated cells; #p < 0.001: compounds + NAC treated cells vs.: compounds treated cells.

emission in compare to **Erlo** treated cells (Fig. 7). This observation pinpoints that lung cancer cell's death is facilitated by the loss in the mitochondrial transmembrane potential and intrinsic apoptosis pathway.

To test this hypothesis, the activities of the initiator caspase-9 and the effector caspase-3 were investigated. Caspase-9 is related with the



**Fig. 7.** Changes in mitochondrial transmembrane potential  $(\Delta \Psi_m)$  of H1650 and H1975 lung cancer cells treated for 48 h with 20  $\mu$ M **Erlo** or **3**. Changes in  $\Delta \Psi_m$  were measured by a fluorimetric assay in duplicates using JC-1 dye. The percentage of green *vs.* red mitochondria was considered a marker of mitochondrial depolarization. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\*p < 0.001: compound treated cells *vs.* respective untreated (Ctrl) cells; °°° p < 0.001: compound **3** treated cells *vs.* **Erlo** treated cells.

internal (mitochondrial) apoptosis pathway whereas effector caspase-3, which acts downstream the activation of caspase-9, initiates the apoptotic DNA fragmentation in the cells [70]. The results of caspase activation assays are provided in Figs. 8 and 9. Both caspases are activated in **Erlo**-resistant cells by compound **3** albeit to different extend. Caspase-9 in H1650 and H1975 cells was about 2 times more activated in cells treated with **3** compared to control and more than in cells treated with **Erlo** (Fig. 8). Even higher levels of activation were found for caspase-3 in both studied cell types. Accordingly, the activation of caspase-3 was about 2 and 3 times higher in H1650 and H1975 cells in compare to control and higher than the activation caused by **Erlo** (Fig. 9).

#### 2.2.4. The effect of 3 on the cell cycle distribution

Inhibition of the cell cycle in cancer cells is a recognized response to treatment with organometallic compounds and metal-based drugs. Thus the cell cycle analysis was carried out in H1650 and H1975 cells treated for 48 h with 20  $\mu$ M concentration of **3** or **Erlo** and analyzed by flow



**Fig. 8.** The activity of caspase-9 in H1650 and H1975 cells treated for 48 h with 20  $\mu$ M **Erlo** or **3.** Activity was measured by a fluorimetric assay in duplicate in the cytosolic extracts. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\*p < 0.001: compound treated cells vs. respective untreated (Ctrl) cells; °p < 0.01: compounds treated cells vs. **Erlo** treated cells.



**Fig. 9.** The activity of caspase-3 in H1650 and H1975 cells treated for 48 h with 20  $\mu$ M **Erlo** or **3**. Activity was measured by a fluorimetric assay in duplicate in the cytosolic extracts. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\*p < 0.001: compound treated cells vs. respective untreated (Ctrl) cells; °p < 0.01: compounds treated cells vs. **Erlo** treated cells.

cytometry with propidium iodide (PI) staining. PI is a fluorescent sequence-nonspecific DNA intercalator widely used to evaluate cell viability or DNA content in cell cycle analysis.

**Erlo** is an EGFR inhibitor and it blocked G1/S transition increasing sub-G1 and G0/G1 cell population in H1650 and H1975 cells (Figs. 10 and 11). Also compound **3** caused 12.3% (H1650) and 23.0% (H1975) of cells to arrest in the sub-G1 phase (Figs. 10 and 11) what is a sign of pro-apoptotic activity. At the same time compound **3** decreased cell number in the G0/G1 phase and increased the cell number in the G2/M phase in both examined cancer cell types, suggesting a mitotic arrest (Figs. 10 and 11). This is in contrast to **Erlo** which decrease the percentage of the cells in G2/M phase in H1650 and in H1975 cells, respectively.

#### 2.2.5. DNA damage in H1650 and H1975 cells

DNA damage and fragmentation is often associated with organometallic compound's mechanism of action in cancer cells [71]. Furthermore, DNA damage is one of the main reasons of G2/M cell cycle arrest induced by anticancer drugs such as cisplatin [72,73]. Therefore, we examined the extend of histone H2AX phosphorylation with antigamma H2AX antibody as an indirect measure of chromatin/nucleosome integrity and DNA double strand breaks in H1650 and H1975 cells (Fig. 12) [74].

The H1650 cells treated with Erlo showed formation of high



**Fig. 10.** Cell cycle distribution of H1650 cells treated for 48 h with 20  $\mu$ M concentration of **3** and **Erlo**. Measurements were done in duplicates. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001: compounds treated cells vs. respective untreated (Ctrl) cells; °°° p < 0.001: compound **3** treated cells vs. **Erlo** treated cells.



**Fig. 11.** Cell cycle distribution of H1975 cells treated for 48 h with 20  $\mu$ M concentration of **3** and **Erlo**. Measurements were done in duplicates. Data are means  $\pm$  SD (n=3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001: compounds treated cells vs. respective untreated (Ctrl) cells; ^op < 0.01, ^oop < 0.001: compound **3** treated cells vs. **Erlo** treated cells.

numbers of small foci detected with anti-pH2AX staining (Fig. 12) whereas cells treated with compound **3** were visualized as diffuse halos rather than distinct foci, indicating extend DNA damage. (Fig. 12). Similar results were found in H1975 cells where compound **3** had higher ability for DNA damage than **Erlo**.

#### 2.2.6. Annexin V/PI assay

In the last part of the studies we applied the Annexin V / PI assay for the evaluation of pro-apoptotic activity of **3** in H1650 and H1975 cells. The Annexin V assay allows for discrimination between apoptotic and necrotic cells as it measures the real-time exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of cell membranes in the course of apoptotic process. Fig. 13 shows the numeric data on the percentage of viable cells; necrotic cells (cell positive for PI staining but negative for Annexin V staining, located in the upper left part of flow cytometric analysis); early apoptotic cells (cell positive for Annexin V staining but negative for PI staining, located in the lower right part of flow cytometric analysis) and late apoptotic cells (cell positive for PI staining for Annexin V staining, located in the upper right part of flow cytometric analysis). The necrosis caused by **Erlo** or **3** was at comparatively low level in H1650 cells and absent in H1975 cells. Compound **3** showed higher pro-apoptotic activity than **Erlo** in both examined cell types. In H1650 cells treated with **3** the number of late apoptotic cells were about 3.5 higher than in the same cells treated with **Erlo**. In case of H1975 cells the analogous ratio exceeded 2. This indicated that apoptosis is a dominant pathway of the cell-death induced by **3** in H1650 and H1975 cells.

#### 2.3. Docking studies of Erlo, 3 to EGFR TK

One of the critical aspects for the binding of a ligand with the corresponding target is shape complementarity since both molecular surfaces should match perfectly if one expects to observe a high binding affinity [75], a notion that is generally intuitive because of the lock and key principle proposed by Emil Fischer. The fact that some key intermolecular interactions for ligand recognition and binding, such as hydrogen bonds, are influenced by the angle between the interacting groups and, accordingly, the optimal scenario occurs when the complementarity between the ligand and the receptor surfaces is observed [76].

Such steric aspects tend to be even more relevant for ferrocene-based ligands since, because of the 'barrel' shape of the metallocene, they will fill binding site cavities more efficiently than a simple phenyl or heterocycle substituent [43,77]. We believe this may partially explain the activities observed for compound **3** and the other ferrocenyl derivatives in the biological assays. The ferrocene in **3** would explore a small cavity, which is contiguous to the ATP-binding cleft (Fig. 14A) and is formed by a  $\beta$ -strand and the single  $\alpha$ -helix that compose the NH<sub>2</sub>-terminal lobe of the EGFR kinase domain [19]. As no direct intermolecular interaction is predicted for this group at the EGFR kinase domain (Fig. 15), the improvement in binding affinity when compared to **Erlo** could be attributed to a steric factor.

Concerning the quinazoline nuclei, **3** maintained the same relative orientation as the observed for the crystallographic ligand, **Erlo** (Fig. 14A and B), while both nuclei also displayed similar hydrophobic interactions with hydrophobic residues and a stronger hydrogen bond with Met<sup>769</sup> (Fig. 15). These interactions would be reinforced by a cation- $\pi$  interaction performed by the triazole of **3** with Lys<sup>721</sup> and a  $\pi$ - $\pi$  interaction with Phe<sup>699</sup>, a residue that composes the glycine-rich nucleotide phosphate-binding loop [19]. Additionally, a hydrogen bond between the carbonyl oxygen of the compound and Lys<sup>721</sup> is also predicted (Fig. 15). Taken together, these observations are in agreement



**Fig. 12.** Effect of **3** or **Erlo** on double strand DNA breaks in H1650 (left panel) and H1975 (right panel) cells. Double strand DNA breaks was measured by staining cells with anti-pH2AX antibody (red color). Nuclei were counter-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue color). Scale bar: 10 μm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



![](_page_123_Figure_3.jpeg)

Fig. 13. The results of Annexin V / PI assay. Apoptosis was measured by flow cytometry in duplicates. Representative flow cytometry dot plots with double Annexin V-FITC/PI staining. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; \*rp < 0.001: drugs treated cells vs. respective untreated (Ctrl) cells; °°° p < 0.001: compound 3 treated cells vs. Erlo treated cells.

with the docking scores, which suggests **3** as the stronger EGFR inhibitor (92.9) than **Erlo** (74.5). Docking scores are dimensionless and were calculated using the GoldScore fitness function, which considers factors such as hydrogen bonds, van der Waals energies, metal interactions and ligand torsion strains [78].

#### 3. Conclusions

Synthesis and anticancer activity studies of five "click" ferrocenyl derivatives of erlotinib which is establish anti-lung cancer drug are described. Compounds were obtained with the copper-catalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition or with the ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction which gave an access to the 1,4- and 1,5-substituted isomers, respectively. Screening of anticancer activity studies of the ferrocenyl-erlotinib compounds was carried out against erlotinib-sensitive A549 and H1395 as well as erlotinib-resistant

H1975 and H1650 NSCLC cells. It suggests that anticancer activity is mainly dependent upon the length of the linker between the ferrocenyl and the triazole entity, whereas the 1,4- vs. 1,5-triazole substitution pattern is less important. Accordingly, two most active compounds 3 and **6** each has  $C(=O)CH_2CH_2$  linker and each shows higher activity against erlotinib-sensitive A549 and H1395 as well as erlotinib-resistant H1650 and H1975 cancer cells than erlotinib. In contrast compound 4 with short methylene linker was not active against erlotinib-susceptible and erlotinib-resistant cells. Noticeably compound 3 and 6 showed low activity against non-cancerous human bronchial epithelium BEAS-2B cells. Further biological studies carried out for the most active compound 3 in H1650 and H1975 cells revealed that its mechanism of action mainly relates to ROS induction in cancer cells. Increase in ROS concentration activates mitochondrial pathway of apoptosis what was substantiated by caspase-9 and -3 activation, mitochondrial transmembrane potential  $(\Delta \Psi_m)$  imbalance and DNA damage. Furthermore, biochemical

![](_page_124_Picture_2.jpeg)

Fig. 14. Superposition of the crystallographic pose of Erlo (carbon atoms in yellow) and the docked pose of compound 3 (carbon atoms in green). A shows the surface representation of the kinase domain of the EGFR (PDB ID 1 M17) whereas B shows only the 3-D poses of the compounds.

experiments have been augmented by *in silico* docking studies which provided geometrical details of the binding of the most active compound **3** in the active site of the EGFR TK. Calculations showed that even in the presence of the bulky ferrocenyl group, compound **3** binds to EGFR TK by adopting similar conformation as unmodified erlotinib molecule. The 1,4-triazole-linker-ferrocenyl portion of the molecule point away from the narrow occupied by the quinazolin portion active site. It occupies sterically more accessible space and is stabilized by a combination of hydrogen bonds,  $\pi$ - $\pi$  interactions and van der Waals contacts. It might be then speculated that the observed superior to erlotinib anticancer activity of **3** in all examined cancer cells arise as a combination of ROS induction and EGFR inhibition with the former mechanism being dominant over the latter.

#### 4. Experimental

#### 4.1. Chemical synthesis

All preparations were carried out using standard Schlenk techniques. Chromatographic separations were carried out using silica gel 60 (Merck, 230–400 mesh ASTM) and preparative TLC plates (Merck Silica gel 60). THF was distilled over Na/benzophenone prior to use. Other

solvents were of reagent grade and were used without prior purification. The NMR spectra were recorded on a Bruker AV600 Kryo (600 MHz) spectrometer. Chemical shifts  $\delta$  are reported in ppm using residual DMSO (<sup>1</sup>H  $\delta$  = 2.50 ppm and <sup>13</sup>C  $\delta$  = 39.5 ppm) and CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H  $\delta$  = 7.26 ppm and <sup>13</sup>C  $\delta$  = 77.1 ppm) as reference. Mass spectra were recorded using electrospray ionization MS method on a Synapt G2-Si mass spectrometer (Waters). High-resolution mass spectrometry (HRMS) measurements were performed using Synapt G2-Si mass spectrometer (Waters) equipped with an ESI source and quadrupole-Time-of-Flight mass analyzer. The mass spectrometer was operated in the positive and negative ion detection modes. The measurement was performed with capillary voltage set to 2.7 kV and sampling cone to 20 V. The source temperature was 110 °C. The results of the measurements were processed using the MassLynx 4.1 software (Waters) incorporated in the instrument. IR spectra were recorded on a FTIR Nexus Nicolet apparatus. Microanalyses were performed by the Analytical Services of the Polish Academy of the Sciences (Łódź).

#### 4.1.1. Procedure for synthesis of 1

Sodium azide (168 mg, 2.58 mmol, 2.0 equiv) was added to a stirred solution of 4-chlorobutanoylferrocene (300 mg, 1.28 mmol, 1.0 equiv) in dimethyl sulfoxide (3 mL). The resulted reaction mixture was stirred

![](_page_125_Figure_2.jpeg)

**Fig. 15.** Two-dimensional diagrams for the poses of ligand–EGFR interactions generated from 3-D models using PoseView [79]. **A) Erlo** and **B)** Compound **3.** Dashed black lines correspond to hydrogen bonds, green dashed lines to  $\pi$ - $\pi$  or cation- $\pi$  interactions and the solid green to hydrophobic interactions. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

at ambient temperature under argon for 24 h. Then 25 mL of water was added and subsequently the mixture was extracted with diethyl ether. After separation in a separation funnel, the organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered through a Schott funnel, and all volatile materials were evaporated (Caution: azides are potentially explosive) providing orange oily residue. The residue was subjected to column chromatography on SiO<sub>2</sub> (*n*-hexane/ethyl acetate 10:1 v/v). After evaporation of the eluent analytically pure compound 1 was obtained as orange oil in 47% (180 mg) yield.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 4.79 (pt,  $J_{H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4.51 (pt,  $J_{H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4.20 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 3.42 (t,  $J_{H,H}$  = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.83 (t,  $J_{H,H}$  = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.00 (q,  $J_{H,H}$  = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 203.2, 78.8, 72.4, 69.9, 69.3, 51.0, 36.1, 23.5 ppm. HRMS (ESI+): m/z = 297.0569 (M<sup>+</sup>) (calcd for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>OFe: 297.0565). FTIR (KBr  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>]): 3094, 3081, 2959, 2929, 2094, 1667, 1454, 1411, 1379, 1290, 1273, 1246, 1221, 1106, 1045, 825. Anal. Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>OFe: C, 56.59%; H, 5.09%; N, 14.14%. Found: C, 56.72%; H, 5.39%; N, 14.01%.

#### 4.1.2. Procedure for synthesis of 2

The 4-azidobutanoylferrocene 1 (76 mg, 0.25 mmol, 1.9 equiv), sodium ascorbate (20 mg, 0.10 mmol, 0.8 eq) and CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O (7 mg, 0.02 mmol, 0.2 eq) were added to a stirred solution of erlotinib (50 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq) in 2 mL of THF-H<sub>2</sub>O mixture (1/1 v/v). The resulted reaction mixture was stirred at ambient temperature for 3 h. Then H<sub>2</sub>O (25 mL) was added and mixture was extracted with dichloromethane (3 × 25 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, transferred to round bottom flask and all volatiles were evaporated under reduced pressure. After evaporation the remaining oil was subjected to column chromatography on SiO<sub>2</sub> (ethyl acetate/chloroform/methanol 30:7:2 v/v). Chromatographically purified **2** was crystallized from a mixture of chloroform/*n*-hexane to afford analytically pure sample as an orange crystalline solid in 82% (74 mg) yield.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 9.56 (s, 1H, N=CH-N quinazoline), 8.68 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 8.47 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 8.28 (s, 1H, NH), 7.92 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 7.89 (d, *J*<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.55 (d, *J*<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.45 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.22 (s, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 4.78 (bs, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4.56 (bs, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4.51 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.30 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4.21 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 3.79 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.75 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>),

2.83 (t,  $J_{\rm H,H}$  = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.21 (q,  $J_{\rm H,H}$  = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 202.3, 156.3, 153.5, 152.9, 148.0, 146.9, 146.4, 140.0, 131.1, 128.9, 121.7, 121.4, 120.2, 118.7, 108.9, 108.1, 103.1, 78.7, 72.1, 70.1, 70.0, 69.6, 69.0, 68.3, 68.0, 58.4, 58.3, 49.0, 35.2, 24.4 ppm. HRMS (ESI+): m/z = 691.2326 (M+H<sup>+</sup>) (calcd for C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Fe: 691.2331). FTIR (KBr  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>]): 3359, 3094, 2926, 1665, 1620, 1578, 1525, 1503, 1452, 1426, 1240, 1205, 1125, 923. Anal. Calcd for C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Fe: C, 62.61%; H, 5.55%; N, 12.17%. Found: C, 62.55%; H, 5.73%; N, 11.97%.

#### 4.1.3. Procedure for synthesis of 3

The 3-azidopropanoylferrocene **A** (120 mg, 0.42 mmol, 1.67 eq), sodium ascorbate (40 mg, 0.20 mmol, 0.8 eq) and CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O (13 mg, 0.05 mmol, 0.2 eq) were added to a stirred solution of erlotinib (100 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq) in 2 mL of THF-H<sub>2</sub>O mixture (1/1 v/v). The resulted reaction mixture was stirred at ambient temperature for 3 h. Then H<sub>2</sub>O (25 mL) was added and mixture was extracted with dichloromethane (3  $\times$  25 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, transferred to round bottom flask and all volatiles were evaporated under reduced pressure. After evaporation the remaining oil was subjected to column chromatography on SiO<sub>2</sub> (dichloromethane/methanol 15:1 v/v). Chromatographically purified **3** was crystallized from a mixture of dichloromethane/*n*-hexane to afford analytically pure sample as an orange crystalline solid in 77% (130 mg) yield.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 9.55$  (s, 1H, N=CH-N quinazoline), 8.63 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 8.47 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 8.24 (t,  $J_{H,H} = 2.4$  Hz, 1H, NH), 7.91 (s, 1.5H, CH Ar quinazoline and 0.5H C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.90 (m, 0.5H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.55 (dt, J<sub>H,H</sub> = 7.8 Hz, 1.2 Hz, 1H,  $C_6H_4$ ), 7.45 (t,  $J_{H,H} = 7.8$  Hz, 1H,  $C_6H_4$ ), 7.22 (s, 1H,  $C_6H_4$ ), 4.84 (pt,  $J_{H_4}$ )  $_{\rm H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4.75 (t,  $J_{\rm H,H}$  = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.59 (pt,  $J_{\rm H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4.29 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4.14 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 3.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.50 (t,  $J_{H,H} = 6.0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta =$ 200.2, 156.3, 153.5, 152.9, 148.0, 146.9, 146.1, 140.0, 131.0, 129.0, 122.0, 121.7, 120.2, 118.6, 108.9, 108.1, 103.2, 78.4, 72.4, 70.1, 70.0, 69.6, 69.1, 68.3, 68.0, 58.4, 58.3, 44.6, 38.6 ppm. HRMS (ESI+): *m/z* = 677.2179 (M+H<sup>+</sup>) (calcd for  $C_{35}H_{37}N_6O_5Fe$ : 677.2175). FTIR (KBr  $\nu$  $[cm^{-1}]$ : 3372, 3092, 2925, 2880, 2818, 1664, 1621, 1578, 1525, 1503, 1452, 1425, 1239, 1123, 922, 785. Anal. Calcd for C35H36N6O5Fe: C, 62.14%; H, 5.36%; N, 12.42%. Found: C, 62.09%; H, 5.41%; N, 12.40%.

#### 4.1.4. Procedure for synthesis of 4

The azidomethylferrocene **B** (120 mg, 0.50 mmol, 2 eq), sodium ascorbate (40 mg, 0.20 mmol, 0.8 eq) and CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O (13 mg, 0.05 mmol, 0.2 eq) were added to a stirred solution of erlotinib (100 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq) in 4 mL of THF-H<sub>2</sub>O mixture (1/1; v/v). The resulted reaction mixture was stirred at 60 °C for 4 h. Then H<sub>2</sub>O (25 mL) was added and mixture was extracted with chloroform (3 × 25 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, transferred to round bottom flask and all volatiles were evaporated under reduced pressure. After evaporation the remaining oil was subjected to column chromatography on SiO<sub>2</sub> (dichloromethane/methanol 10:1; v/v). Second chromatography on SiO<sub>2</sub> (ethyl acetate/chloroform/methanol 30:30:7 v/v/v) followed by crystallization from a mixture of dichloromethane/*n*-hexane afforded analytically pure **4** as a yellow crystalline solid in 46% (74 mg) yield.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 9.55$  (s, 1H, N=CH-N quinazoline), 8.58 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 8.46 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 8.22 (t,  $J_{\rm H,H} =$  2.4 Hz, 1H, NH), 7.91 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 7.88  $(dd, J_{H,H} = 7.8 \text{ Hz}, 1.2 \text{ Hz}, 1H, C_6H_4), 7.55 (dt, J_{H,H} = 7.8 \text{ Hz}, 1.2 \text{ Hz}, 1H,$  $C_6H_4$ ), 7.44 (t,  $J_{H,H} = 7.8$  Hz, 1H,  $C_6H_4$ ), 7.22 (s, 1H,  $C_6H_4$ ), 5.36 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.41 (pt, J<sub>H,H</sub> = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4.29 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4.21 (s, 5H,  $C_5H_5$ ), 4.20 (pt,  $J_{H,H} = 1.8$  Hz, 2H,  $C_5H_4$ ), 3.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 156.3$ , 153.5, 152.9, 148.0, 146.9, 146.3, 140.0, 131.0, 128.9, 121.7, 121.0, 120.3, 118.7, 108.9, 108.1, 103.1, 82.4, 70.1, 70.0, 68.7, 68.6, 68.4, 68.3, 68.0, 58.4, 58.3, 49.16 ppm. HRMS (ESI+): m/z = 635.2064 (M+H<sup>+</sup>) (calcd for C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Fe: 635.2069). FTIR (KBr ν [cm<sup>-1</sup>]): 3372, 3082, 2925, 2878, 2818, 1621, 1578, 1524, 1503, 1446, 1425, 1238, 1203, 1125, 923. Anal. Calcd for C33H34N6O4Fe: C, 62.47%; H, 5.40%; N, 13.24%. Found: C, 62.46%; H, 5.42%; N, 13.03%.

#### 4.1.5. Procedure for synthesis of 5

Ruthenium catalyst **C** (4 mg, 0.005 mmol, 0.02 equiv) was added to a stirred solution of 4-azidobutanoylferrocene **1** (151 mg, 0.50 mmol, 2.0 equiv) and erlotinib (100 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq) in 6 mL of 1,4-dioksan. The resulted reaction mixture was stirred at 60 °C for 24 h. Then 1,4-dioksane and all volatiles were evaporated under reduced pressure to afford oily residue. The residue was subjected to column chromatography on SiO<sub>2</sub> (chloroform/methanol 15:1 v/v). Second chromatography on SiO<sub>2</sub> (ethyl acetate/chloroform/methanol 30:7:2 v/v/v) followed by crystallization from a mixture of dichloromethane/*n*-hexane afforded analytically pure **5** as an orange crystalline solid in 50% (87 mg) yield.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 9.62$  (s, 1H, N=CH-N quinazoline), 8.51 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 8.15 (s, 1H, NH), 7.95 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 7.90 (d,  $J_{\rm H,H} =$  7.8 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.89 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 7.57 (t,  $J_{H,H} = 7.8$  Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.32 (d,  $J_{H,H} = 7.8$  Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.24 (s, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 4.67 (bs, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4.58 (t, J<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.48 (bs, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4.29 (t,  $J_{H,H}$  = 4.8 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 4.12 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 3.78 (t,  $J_{H,H}$  = 4.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.74 (t,  $J_{H,H}$  = 4.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.75 (t, J<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.09 (q,  $J_{H,H} = 6.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 202.2, 156.2, 153.7, 152.8, 148.1, 147.0, 140.1, 137.3,$ 132.7, 129.3, 126.8, 123.1, 122.5, 121.7, 109.0, 108.2, 103.2, 78.6, 72.0, 70.1, 70.0, 69.5, 68.9, 68.4, 68.0, 58.4, 58.3, 47.5, 35.4, 24.2 ppm. HRMS (ESI+): m/z = 691.2320 (M+H<sup>+</sup>) (calcd for C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Fe: 691.2331). FTIR (KBr ν [cm<sup>-1</sup>]): 3308, 2926, 1667, 1621, 1578, 1524, 1504, 1452, 1434, 1422, 1244, 1125, 1028, 923, 825. Anal. Calcd for C36H38N6O5Fe: C, 62.61%; H, 5.55%; N, 12.17%. Found: C, 62.57%; H, 5.66%; N, 11.94%.

#### 4.1.6. Procedure for synthesis of 6

The 3-azidopropanoylferrocene A (114 mg, 0.40 mmol, 2 eq) and ruthenium catalyst C (3 mg, 0.004 mmol, 0.02 eq) were added to a stirred solution of erlotinib (80 mg, 0.20 mmol, 1 eq) in 6 mL of 1,4-dioxane. The resulted reaction mixture was stirred at 60  $^{\circ}$ C for 24 h.

Then all volatiles were evaporated under reduced pressure. After evaporation the remaining oil was subjected to column chromatography on SiO<sub>2</sub> (chloroform/methanol; 15:1 v/v) which afforded **2** as orange oil. Second chromatography on SiO<sub>2</sub> (ethyl acetate/chloroform/methanol; 30:7:2 v/v/v) followed by crystallization from a mixture of dichloromethane/*n*-hexane afforded analytically pure **2** as an orange crystalline solid in 46% (64 mg) yield.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 9.64$  (s, 1H, N=CH-N quinazoline), 8.48 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 8.17 (t,  $J_{H,H} = 2.4$  Hz, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, H 1,2,3-triazol), 7.90 (bs, 0.5H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.88 (s, 1.5H, CH Ar quinazoline and 0.5H  $C_6H_4$ ), 7.59 (t,  $J_{H,H} =$  7.8 Hz, 1H,  $C_6H_4$ ), 7.39 (dt,  $J_{\rm H,H} = 7.8$  Hz, 1.2 Hz, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.23 (s, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 4.76 (pt,  $J_{\rm H,H} = 1.8$ Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4.75 (t,  $J_{\rm H,H}$  = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.54 (pt,  $J_{\rm H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>), 4.29 (pq,  $J_{H,H}$  = 4.2 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 4.14 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 3.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.50 (t,  $J_{H,H} = 6.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 200.1, 156.1, 153.6, 152.8, 148.0, 147.0, 140.0, 137.6,$ 132.6, 129.2, 126.9, 123.4, 122.6, 122.1, 108.9, 108.2, 103.2, 78.2, 72.2, 70.1, 70.0, 69.6, 68.9, 68.3, 68.0, 58.3, 58.3, 43.1, 38.1 ppm. HRMS (ESI+): m/z = 677.2186 (M+H<sup>+</sup>) (calcd for C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Fe: 677.2175). FTIR (KBr  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>]): 3089, 2925, 1667, 1621, 1578, 1522, 1504, 1455, 1436, 1423, 1386, 1238, 1125. Anal. Calcd for C35H36N6O5Fe: C, 62.14%; H, 5.36%; N, 12.42%. Found: C, 61.11%; H, 5.65%; N, 12.11%.

#### 4.2. Biological studies

#### 4.2.1. Cells

Human non-small cell lung cancer cell lines A549, H1395, H1650, H1975, BEAS-2B cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). Cells were grown in RPMI-1640 media containing 10% v/v fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin and were maintained in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.2. Anticancer activity evaluation with WST-1 assays

The colorimetric WST-1 based assay was purchased from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). The assay was carried out as per manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in a 96-well plate, 5.000 cells/well, and were then exposed to different concentrations of the test compounds. After 24 h, 48 h or 72 h medium was replaced with fresh medium containing 1:10 dilution of WST-1 reagent. Absorbance was measured after 1 h at 404 nm, with a reference wavelength at 636 nm. In preliminary dose-response experiments, cells were incubated 48 h with increasing concentrations (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M and 500  $\mu$ M) of erlotinib or compound 2-6, alone or in the presence of 50 µM NAC. The stock solutions of 20 mM erlotinib and 20 mM compounds were dissolved in DMSO. The relative absorbance of untreated cells was considered as 100% viability; results were expressed as a percentage of viable cells vs. untreated cells. IC50 were defined as the concentrations of each compound that reduced cells viability to 50% compared to untreated cells, producing 50% cell death, respectively (GraphPad Prism, version 5).

#### 4.2.3. Reactive oxygen species (ROS) generation

Cells were grown for 1 h in a fresh medium or in medium containing 20  $\mu$ M of **Erlo** or compound **2–6**, with or without 50  $\mu$ M NAC. Then cells were detached from dishes and re-suspended in 0.5 mL PBS, incubated for 15 min at 37 °C with 10  $\mu$ M/L of the fluorescent probe 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate-acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA), centrifuged at 13,000 rpm at 37 °C for 30 s and re-suspended in 0.5 mL PBS. The fluorescence of each sample, considered an index of ROS levels, was read at 488 nm ( $\lambda$  excitation) and 520 nm ( $\lambda$  emission). The results were expressed as relative DCF fluorescence /mg cell proteins versus ctrl.

#### 4.2.4. Changes in mitochondrial transmembrane potential

Cells were grown for 48 h in a fresh medium or in medium containing 20  $\mu$ M of **Erlo** or compound **3**. Then cells were detached and washed twice with fresh PBS. Next 1  $\times$  10<sup>6</sup> cells were re-suspended in 0.5 mL PBS and incubated for 30 min at 37 °C with 2  $\mu$ mol/L of the fluorescent probe JC-1 (Biotium Inc., Hayward, CA), then centrifuged at 13,000  $\times$  g for 5 min and re-suspended in 0.5 mL PBS. The fluorescence of each sample was read using a Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek): the red fluorescence, index of polarized mitochondria, was read at 550 nm ( $\lambda$  excitation) and 600 nm ( $\lambda$  emission); the green fluorescence at 485 nm ( $\lambda$  excitation) and 535 nm ( $\lambda$  emission). The fluorescence units were used to calculate the percentage of green fluorescent versus red-fluorescent mitochondria.

#### 4.2.5. Caspase-3 and -9 activation assay

Cells were grown for 48 h h in a fresh medium or in medium containing 20 µM of Erlo or compound 3. Then cells were lysed in 0.5 mL of caspase lysis buffer (20 mM Hepes/KOH, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA 1, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, and 10 µg/mL leupeptin, pH 7.5). The 20 µg of cell lysates was incubated for 1 h at 37 °C with 20 µmol/L of the fluorescent substrate of caspase-9 Ac-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (LEHD-AMC) or of caspase-3 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (DEVD-AMC), in 0.25 mL of caspase assay buffer (25 mM Hepes, 0.1% w/v 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 10% w/v sucrose, 10 mM DTT, 0.01% w/v egg albumin, pH 7.5). The reaction was stopped by adding 0.75 mL of ice-cold 0.1% w/v trichloroacetic acid.) The fluorescence of each sample was read using a Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek), was read at 488 nm ( $\lambda$  excitation) and 520 nm ( $\lambda$  emission). Fluorescence was converted in nmol/mg cell proteins, using a calibration curve prepared previously with standard solutions of AMC.

#### 4.2.6. Cell cycle analysis

Cells were grown for 48 h in a fresh medium or in medium containing 20  $\mu$ M of **Erlo** or compound **3**. Then cells were detached and washed twice with fresh PBS, incubated in 0.5 mL ice-cold ethanol 70% v/v for 15 min, then centrifuged at 13000 rpm for 5 min at 4 °C and rinsed with 0.3 mL of citrate buffer (50 mM Na2HPO4, 25 mM sodium citrate, 1% v/v Triton X-100), containing 1  $\mu$ g/mL propidium iodide and 1  $\mu$ g/mL RNAse. After 15 min incubation in the dark, the intracellular fluorescence was detected by flow cytometry. For each analysis, 20.000 events and the cell-cycle distribution G0/G1, S, and G2/M were collected and analyzed by Guava®easyCyte flow cytometer (Millipore, Billerica, MA, USA), equipped with the InCyte software (Millipore).

#### 4.2.7. DNA damage assay

H1975 and H1650 cells were seeded overnight onto glass coverslips and then cells were grown for 48 h in a fresh medium or in medium containing 20  $\mu$ M of **Erlo** or compound **3**. Then cells were washed with PBS and fixed using 4% w/v paraformaldehyde for 15 min at room temperature, permeabilizated with 0.1% v/v Triton X-100 in PBS and then washed 3x with PBS. Samples were incubated over night at 4 °C with anti-gamma H2AX antibody (Abcam; diluted 1:100 in 1% FBS/PBS). PBS was used to wash the samples five times; samples were then incubated for 1 h at room temperature with an Alexa Fluor® 553-conjugated secondary antibody (diluted 1:100 in 1% FBS/PBS; Abcam). Then the cells were mounted with DAPI mount (Sigma). The samples were examined with a Leica DC100 fluorescence microscope, ocular 10x, objective 100x.

#### 4.2.8. Annexin V assay

Cells were grown for 48 h in a fresh medium (Ctrl) or in medium containing 20  $\mu M$  of Erlo or compound 3. Then cells were detached and washed twice with fresh PBS then apoptosis assay was performed using

Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche) according to manufacturer's instruction. For each analysis, 10.000 events and were collected and samples were analyzed with a FACS-Calibur flow cytometer (Becton Dickinson). The results were expressed as % of positive cells, calculated with the Cell Quest software (Becton Dickinson).

#### 4.2.9. Statistical analysis

All data in the text and figures are provided as means  $\pm$  SD. The results were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, using GraphPad Prism, version 5. p < 0.05 was considered significant.

#### 4.3. Docking studies

The tridimensional structures of the ligands were drawn in Discovery Studio Visualizer [80] by adding the proper substituents to the ferrocene moiety of the crystallographic structure of *S*-[*N*-(ferrocenylmethyl)carbamoylmethyl]-glutathione (PDB ID 5L6X). The geometries of the compounds were then refined by energy minimization using the Merck Molecular Force Field [81], while keeping the geometry of the ferrocene subunit constrained.

As the structure of the tyrosine kinase domain of the Epidermal Growth Factor Receptor complexed with erlotinib (PDB ID 1 M17) is only available with a resolution of 2.60 Å [19], this crystallographic model is prone to display some missing amino acid sidechains [82]. Consequently, we used the Dock Prep module of the UCFS Chimera [83] to complete these sidechains using the Dunbrack's rotamer library [84], to assign the proper charges to the amino acid residues, among some other minor tasks.

Molecular docking simulations were performed using the GOLD software, which was developed by the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) in association with the University of Sheffield (Sheffield, UK) and the GlaxoSmithKline (London, UK) [85]. The settings were the same as we have previously reported, alongside with the supporting theory for the method [86], except for the use of a 15 Å radius for the docking sphere and 100 runs for the genetic algorithm. The best 10 poses for each compound were visually inspected and the most probable binding mode for the ferrocene-based compounds ascribed based both on the docking scores and on their relative position to the crystallographic ligand yielded a Root-Mean-Square Deviation (RMSD) of heavy atoms of 1.31 Å.

#### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

K.K. thanks the National Science Center in Cracow, Poland (grant OPUS UMO-2018/29/B/ST5/00055) for financial support. The research plan has received funding from the Italian Association of Cancer Research (IG21408 project to CR); Intramural Grant Funding 2019 (JK).

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105514.

#### References

- [1] National Cancer Institute: https://www.cancer.gov/types/common-cancers.
- [2] S.V. Sharma, D.W. Bell, J. Settleman, D.A. Haber, Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, Nat. Rev. Cancer 7 (3) (2007) 169–181, https://doi.org/ 10.1038/nrc2088.

- [3] L.H. Einhorn, W.H. Fee, M.O. Farber, R.B. Livingston, J.A. Gottlieb, Improved Chemotherapy for Small-Cell Undifferentiated Lung Cancer, JAMA. 235 (1976) 1225–1229, https://doi.org/10.1001/jama.1976.03260380019019.
- [4] C. Boni, G. Cocconi, G. Bisagni, G. Ceci, G. Peracchia, Cisplatin and etoposide (VP-16) as a single regimen for small cell lung cancer A phase II trial, Cancer 63 (1989) 638–642, https://doi.org/10.1002/1097-0142(19890215)63:4<638::AID-CNCR2820630406>3.0.CO;2-8.
- J.S. Sierocki, B.S. Hilaris, S. Hopfan, N. Martini, D. Barton, R.B. Golbey, R. B. Wittes, cis-Dichlorodiammineplatinum(II) and VP-16-213: an active induction regimen for small cell carcinoma of the lung, Canc. Treat. Rep. 63 (1979) 1593–1597. PMID: 227598.
- [6] N. Murray, A.T. Turrisi, A review of first-line treatment for small-cell lung cancer, J. Thorac. Oncol. 1 (3) (2006) 270–278, https://doi.org/10.1016/S1556-0864(15) 31579-3.
- [7] A. Clegg, D.A. Scott, P. Hewitson, M. Sidhu, N. Waugh, Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: a systematic review, Thorax 57 (2002) 20–28, https://doi.org/ 10.1136/thorax.57.1.20.
- [8] A.D. Fuld, K.H. Dragnev, J.R. Rigas, Pemetrexed in advanced non-small-cell lung cancer, Exp. Opin. Pharmacotherapy 11 (8) (2010) 1387–1402, https://doi.org/ 10.1517/14656566.2010.482560.
- [9] P. Comella, G. Frasci, N. Panza, L. Manzione, V. Lorusso, G. Di Rienzo, R. Cioffi, G. De Cataldis, L. Maiorino, D. Bilancia, G. Nicolella, M. Natale, F. Carpagnano, C. Pacilio, M. De Lena, A. Bianco, G. Comella, Cisplatin, gemcitabine, and vinorelbine combination therapy in advanced non-small-cell lung cancer: a phase II randomized study of the Southern Italy Cooperative Oncology Group, J. Clin. Oncol. 17 (1999) 1526–1534, https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.5.1526.
- [10] P. Comella, G. Frasci, N. Panza, L. Manzione, G. De Cataldis, R. Cioffi, L. Maiorino, E. Micillo, V. Lorusso, G. Di Rienzo, G. Filippelli, A. Lamberti, M. Natale, D. Bilancia, G. Nicolella, A. Di Nota, G. Comella, Randomized Trial Comparing Cisplatin, Gemcitabine, and Vinorelbine With Either Cisplatin and Gemcitabine or Cisplatin and Vinorelbine in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer: Interim Analysis of a Phase III Trial of the Southern Italy Cooperative Oncology Group, J. Clin. Oncol. 18 (2000) 1451–1457, https://doi.org/10.1200/ JCO.2000.18.7.1451.
- [11] D.S. Krause, R.A. Van Etten, Tyrosine kinases as targets for cancer therapy, N. Engl. J. Med. 353 (2) (2005) 172–187, https://doi.org/10.1056/NEJMra044389.
- [12] N.E. Hynes, H.A. Lane, Nat. Rev. Cancer 37 (suppl. 4) (2001) S9-S15.
- [13] F.R. Hirsch, M. Varella-Garcia, P.A. Bunn Jr, M.V. Di Maria, R. Veve, R. M. Bremnes, A.E. Barón, C. Zeng, W.A. Franklin, Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis, J. Clin. Oncol. 21 (2003) 3798–3807, https://doi.org/10.1200/JCO.2003.11.069.
- [14] A.C. Backes, B. Zech, B. Felber, B. Klebl, G. Müller, Small-molecule inhibitors binding to protein kinases. Part I: exceptions from the traditional pharmacophore approach of type I inhibition, Expert Opin. Drug Discov. 3 (2008) 1409–1425, https://doi.org/10.1517/17460440802579975.
- [15] F. Zuccotto, E. Ardini, E. Casale, M. Angiolini, Through the "gatekeeper door": exploiting the active kinase conformation, J. Med. Chem. 53 (2010) 2681–2694, https://doi.org/10.1021/jm901443h.
- [16] V.G. Pawar, M.L. Sos, H.B. Rode, M. Rabiller, S. Heynck, W.A.L. van Otterlo, R. K. Thomas, D. Rauh, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Anilinoquinolines as Potent Inhibitors of Epidermal Growth Factor Receptor, J. Med. Chem. 53 (7) (2010) 2892–2901, https://doi.org/10.1021/jm901877j.
- [17] M. Couto, I. Mastandrea, M. Cabrera, P. Cabral, F. Teixidor, H. Cerecetto, C. Viñas, Small-Molecule Kinase-Inhibitors-Loaded Boron Cluster as Hybrid Agents for Glioma-Cell-Targeting Therapy, Chem. Eur. J. 23 (39) (2017) 9233–9238, https:// doi.org/10.1002/chem.201701965.
- [18] W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris, H. Varmus, EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 101 (36) (2004) 13306–13311, https://doi.org/10.1073/ pnas.0405220101.
- [19] J. Stamos, M.X. Sliwkowski, C. Eigenbrot, Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor, J. Biol. Chem. 277 (2002) 46265–46272, https://doi.org/10.1074/jbc. M207135200.
- [20] W. Pao, V.A. Miller, K.A. Politi, G.J. Riely, R. Somwar, M.F. Zakowski, M.G. Kris, H. Varmus, Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain, PloS Medicine 2 (2005), e73, https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020073.
- [21] F.M. Muggia, A. Bonetti, J.D. Hoeschele, M. Rozencweig, S.B. Howell, Platinum Antitumor Complexes: 50 Years Since Barnett Rosenberg's Discovery, J. Clin. Oncol. 33 (2015) 4219–4226, https://doi.org/10.1200/JCO.2015.60.7481.
- [22] Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine (Ed.: G. Jaouen), Wiley-VCH: Weinheim, 2005, 10.1002/3527607692.
- [23] T.C. Johnstone, K. Suntharalingam, S.J. Lippard, The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs, Chem. Rev. 116 (2016) 3436–3486, https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597.
- [24] B. Englinger, C. Pirker, P. Heffeter, A. Terenzi, C.R. Kowol, B.K. Keppler, W. Berger, Metal Drugs and the Anticancer Immune Response, Chem. Rev. 119 (2) (2019) 1519–1624, https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00396.
- [25] S. Monro, K.L. Colón, H. Yin, J. Roque III, P. Konda, S. Gujar, R.P. Thummel, L. Lilge, C.G. Cameron, S.A. McFarland, Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges,

Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433, Chem. Rev. 119 (2019) 797–828, https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00211.

- [26] X. Wang, X. Wang, S. Jin, N. Muhammad, Z. Guo, Stimuli-Responsive Therapeutic Metallodrugs, Chem. Rev. 119 (2) (2019) 1138–1192, https://doi.org/10.1021/ acs.chemrev.8b00209.
- [27] K.D. Mjos, C. Orvig, Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry, Chem. Rev. 114 (8) (2014) 4540–4563, https://doi.org/10.1021/cr400460s.
- [28] M. Fanelli, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni, P. Paoli, New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents, Coord. Chem. Rev. 310 (2016) 41–79, https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.11.004.
- [29] A. Gautier, F. Cisnetti, Advances in metal-carbene complexes as potent anti-cancer agents, Metallomics 4 (1) (2012) 23–32, https://doi.org/10.1039/C1MT00123J.
- [30] E. Alessio, Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective, Eur. J. Inorg. Chem. 2016 (2017) 1549–1560, https://doi.org/10.1002/ejic.201600986.
- [31] A. Merlino, Interactions between proteins and Ru compounds of medicinal interest: A structural perspective, Coord. Chem. Rev. 326 (2016) 111–134, https://doi.org/ 10.1016/j.ccr.2016.08.001.
- [32] I. Ott, On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs, Coord. Chem. Rev. 253 (11-12) (2009) 1670–1681, https://doi.org/10.1016/j. ccr.2009.02.019.
- [33] M. Wenzel, A. Casini, Mass spectrometry as a powerful tool to study therapeutic metallodrugs speciation mechanisms: Current frontiers and perspectives, Coord. Chem. Rev. 352 (2017) 432–460, https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.02.012.
- [34] G. Palermo, A. Magistrato, T. Riedel, T. von Erlach, C.A. Davey, P.J. Dyson, U. Rothlisberger, Fighting Cancer with Transition Metal Complexes: From Naked DNA to Protein and Chromatin Targeting Strategies, ChemMedChem 11 (2015) 1199–1210, https://doi.org/10.1002/cmdc.201500478.
- [35] S. Sansook, S. Hassell-Hart, C. Ocasio, J. Spencer, Ferrocenes in medicinal chemistry; a personal perspective, J. Organomet. Chem. 905 (2020), 121017, https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2019.121017.
- [36] K. Kowalski, Insight into the Biological Activity of Organometallic Acetylsalicylic Acid (Aspirin) Derivatives, ChemPlusChem 84 (4) (2019) 403–415, https://doi. org/10.1002/cplu.201900086.
- [37] A. Vessières, Y. Wang, M.J. McGlinchey, G. Jaouen, Multifaceted chemical behaviour of metallocene (M = Fe, Os) quinone methides. Their contribution to biology, Coord. Chem. Rev. 430 (2021) 213658, https://doi.org/10.1016/j.ccr.20 20.213658.
- [38] B. Albada, N. Metzler-Nolte, Organometallic-Peptide Bioconjugates: Synthetic Strategies and Medicinal Applications, Chem. Rev. 116 (2016) 11797–11839, https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00166.
- [39] G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, Organometallic anticancer compounds, J. Med. Chem. 54 (1) (2011) 3–25, https://doi.org/10.1021/jm100020w.
- [40] K. Kowalski, Recent developments in the chemistry of ferrocenyl secondary natural product conjugates, Coord. Chem. Rev. 366 (2018) 91–108, https://doi.org/ 10.1016/j.ccr.2018.04.008.
- [41] K. Kowalski, Organometallic nucleosides—Synthesis, transformations, and applications, Coord. Chem. Rev. 432 (2021) 213705, https://doi.org/10.1016/j. ccr.2020.213705.
- [42] K. Kowalski, Ferrocenyl-nucleobase complexes: Synthesis, chemistry and applications, Coord. Chem. Rev. 317 (2016) 132–156, https://doi.org/10.1016/j. ccr.2016.02.008.
- [43] M. Pataya, G. Gasser, The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives, Nat. Rev. Chem. 1 (2017) 0066, https://doi.org/10.1038/s41570-017-0066.
- [44] C. Ornelas, Application of ferrocene and its derivatives in cancer research, New. J. Chem. 35 (2011) 1973–1985, https://doi.org/10.1039/C1NJ20172G.
- [45] N. Metzler-Nolte, M. Salmain, Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules (Ed.: P. Stepnička), John Willey & Sons, Chichester, UK, 2008 13 499-639, https ://www.wiley.com/en-us/Ferrocenes%3A+Ligands%2C+Materials+and+Biomo lecules-p-9780470035856.
- [46] G. Jaouen, A. Vessières, S. Top, Ferrocifen type anti cancer drugs, Chem. Soc. Rev. 44 (24) (2015) 8802–8817, https://doi.org/10.1039/C5CS00486A.
- [47] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, Angew. Chem. Int. Ed. 40 (2001) 2004–2021, https:// doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11
- [48] C.W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides, J. Org. Chem. 67 (2002) 3057–3064, https://doi.org/ 10.1021/jo011148].
- [49] C. Spiteri, J.E. Moses, Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: Regioselective Synthesis of 1,4,5-Trisubstituted 1,2,3-Triazoles, Angew. Chem. Int. Ed. 49 (2009) 31–33, https://doi.org/10.1002/anie.200905322.
- [50] J.R. Johansson, T. Beke-Somfai, A.S. Stålsmeden, N. Kann, Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction: Scope, Mechanism, and Applications, Chem. Rev. 116 (2016) 14726–14768, https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00466.
- [51] F. Amblard, J.H. Cho, R.F. Schinazi, Cu(I)-catalyzed Huisgen azide-alkyne 1,3dipolar cycloaddition reaction in nucleoside, nucleotide, and oligonucleotide chemistry, Chem. Rev. 109 (9) (2009) 4207–4220, https://doi.org/10.1021/ cr9001462.
- [52] N.Z. Fantoni, A.H. El-Sagheer, T. Brown, A Hitchhiker's Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids, Chem. Rev. 121 (12) (2021) 7122–7154, https://doi.org/ 10.1021/acs.chemrev.0c00928.
- [53] V.K. Tiwari, B.B. Mishra, K.B. Mishra, N. Mishra, A.S. Singh, X.i. Chen, Cu-Catalyzed Click Reaction in Carbohydrate Chemistry, Chem. Rev. 116 (5) (2016) 3086–3240, https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00408.

- [54] K. Kacprzak, I. Skiera, M. Piasecka, Z. Paryzek, Alkaloids and Isoprenoids Modification by Copper(I)-Catalyzed Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition (Click Chemistry): Toward New Functions and Molecular Architectures, Chem. Rev. 116 (2016) 5689–5743, https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00302.
- [55] J.F.B. Barata, M.G.P.M.S. Neves, M.A.F. Faustino, A.C. Tomé, J.A.S. Cavaleiro, Strategies for Corrole Functionalization, Chem. Rev. 117 (4) (2017) 3192–3253, https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00476.
- [56] S. Mavila, O.r. Eivgi, I. Berkovich, N.G. Lemcoff, Intramolecular Cross-Linking Methodologies for the Synthesis of Polymer Nanoparticles, Chem. Rev. 116 (3) (2016) 878–961, https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00290.
- [57] C.J. Pickens, S.N. Johnson, M.M. Pressnall, M.A. Leon, C.J. Berkland, Practical Considerations, Challenges, and Limitations of Bioconjugation via Azide-Alkyne Cycloaddition, Bioconjug. Chem. 29 (2018) 686–701, https://doi.org/10.1021/ acs.bioconjchem.7b00633.
- [58] J.E. Moses, A.D. Moorhouse, The growing applications of click chemistry, Chem. Soc. Rev. 36 (8) (2007) 1249–1262, https://doi.org/10.1039/B613014N.
- [59] V. Bevilacqua, M. King, M. Chaumontet, M. Nothisen, S. Gabillet, D. Buisson, C. Puente, A. Wagner, F. Taran, Copper-chelating azides for efficient click conjugation reactions in complex media, Angew. Chem. Int. Ed. 53 (23) (2014) 5872–5876, https://doi.org/10.1002/anie.201310671.
- [60] M. Couto, M.F. García, C. Alamón, M. Cabrera, P. Cabral, A. Merlino, F. Teixidor, H. Cerecetto, C. Viñas, Discovery of Potent EGFR Inhibitors through the Incorporation of a 3D-Aromatic-Boron-Rich-Cluster into the 4-Anilinoquinazoline Scaffold: PotentialDrugs for Glioma Treatment, Chem. Eur. J. 24 (2017) 3122–3126, https://doi.org/10.1002/chem.201705181.
- [61] E. Ortega, A. Zamora, U. Basu, P. Lippmann, V. Rodríguez, C. Janiak, I. Ott, J. Ruiz, An Erlotinib gold(I) conjugate for combating triple-negative breast cancer, J. Inorg. Biochem. 203 (2020), 110910, https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110910.
- [62] L.V. Pavlogradskaya, D.A. Shemyakina, D.V. Eroshenko, I.A. Borisova, V. A. Glushkov, Synthesis of Di- and Triterpenoid Ferrocenyltriazoles, Rus. J. Org. Chem. 54 (1) (2018) 126–130, https://doi.org/10.1134/S1070428018010128.
- [63] J. Casas-Solvas, E. Ortiz-Salmerón, J. Giménez-Martínez, L. García-Fuentes, LuísF. Capitán-Vallvey, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, Ferrocene-Carbohydrate Conjugates as Electrochemical Probes for Molecular Recognition Studies, Chem. Eur. J. 15 (3) (2009) 710–725, https://doi.org/10.1002/ chem.200800927.
- [64] B.C. Boren, S. Narayan, L.K. Rasmussen, L.i. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, Ruthenium-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism, J. Am. Chem. Soc. 130 (28) (2008) 8923–8930, https://doi.org/ 10.1021/ja0749993.
- [65] C. Lu, J.-M. Heldt, M. Guille-Collignon, F. Lemaître, G. Jaouen, A. Vessières, C. Amatore, Quantitative Analyses of ROS and RNS Production in Breast Cancer Cell Lines Incubated with Ferrocifens, ChemMedChem 9 (6) (2014) 1286–1293, https://doi.org/10.1002/cmdc.201402016.
- [66] K. Kowalski, P. Hikisz, Ł. Szczupak, B. Therrien, A. Koceva-Chyla, Ferrocenyl and dicobalt hexacarbonyl chromones – New organometallics inducing oxidative stress and arresting human cancer cells in G2/M phase, Eur. J. Med. Chem. 81 (2014) 289–300, https://doi.org/10.1016/j.eimech.2014.05.023.
- 289–300, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.023.
  [67] C. Kerksick, D. Willoughby, The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress, J. Int. Soc. Sports Nutr. 2 (2005) 38–44, https://doi.org/10.1186/1550-2783-2-2-38.
- [68] A. Koceva-Chyla, K. Matczak, P. Hikisz, K. Durka, K. Kochel, G. Süss-Fink, J. Furrer, K. Kowalski, Insights into the in vitro Anticancer Effects of Diruthenium-1, ChemMedChem 11 (2016) 2171–2187, https://doi.org/10.1002/ cmdc.201600315.
- [69] S. Salvioli, A. Ardizzoni, C. Franceschi, A. Cossarizza, JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact

cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis, FEBS Lett. 411 (1997) 77-82, https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00669-8.

- [70] B.B. Wolf, M. Schuler, F. Echeverri, D.R. Green, Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation, J. Biol. Chem. 274 (43) (1999) 30651–30656, https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30651.
- [71] P. Hikisz, Ł. Szczupak, A. Koceva-Chyła, A. Guśpiel, L. Oehninger, I. Ott, B. Therrien, J. Solecka, K. Kowalski, Anticancer and Antibacterial Activity Studies of Gold(I)-Alkynyl Chromones, Molecules 20 (2015) 19699–19718, https://doi. org/10.3390/molecules201119647.
- [72] N. Sarin, F. Engel, G.V. Kalayda, M. Mannewitz, J. Cinatl Jr, F. Rothweiler, M. Michaelis, H. Saafan, C.A. Ritter, U. Jaehde, R. Frötschl, Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatininduced G 2 / M cell cycle arrest, PLoS One 12 (2017), e0181081, https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0181081.
- [73] J.H. Doroshow, R.S. Esworthy, F. Chu, Control of doxorubicin-induced, reactive oxygen-related apoptosis by glutathione peroxidase 1 in cardiac fibroblasts, Biochem. Biophys. Rep. 21 (2020), 100709, https://doi.org/10.1016/j. bbrep.2019.100709.
- [74] A. Nagelkerke, P.N. Span, Staining Against Phospho-H2AX (γ-H2AX) as a Marker for DNA Damage and Genomic Instability in Cancer Tissues and Cells, Adv. Exp. Med. Biol. 899 (2016) 1–10, https://doi.org/10.1007/978-3-319-26666-4\_1.
- [75] R. Norel, D. Petrey, H.J. Wolfson, R. Nussinov, Examination of shape complementarity in docking of unbound proteins, Proteins 36 (3) (1999) 307–317. PMID: 10409824.
- [76] W. Zhou, H. Yan, Q. Hao, Analysis of surface structures of hydrogen bonding in protein–ligand interactions using the alpha shape model, Chem. Phys. Lett. 545 (2012) 125–131, https://doi.org/10.1016/j.cplett.2012.07.016.
- [77] E.M. Lewandowski, Ł. Szczupak, S. Wong, J. Skiba, A. Guśpiel, J. Solecka, V. Vrček, K. Kowalski, Y. Chen, Antibacterial properties of metallocenyl-7-ADCA derivatives structure in complex with CTX-M β-lactamase, Organometallics 36 (2017) 1673–1676, https://doi.org/10.1021/acs.organomet.6b00888.
- [78] M.L. Verdonk, J.C. Cole, M.J. Hartshorn, C.W. Murray, R.D. Taylor, Improved protein-ligand docking using GOLD, Proteins 52 (2003) 609–623, https://doi.org/ 10.1002/prot.10465.
- [79] K. Stierand, M. Rarey, PoseView molecular interaction patterns at a glance, J. Cheminformatics 2 (2010) P50, https://doi.org/10.1186/1758-2946-2-S1-P50.
- [80] BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer, Release 2016. San Diego, CA, USA, 2016.
- [81] T.A. Halgren, Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. J. Comput. Chem. 17 (1996) 490–519. 10.1002/ (SICI)1096-987X(199604)17:5/6%3C490::AID-JCC1%3E3.0.CO;2-P.
- [82] D.M. Blow, Outline of crystallography for biologists, Oxford University Press, New York, 2002.
- [83] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1605–1612, https://doi.org/10.1002/ jcc.20084.
- [84] M.V. Shapovalov, R.L. Dunbrack Jr., A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions, Structure 19 (2011) 844–858, https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.019.
- [85] D.C. Young, Computational drug design: a guide for computational and medicinal chemists, John Wiley & Sons, Oxford, 2009.
- [86] X.A. Oliveira Neto, A.C.S. Alves, R.A. Dias Junior, R.P. Rodrigues, M. Lancellotti, W.P. Almeida, D.F. Kawano, Molecular docking reveals the binding modes of anticancer alkylphospholipids and lysophosphatidylcholine within the catalytic domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT), Eur. J. Lipid Sci. Technol. 122 (2020) 1900422, https://doi.org/10.1002/ejlt.201900422.

## Publikacja P2

P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski

"Electronic Coupling in 1,2,3-Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells"

Inorganic Chemistry, 2022, 61, 9650 – 9666

Impact factor (IF) = 4,60

# Electronic Coupling in 1,2,3-Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells

Przemysław Biegański, Eduard Kovalski, Noel Israel, Evgenia Dmitrieva, Damian Trzybiński, Krzysztof Woźniak, Valerije Vrček, Martina Godel, Chiara Riganti, Joanna Kopecka, Heinrich Lang, and Konrad Kowalski\*

![](_page_131_Figure_5.jpeg)

linked to the common 1,2,3-triazole core. Thus, two series of complexes were obtained, which pertain to derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) and 3-azidopropionylferrocene, respectively. Based on the experimental and theoretical data, the two mono-oxidized species corresponding to binuclear AZT and trinuclear 3-azidopropionylferrocene complexes have been categorized as class II mixed-valence according to the classification proposed by Robin and Day. Of importance is the observation that these two compounds are more active against human A549 and H1975 non-small-cell lung cancer cells than their congeners, which do not show MV characteristics. Moreover, the anticancer activity of MV species competes or surpasses, dependent on the cell line, the activity of reference anticancer drugs such as cisplatin, tamoxifen, and 5-fluorouracil. The most active from the entire series of compounds was the binuclear thymidine derivative with the lowest IC<sub>50</sub> value of  $5 \pm 2 \mu$ M against lung H1975 cancer cells. The major mechanism of antiproliferative activity for the investigated MV compounds is based on reactive oxygen species generation in cancer cells. This hypothesis was substantiated by EPR spintrapping experiments and the observation of decreased anticancer activity in the presence of *N*-acetyl cysteine (NAC) free-radical scavenger.

#### INTRODUCTION

Mixed-valence (MV) species derived from d-transition-metal complexes are fascinating objects for chemical and spectroscopic studies. In particular, they are attractive from the perspective of basic studies on electron transfer processes as well as investigation of magnetic exchange interaction phenomena.<sup>1–9</sup> Moreover, MV compounds are considered to be a source of components and devices for the emerging field of molecular electronics.<sup>7,8,10–13</sup> The rate of electron delocalization (electronic coupling or communication) in MV species can be examined by a variety of analytical techniques including electrochemistry, ultraviolet/visible (UV–vis) spectroscopy, near-infrared (NIR) spectroscopy, electron paramagnetic resonance (EPR), and Mössbauer spectroscopy.<sup>14–16</sup> Each of them operates in different time

scale. Therefore, to accurately assess the extent of electron delocalization, a combination of slower (EPR and Mössbauer) and faster (UV–vis/NIR) techniques is desirable. Accessible with electrochemical measurements, half-wave potential splitting ( $\Delta E_{1/2}$ ) often provides a misleading approximation of the amount of electronic coupling in MV compounds.<sup>14</sup> A much more reliable measure of electron coupling in MV systems is provided by the electronic coupling matrix element

 Received:
 April 4, 2022

 Published:
 June 14, 2022

![](_page_131_Picture_11.jpeg)

![](_page_131_Picture_13.jpeg)

![](_page_132_Figure_3.jpeg)

![](_page_132_Figure_4.jpeg)

![](_page_132_Figure_5.jpeg)

Scheme 1. Synthesis of 1a-c and  $2a-c^{a}$ 

![](_page_132_Figure_7.jpeg)

<sup>a</sup>AZT = 3'-azido-3'-deoxythymidine; NBS = N-bromosuccinimide; DIPEA = N,N-diisopropylethylamine; THF = tetrahydrofuran.

 $H_{\rm ab}$  ( $V_{\rm ab}$ ).  $H_{\rm ab}$  can be determined from the intervalence charge transfer (IVCT) band and using Hush's two-state model according to eq 1S (see the Supporting Information (SI)).<sup>17,18</sup> According to the classification of Robin and Day, there are three classes of MV compounds.<sup>19</sup> Class I comprises valence-trapped systems, class II comprises weakly coupled systems, and class III comprises valence delocalized systems. In fully delocalized class III systems, the electronic coupling matrix element  $H_{\rm ab}$  is half the energy at the IVCT band maximum, whereas in class I compounds, the IVCT band is not present.

Reported in 1951, ferrocene (FcH =  $Fe(\eta^5-C_5H_5)_2$ ) has become a cornerstone of modern organometallic chemistry.<sup>20,21</sup> In the last 71 years, ferrocenyl (Fc) compounds have found many applications in catalysis, biology, materials chemistry, and so forth.<sup>22–35</sup> One of the reasons behind this success is due to the electrochemical properties of ferrocene and its derivatives. The  $Fc/[Fc]^+$  redox couple is usually characterized by superb chemical reversibility combined with great thermal stability.<sup>36</sup> Thus, compounds containing Fc groups linked by aromatic or  $\pi$ -electron cyclic or acyclic bridges have been recognized as a source of MV species that are nicely suited for electronic communication studies.<sup>37</sup> In this respect, bridges such as benzene,<sup>38,39</sup> pyridine,<sup>40</sup> 1,3,5-triazine,<sup>40</sup> pyrrole,<sup>41–43</sup> thiophene,<sup>44–48</sup> selenophene,<sup>49</sup> thiadiazole,<sup>48</sup> thiazole,<sup>50</sup> phosphole,<sup>51,52</sup> and silole,<sup>53</sup> to name just a few, have been studied.

Article

#### Scheme 2. Synthesis of 1c and $2c^{a}$

![](_page_133_Figure_4.jpeg)

<sup>*a*</sup>AZT = 3'-azido-3'-deoxythymidine; THF = tetrahydrofuran.

The  $Fc/[Fc]^+$  redox couple has also found numerous applications in biology. It can be tentatively categorized as analytical and therapeutic. Regarding the former, adequately designed ferrocenylated DNA oligomers have been applied for single-base mismatches<sup>54</sup> and viral DNA<sup>55</sup> electrochemical detection as well as for redox coding of nucleobases and their ratiometric sensing.<sup>56</sup> The role of redox chemistry in therapeutic applications of ferrocene derivatives is exemplified by a family of ferrocifen drugs.<sup>33,57</sup> The mechanism of action of these remarkably anticancer-active compounds begins with single oxidation of the Fc entity, which is embedded in the "ferrocenyl-ene-phenol" structural motif.

A high concentration of reactive oxygen species (ROS) in cancer cells is a well-established phenomenon<sup>58</sup> that is utilized for activation of aminoferrocene-based antitumor prodrugs.<sup>59,60</sup> In brief, their mechanism of action includes the initial ROS-activated cleavage of the phenylboronic acid "cap" from the prodrug, which then enables fragmentation of the thus-obtained molecule to form organic quinone methide (QM) and ferrocenium ion products.<sup>59</sup> Ferrocenium ions themselves or liberated from them  $Fe^{2+/3+}$  ions react with endogenous ROS to further elevate oxidative stress (OS) in cancer cells, which finally leads to deleterious effects. Yet another relevant example of redox-activated anticancer-active ferrocenes pertains to ferrocene-(vinyl)Ru(CO)Cl(P<sup>i</sup>Pr<sub>3</sub>)<sub>2</sub> compounds A and B (Figure 1).<sup>16,61</sup>

These compounds differ from ferrocifenes and aminoferrocene prodrugs as their molecular structure features two nonequivalent metal redox centers. Combined (spectro)electrochemical, EPR, and Mössbauer studies on **B** revealed that it belongs to class II MV systems.<sup>16</sup> Interestingly, compound **B** showed high anticancer activity in HT-29 colon carcinoma and MCF-7 breast cancer cells *in vitro*.<sup>61</sup> Its activity exceeded that of **A**, and it was much better in terms of activity than the corresponding mononuclear ferrocenyl and ruthenium complexes used as references in the same study.<sup>61</sup> Remarkable biological activity of **A** and **B** has stimulated our interest in the development of new mixed-valence ferrocenyl systems as anticancer agents.

Herein, we report the syntheses and (spectro)electrochemical, EPR, and density functional theory (DFT) studies of 3'-deoxy-3'-(4-ferrocenyl-5-ethynylferrocenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (1a) and 1-(3-propionylferrocenyl)-4-ferrocenyl-5-ethynylferrocenyl-1H-1,2,3-triazole (2a) representing bi- and trinuclear ferrocenyl systems, respectively (Figure 1). Furthermore, we report herein on mononuclear congeners of 1a and 2a such as 3'-deoxy-3'-(4-ferrocenyl-5iodo-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (1b), 1-(3-propionylferrocenyl)-4-ferrocenyl-5-iodo-1*H*-1,2,3-triazole (**2b**), 3'-deoxy-3'-(4-ferrocenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (1c), and 1-(3-propionylferrocenyl)-4-ferrocenyl-1*H*-1,2,3-triazole (2c) (Schemes 1 and 2). The common feature of 1a-c and 2a-cseries of compounds is that they contain the 1,2,3-triazole structural motif. Due to the development of the coppercatalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction,<sup>62,63</sup> the interest in the chemistry of 1,2,3-triazoles has increased greatly in the recent time.<sup>64-68</sup> In regard to biological applications, 1,2,3-triazoles have proved their value as easy-to-synthesize linkers in bioconjugate chemistry.<sup>30,31,64,68</sup> In this work, another leap forward has been taken with respect to biological applications of 1,2,3-triazoles as they have been used not only as linkers but also as entities that allow electron transfer between two ferrocenyl groups to occur. The selection of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as

![](_page_134_Figure_3.jpeg)

**Figure 2.** Molecular structure of **1a** (two crystallographically independent molecules in the crystal, **A** and **B**) with atomic displacement ellipsoids at the 50% probability level. The H-atoms are omitted for clarity.  $Mp_1$ ,  $Mp_2$ ,  $Mp_3$ , and  $Mp_4$  pertain to the mid-points of the cyclopentadienyl rings. Selected bond lengths, distances [Å], and angles [deg] for molecule A/molecule B:  $Mp_1-Mp_2$ , 3.298(5)/3.308(5);  $Mp_3-Mp_4$ , 3.279(5)/3.311(5); Fe1A/Fe1B···Fe2A/Fe2B, 10.981(13)/11.055(11) (sum of the bond lengths); Fe1A-C8A/Fe1B-C8B, 2.061(8)/2.084; Fe2A-C20A/Fe2B-C20B, 1.999(8)/2.083(7); C1A-C8A/C1B-C8B, 1.456(12)/1.485(13); C18A-C19A/C18B-C19B, 1.214(15)/1.175(12); C2A-N1A/C2B-N1B, 1.351(11)/1.360(10); N1A-N2A/N1B-N2B, 1.331(11)/1.335(10); N2A-N3A/N2B-N3B, 1.321(10)/1.301(11); N3A-C1A/N3B-C1B 1.362(11)/1.370(11); C1A-C2A/C1B-C2B, 1.382(12)/1.382(12); C2A-C18A-C19A/C2B-C18B-C19B, 175.9(1)/175.6(8); C18A-C19A-C20A/C18B-C19B-C19B, 0.5(16)/-5.8(15); C1'A-O1A-C4'A-C3'A/C1'B-O1B-C4'B-C3'B, -4.5(10)/-6.2(9).

the source material for compounds 1a-c was motivated by the biological significance of deoxythymidine nucleoside and general importance of CuAAC reactions in nucleic acid chemistry and biology.<sup>64,68</sup> Taking into account the above motivation, compounds 1a and 2a as well as their mononuclear analogues 1c and 2c were used to study their anticancer activity in human A549 and H1975 non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells and nonmalignant bronchial epithelium BEAS-2B cells. Anticancer activity assays have been also performed in the presence of free-radical scavenger *N*-acetyl cysteine (NAC) to investigate the impact of ROS on compounds' activity.

#### RESULTS AND DISCUSSION

**Synthesis.** Compounds **1a** and **2a** belong to 5-alkynyl-1,2,3-triazoles, a subclass of highly substituted 1,2,3-triazole derivatives with great potential for synthetic chemistry. A literature survey shows several synthetic approaches giving an access to this class of compounds.<sup>69–73</sup> One of them relies on the palladium-catalyzed Sonogashira cross-coupling reaction of 5-iodo-1,2,3-triazoles with terminal alkynes.<sup>65,73</sup> Due to apparent simplicity, we have chosen this approach for the synthesis of compounds **1a** and **2a**. In the first step, we attempted to obtain the 5-iodo-1,2,3-triazole **1b** and **2b** intermediates. Their syntheses were carried out by the reaction of AZT or 3-azidopropionylferrocene (**C**) with ethynylferrocene (**D**), *N*-bromosuccinimide (NBS), and *N*,*N*-diisopropylethylamine (DIPEA) according to Scheme 1.<sup>74</sup>

As expected, the respective reactions afforded 5-iodo-1,2,3triazole **1b** and **2b** in 9 and 24% yields, respectively. Besides this and to our satisfaction, reactions also afforded the desired compounds **1a** and **2a** in 39 and 22% yields, respectively. Furthermore, 4-ferrocenyl-1,2,3-triazole derivatives **1c** and **2c** were obtained, although in low yields of 6 and 15%, respectively. We have found that simple modifications of the reaction conditions (*e.g.*, increase of either the reaction time and/or temperature) only resulted in a decrease of compounds **1a** and **2a** yield. Also, any attempt to transform **1b** or **2b** into corresponding compounds **1a** and **2a** by the Sonogashira crosscoupling reaction with ethynylferrocene (**D**) failed. On the contrary, the yields of compounds **1c** and **2c** were easily increased using the classical CuAAC reaction conditions according to Scheme 2.

Formation of 5-iodo-1,2,3-triazole 1b and 2b can be explained by the mechanism proposed by Zhang.<sup>74</sup> However, the observation of other reaction products suggests that further mechanism(s) can be also operational in the course of the reaction. Their investigation was out of our interest as the effort was entirely focused on electronic coupling and anticancer activity studies. After completion of the reaction and purification, compounds 1a and 2a-c were isolated as orange crystalline solids, whereas 1b and 1c were isolated as yellow crystalline solids. Characterization of all complexes was carried out with <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and IR spectroscopy, mass spectrometry, and elemental analyses. The <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>C NMR spectra of 1a-c and 2a-c are shown in Figures S1-S12 (see the SI). Furthermore, the structures of 1a, 2a, and 2c in the solid state were determined by single-crystal X-ray structural analysis.

Article

![](_page_135_Figure_3.jpeg)

**Figure 3.** Molecular structure of **2a** (two crystallographically independent molecules in the crystal, **A** and **B**) with atomic displacement ellipsoids at the 50% probability level. The H-atoms are omitted for clarity. Mp<sub>1</sub>, Mp<sub>2</sub>, Mp<sub>3</sub>, Mp<sub>4</sub>, Mp<sub>5</sub>, and Mp<sub>6</sub>, pertain to the mid-points of the cyclopentadienyl rings. Selected bond lengths, distances [Å], and angles [deg] for molecule **A**/molecule **B**: Mp<sub>1</sub>–Mp<sub>2</sub>, 3.316(9)/3.306(7); Mp<sub>3</sub>–Mp<sub>4</sub>, 3.302(8)/3.294(8); Mp<sub>5</sub>–Mp<sub>6</sub>, 3.289(8)/3.296(8); Fe2A/Fe2B···Fe3A/Fe3B, 8.548(3)/6.770(3) (through space distance) and 10.920(16)/10.934(16) (sum of the bond lengths); Fe1A/Fe1B···Fe2A/Fe2B, 10.981(13)/11.055(11) (sum of the bond lengths); Fe1A-C6A/Fe1B–C6B, 2.030(14)/2.047(12); Fe2A–C16A/Fe2B–C16B, 2.033(12)/2.045(13); Fe3A–C28A/Fe3B–C28B, 2.058(12)/2.047(12); C1A–C2A/C1B–C2B, 1.378(18)/1.397(18); C1A–N3A/C1B–N3B, 1.381(16)/1.356(16); C1A–C16A/C1B–C16B, 1.435(17)/1.441(18); C2A–N1A/C2B–N1B, 1.405(17)/1.358(17); N1A–N2A/N1B–N2B, 1.296(14)/1.343(15); N2A–N3A/N2B–N3B, 1.327(15)/1.331(15); C26A–C27A/C26B–C27B, 1.211(19)/1.209(17); C2A–C26A–C27A/C2B–C26B–C27B, 174.6(15)/178.0(14); C26A–C27A–C28A/C26B–C27B–C28B, 177.2(14)/178.8(15); C16A–C1A–C2A–C26A/C16B–C1B–C2B–C26B, 9(3)/4(2); N1A–C3A–C4A–C5A/N1B–C3B–C4B–C5B, -179.3(10)/70.4(13).

**Crystallographic Studies.** Single-crystals of 1a, 2a, and 2c suitable for X-ray diffraction (XRD) analysis were obtained by diffusion of *n*-hexane in a solution of the respective complex in dichloromethane at room temperature. The crystal and structure refinement data are presented in Table S1 (see the SI). The molecular structures of 1a, 2a, and 2c with the atom-labeling scheme and selected geometrical parameters are provided in Figures 2–4, respectively. The bond distances (Å) and valence and torsion angles (deg) are given in Tables S2–S10 (see the SI). Compounds 1a and 2c both crystallized in the orthorhombic space group,  $P2_1$  (1a) and Cc (2c). Compound 2a crystallized in the monoclinic space group  $P2_1/c$ . In the crystals of 1a and 2a, two crystallographically independent molecules (A and B) are observed.

Crystallographic analysis confirmed the postulated structures of examined complexes and indicate their conformational flexibility (two different conformers for **1a** and **2a** in the crystal lattices). Particularly, for **1a** and **2a**, the molecular architecture in which the ferrocenyl and the ethynylferrocenyl entities are bonded to a 1,2,3-triazole scaffold in a 4,5-substitution pattern was unambiguously confirmed. The through space distance between the Fe atoms in **1a** was 8.402(2) and 8.075(2) Å in conformers **A** and **B**, respectively. The analogous distance for compound **2a** was 8.548(3) Å (conformer **A**) and 6.770(3) Å (conformer **B**). The sandwich Fc groups adopt intermediate conformations between the staggered and the eclipsed form.<sup>75</sup> Table S11 (see the SI) provides the geometrical details for

![](_page_135_Figure_7.jpeg)

Figure 4. Molecular structure of 2c with atomic displacement ellipsoids at the 50% probability level. The H-atoms are omitted for clarity.  $Mp_1$ ,  $Mp_2$ ,  $Mp_3$ , and  $Mp_4$  pertain to the mid-points of the cyclopentadienyl rings. Selected bond lengths, distances [Å], and angles [deg]:  $Mp_1-Mp_2$ , 3.306(3);  $Mp_3-Mp_4$ , 3.298(3); Fe1-C6, 2.036(5); Fe2-C16, 2.049(6); C1-C2, 1.379(8); C5-C6, 1.473(8); N1-C2, 1.350(7); N3-C1, 1.363(7); N2-N1, 1.340(7); N3-N2, 1.318(7); O1-C5, 1.219(7); C22-C21-C25-C24, 0.2(7); C1-C2-N1-C3, 176.2(5); C1-C2-N1-N2, 0.5(6); C3-C4-C5-C6, 167.9(4); C4-C3-N1-N2, -64.2(7).

these conformations. The geometry of the thymine nucleobase in 1a does not show significant differences with similar species reported in the literature.<sup>76</sup> Furthermore, structural analysis confirmed that the absolute configuration of the deoxyribosyl moiety present in two independent molecules of 1a in the crystal can be assigned as D (D-ribose). Of notice is, however, that the sugar conformations are different in each independent molecule. The puckering of the deoxyribosyl moiety within conformer **A** adopts an envelope C2'-endo conformation, whereas in conformer **B**, a twist C2'-endo-C3'-exo conformation is characteristic.<sup>77,78</sup> The numerical data for both conformations are given in Table S12 (see the SI).

(Spectro)electrochemistry. Electrochemical studies of compounds 1a, 1c, 2a, and 2c were carried out using cyclic voltammetry (CV) and square-wave voltammetry (SWV) (Table 1; Figures 5 (compounds 1a, 2a) and S13 (compounds

Table 1. C	yene vonami	netry Data of J	la, IC, 2a, and	20
compound	$\frac{E_1^{\circ\prime}/\mathrm{mV}^{b}}{\left(\Delta E_\mathrm{p}/\mathrm{mV}^{c}\right)}$	$\frac{E_2^{\circ\prime}/\mathrm{mV}^b}{(\Delta E_\mathrm{p}/\mathrm{mV}^c)}$	$\frac{E_3^{\circ\prime}/\mathrm{mV}^b}{\left(\Delta E_\mathrm{p}/\mathrm{mV}^c\right)}$	$K_{\rm C}^{}$

la	80 (60)	280 (66)		2412
1c	60 (66)			
2a	45 (60)	280 (61)	365 (63)	9426
2c	20 (61)		330 (67)	

<sup>*a*</sup>Potentials *vs* [FcH]/[FcH]<sup>+</sup> (scan rate 100 mV·s<sup>-1</sup>) at a glassy carbon electrode of 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> solutions of the analyte in anhydrous dichloromethane containing 0.1 mol·L<sup>-1</sup> [NBu<sub>4</sub>][B-(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>4</sub>] as the supporting electrolyte at 25 °C. <sup>*b*</sup>E<sup>o</sup>' = formal potential. <sup>*c*</sup>\Delta E<sub>p</sub> = difference between the cathodic and anodic peak potentials |E<sub>pc</sub> - E<sub>pa</sub>|. <sup>*d*</sup>K<sub>C</sub> = comproportionation constant K<sub>C</sub> = exp(*nF/RT*)\Delta E<sub>1/2</sub>, *F* = Faraday constant, *R* = gas constant, *T* = temperature,  $\Delta E_{1/2}$  = difference of half-wave potentials, *n* = number of transferred electrons.

**1c**, **2c**), see the SI). A solution of  $[NBu_4][B(C_6F_5)_4]$  (0.1 mol· L<sup>-1</sup>) in anhydrous  $CH_2Cl_2$  was used as the supporting electrolyte.<sup>79</sup> The choice of the supporting electrolyte was motivated by the beneficial properties of  $[B(C_6F_5)_4]^-$  ions. In contrast to smaller counter ions such as  $[C1]^-$ ,  $[PF_6]^-$ ,  $[BF_4]^-$ , or  $[ClO_4]^-$ ,  $[B(C_6F_5)_4]^-$  tolerates the stabilization of greatly charged species in solution, minimizing undesired ion-pairing effects.<sup>80,81</sup> The voltammetry experiments were performed at 25 °C. All potentials are referenced to the FcH/[FcH]<sup>+</sup> (Fc = Fe( $\eta^{5}$ -C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)( $\eta^{5}$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)) redox couple ( $E^{\circ\prime}$  = 0 mV).<sup>82</sup>

The cyclic voltammogram of 1a shows two separated reversible redox events at 80 and 280 mV, while 2a with its further  $FcC(O)CH_2CH_2$  unit features in total three redox processes at 45, 280, and 365 mV vs FcH/[FcH]<sup>+</sup>, as expected (Figure 5 and Table 1). To assign the appropriate redox waves, compounds 1c and 2c were measured under identical conditions. It was found that the ferrocenyl-based redox event of 1c appears at 60 mV and the ones of 2c appear at 20 and 330 mV (Table 1 and Figure S13, see the SI). Comparing these values leads to the conclusion that the first oxidation occurs at the Fc moiety directly bonded to the 1,2,3-triazole core. Such an assignment is consistent with data obtained for other ferrocenyl-1,2,3-triazole systems<sup>83-85</sup> and supported by DFT calculations (see the SI). In the following electrochemical process, the respective FcC≡C unit is oxidized. The potentials confirm that compound 2a is more electron-rich than 1a and hence is easier to be oxidized, whereas the follow-up redox event occurs at the same potential. The difference between the formal potentials is 200 mV for 1a and 235 mV for 2a (Table 1), pointing to the fact that monocationic  $[2a]^+$  should be a somewhat more stable mixed-valent species than [1a]<sup>+</sup> (vide supra). The formal potential of the  $FcC(O)CH_2CH_2$  terminal group can be found at 330 (2c) and 365 mV (2a) due to the influence of the previously introduced positive charges.

The in situ electrochemical behavior of 1a (Figure 6) and 2a (Figure 7) was investigated by spectroelectrochemical UVvis/NIR measurements within an optically transparent thinlayer electrochemical (OTTLE<sup>86</sup>) cell with SiO<sub>2</sub> windows in tetrahydrofuran solutions of the analyte, containing [NBu<sub>4</sub>]- $[B(C_6F_5)_4]$  (0.1 mol·L<sup>-1</sup>) as the supporting electrolyte.<sup>87,88</sup> In the course of the measurements, the applied cell potential was increased stepwise (step width: 25, 50, or 100 mV). At the end of each measurement, the analyte was reduced at -500 mV vsAg/AgCl for 30 min, and an additional spectrum was recorded to prove the reversibility of the oxidation. The spectroelectrochemical UV-vis/NIR data of 1a in tetrahydrofuran display weak absorptions in the NIR region between 0 and 250 mV vs Ag/AgCl upon formation of the mixed-valent species  $[1a]^+$ (Figure 6). A further increase of the potential leads to the generation of dicationic [1a]<sup>2+</sup> (250-500 mV vs Ag/AgCl).

![](_page_136_Figure_12.jpeg)

**Figure 5.** Cyclic voltammograms of **1a** (left) and **2a** (right) (potential area -500 to 800 mV) as well as square-wave voltammograms (dotted lines) (potential area -200 to 600 mV). Measurement conditions: scan rates, 100 mV·s<sup>-1</sup> (CV) and 5 mV·s<sup>-1</sup> (SWV) in anhydrous dichloromethane solutions (1.0 mmol·L<sup>-1</sup>); supporting electrolyte, 0.1 mol·L<sup>-1</sup> of [NBu<sub>4</sub>][B(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>4</sub>]; working electrode, glassy carbon.

![](_page_137_Figure_3.jpeg)

Figure 6. UV–vis/NIR spectra of 1a at 0–250 mV (left) and 250–500 mV (right) vs Ag/AgCl in an OTTLE cell; measurement conditions: 25 °C, 5.0 mmol·L<sup>-1</sup> analyte solution in tetrahydrofuran, and 0.1 mol·L<sup>-1</sup> [N<sup>n</sup>Bu<sub>4</sub>][B(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>4</sub>]; arrows indicate absorption changes.

![](_page_137_Figure_5.jpeg)

**Figure 7.** UV–vis/NIR spectra of **2a** at 150–275 mV (left) and 275–800 mV (right) vs Ag/AgCl in an OTTLE cell; measurement conditions: 25 °C, 5.0 mmol·L<sup>-1</sup> analyte solution in tetrahydrofuran, and 0.1 mol·L<sup>-1</sup> [N<sup>n</sup>Bu<sub>4</sub>][B(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>4</sub>]; arrows indicate absorption changes.

![](_page_137_Figure_7.jpeg)

Figure 8. IR spectra (2150–2300 cm<sup>-1</sup>) of 1a at 0–250 mV (left) and 250–500 mV (right) vs Ag/AgCl in an OTTLE cell; measurement conditions: 25 °C, 5.0 mmol·L<sup>-1</sup> analyte solution in tetrahydrofuran, 0.1 mol·L<sup>-1</sup> [N<sup>n</sup>Bu<sub>4</sub>][B(C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>)<sub>4</sub>], arrows indicate increasing or decreasing  $\nu_{C\equiv C}$  vibrations.

The measurements confirm that  $[1a]^+$  exhibits IVCT absorption of a weak strength, indicating reduced coupling between the Fc and the  $[Fc]^+$  entity. Similar observations were

made for the UV-vis/NIR spectra of 2a (Figure 7). Further analysis of both IVCT absorptions via deconvolution of the resulting bands confirmed that the weak nature of these

![](_page_138_Figure_3.jpeg)

Figure 9. SOMO orbitals in open-shell species  $[1a]^+$  and  $[2a]^+$  calculated at the BLYP/6-31+G(d)/LanL2DZ level of theory. Atomic radii scaled by 50%.

transitions is less pronounced for **2a** ( $\tilde{v}_{IVCT} = 9255 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\varepsilon_{max} = 80 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $\Delta \tilde{v}_{1/2} = 6215 \text{ cm}^{-1}$ ) than **1a** ( $\tilde{v}_{IVCT} = 9040 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\varepsilon_{max} = 65 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $\Delta \tilde{v}_{1/2} = 4795 \text{ cm}^{-1}$ ) (Figure S14, see the SI). Based on these values,<sup>89</sup> the electronic matrix coupling element  $V_{ab}$  ( $H_{ab}$ ) (eq 1S, see the SI) can be calculated and results in 100 cm<sup>-1</sup> for **1a** and 127 cm<sup>-1</sup> for **2a**, confirming the weak nature of their electronic coupling.

In the example of 1a, spectroelectro-IR studies were carried out applying an OTTLE cell with CaF2 windows under identical measurement conditions (vide infra). Oxidation of neutral 1a to monocationic [1a]<sup>+</sup> leads to higher intensities of the triple bond vibrational band, which is accompanied by a shift from 2214 to 2210 cm<sup>-1</sup> (Figure 8). Smaller wavenumbers imply that the carbon-carbon triple bond comprises more electron density in  $[1a]^+$ , proposing that electron transfer between the ferrocenic species passes through the carboncarbon triple bond, making this a "through-bond" electron transfer process. A further increase of potential leads to the generation of  $[1a]^{2+}$ , which is followed by a characteristic shift of the band from 2210 to 2216 cm<sup>-1</sup>. This observation is the result of decreased electron density due to both ferrocenyl systems featuring Fe<sup>3+</sup> ions. Therefore, electron delocalization between the Fc and FcC=C units via the 1,2,3-triazole connectivity is reduced compared to  $[1a]^+$ .

A bathochromic  $(4 \text{ cm}^{-1})$  and hypsochromic  $(6 \text{ cm}^{-1})$  shifts in the infrared C=C stretching vibration, observed during the first  $(1a \rightarrow 1a^+)$  and the second  $(1a^+ \rightarrow 1a^{2+})$  oxidation, respectively, were reproduced at the BLYP/6-31+G(d)/ LanL2DZ level of theory (see the DFT Calculations section and the SI for details).

DFT Calculations. To gain more detailed insight into the electronic structures of the examined compounds, calculations were carried out at the BLYP/6-31+G(d)/LanL2DZ level of DFT theory<sup>90</sup> utilizing the Gaussian 16 code.<sup>91</sup> Details on structural optimization and calculations are provided in the Experimental Section and the SI. According to DFT calculations, the highest occupied molecular orbital (HOMO) orbital of 1a, 1c, 2a, and 2c is localized at the ferrocenyl group directly bonded to the 1,2,3-triazolyl moiety (Figure S15). Upon first oxidation, one electron (a  $\beta$  spin state) is removed from the  $3d_{rv}$  orbital of the ferrocene ring. The  $3d_{xy}$  orbital becomes the singly occupied molecular orbital (SOMO) for the  $\alpha$ -electron and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) in the  $\beta$ -electron configuration in the oxidized species. In the case of  $[1a]^+$  and  $[2a]^+$ , the spin density is not located on one ferrocenyl group but expands

over the *ca.* 11 Å ferrocenyl-1,2,3-triazolyl-ethynylferrocenyl part of the molecule (Figure 9). This feature provides additional evidence for the possibility of electron communication between the two Fc moieties in  $[1a]^+$  and  $[2a]^+$ . However, the spin density is not uniformly distributed over the 1,2,3-triazolyl bridge. Its highest contribution is on the two carbon (formally C=C bond) and the middle nitrogen atom of the 1,2,3-triazolyl core.

DFT calculations were found very useful with respect to spectroelectro-IR study result interpretation. Accordingly, an excellent agreement between experimental and calculated C≡ C bond stretching frequencies was obtained (Table S13, see the SI). This further validates our theoretical approach and supports the experimental evidence of the electron transfer between the two ferrocenyl moieties in  $[1a]^+$ . In the dicationic species [1a]<sup>2+</sup>, however, the "through-bond" electron transfer was lost, as both ferrocenyl units exist in the Fe<sup>3+</sup> form. According to calculations, the ground state of  $[1a]^{2+}$  was found to be a triplet state (rather than a single state) with the two singly occupied MOs (Figure S16, see the SI). Interestingly, the relative increase in the C  $\equiv$  C stretching frequency ( $[1a]^+ <$  $1a < [1a]^{2+}$  correlates well with the calculated C $\equiv$ C bond length in the respective series (Table S13, see the SI): with an increase in frequency, the bond becomes shorter. The relative change is small but indicative. This also supports the involvement of the C=C bond in  $Fe^{2+}-Fe^{3+}$  delocalization in  $[1a]^+$  on the intrinsic IR time scale and the lack of the corresponding communication between the two ferrocenyl entities in  $[1a]^{2+}$ .

Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopic Study. With the purpose of gaining better insights into the charge delocalization in one-electron oxidized compounds, we performed in situ EPR spectroelectrochemical measurements for compounds 1a and 2a. While the organic radical could be obtained at room temperature, an anisotropic signal of the ferrocenium ion is only detectable at low temperature (below 77 K) due to fast spin-lattice relaxation. The EPR spectra of electrochemically generated  $[1a]^+$  and  $[2a]^+$  show no signals at 298 and 85 K. The absence of any signals during the first redox event under specified conditions indicates that the oxidation process in the compounds is predominantly located on the ferrocenyl moiety at the EPR time scale, substantiating the presence of the weakly coupled class II MV system according to Robin and Day. Thus, further information about the electronic coupling between the

а

![](_page_139_Figure_3.jpeg)

Figure 10. EPR spectra measured in DMF solutions containing (a) 1c, 1a, and 2a under air conditions and (b) 1a under different conditions (air,  $O_2$ ,  $N_2$ ), T = 295 K.

Table 2. EPR Parameters of DMPO Spin Adduct	ts"
---------------------------------------------	-----

	hyper	fine splitting constant	s (G)		
experimental conditions	$a(^{14}N)$	$a({}^{1}\mathrm{H}_{\beta})$	$a(^{1}\mathrm{H}\gamma)$	g value	radical
		1	a		
air	12.84	10.15	1.39	2.00596	02 <sup>•-</sup>
	13.81	11.71	0.83	2.00579	•оон
O <sub>2</sub>	13.10	10.63		2.00590	02 <sup>•-</sup>
	14.38	16.47		2.00585	•CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )CHO
$N_2$	14.36	17.66		2.00572	•CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )CHO
	14.27	19.94		2.00579	•CH <sub>3</sub>
	13.37	11.53	0.97	2.00583	•ООН
		2	a		
air	12.93	10.21	1.38	2.00588	02 <sup>•–</sup>
	13.93	11.96	0.94	2.00571	•оон
	14.21	16.93		2.00583	•CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )CHO
	14.07	20.81		2.00578	•CH <sub>3</sub>
Main adducts are shown in bold					

ferrocenyl groups in  $[1a]^+$  and  $[2a]^+$  cannot be provided with EPR due to experimental limitations.

Instead, the EPR spin-trapping technique was employed to detect short-lived free radicals (reactive oxygen species; ROS) generated in dimethylformamide (DMF) solutions of ferrocene compounds in the presence of molecular oxygen. Free radicals are key cell-damage causative agents that are often generated by ferrocenium species inside cancer cells.<sup>27,31,59–61</sup> It was therefore justified to check whether our compounds are also capable of free-radical generation. In this regard, 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) was used as a spin trap. The EPR spectra measured in air-saturated DMF solutions selected for measurement compounds of **1a**, **1c**, and **2a** show a mixture of DMPO adducts, indicating the production of several free radicals (Figure 10).

On the basis of the hyperfine splitting constants of DMPO adducts,<sup>92</sup> the main radicals formed in the systems are oxygencentered ones (superoxide radical anion  $O_2^{\bullet-}$  and its protonated form hydroperoxyl radical  $\bullet$ OOH). The simulated spectra fit very well with the experimental ones (Figure S17, see the SI). EPR parameters of the spin trap adducts obtained from simulations of experimental spectra are presented in Table 2.

Under  $O_2$ -saturated conditions, the signal of the superoxide radical anion adduct of DMPO is significantly broadened due to the high concentration of radicals in the solution (Figures 10b and S18a). All of these observations are the confirmation of a single-electron-transfer reaction between a ferrocenyl group and molecular oxygen, resulting in the formation of superoxide anion radicals. It should be also noted that the concentration of the radicals formed in the system with 1c is much lower than that with 1a and 2a. It indicates that the binuclear compounds containing ferrocenyl and ethynylferrocenyl moieties are more effective ROS generators. In an inert  $(N_2)$  atmosphere, carbon-centered (alkyl) radicals are mainly formed (Figures 10b and S18b, see the SI). Radicals °CH<sub>3</sub> and °CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)CHO have been earlier found as a result of ultrasound-induced pyrolysis of DMF.<sup>93</sup> The main DMPO adducts obtained under an inert atmosphere can be assigned to DMPO/°CH<sub>3</sub> and DMPO/°CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)CHO. The alkyl radicals of DMF are also present in small amounts in air and O<sub>2</sub>-saturated solutions.

Antiproliferative Activity. Our first reports on anticanceractive MV ferrocenyl compounds occurred over a decade ago.<sup>16,61</sup> Recently, they were followed by another report on anticancer-active electronically coupled ferrocene systems.<sup>94</sup> Herein, the antiproliferative activity of 1a, 1c, 2a, and 2c is examined in human NSCLC A549 and H1975 cells as well as against nonmalignant human bronchial epithelium BEAS-2B cells. The calculated IC<sub>50</sub> concentrations after 72 h of compound incubation with the cells are shown in Table 3 (cell survival curves related to IC<sub>50</sub> values are provided in Figures S19–S27).

The most active complexes among ferrocenyl compounds tested were 1a and 2a. Noticeably, compound 1a was more active against H1975 cells than tamoxifen and 5-fluorouracil and almost equally active as cisplatin ( $5 \pm 2$  (1a) vs  $4 \pm 0.1 \mu M(\text{cisPt})$ ). Furthermore, it was found that 1a was more active

Table 3. Antiproliferative Activity ( $IC_{50}$ ;  $\mu M$ ) of Compounds 1a, 1c, 2a, 2c, and Reference Drugs (Cisplatin, Tamoxifen, and 5-Fluorouracil) against Human NSCLC A549 and H1975 Cells and Nonmalignant Human Bronchial Epithelium BEAS-2B Cells<sup>4</sup>

compound	A549	SInd	H1975	SInd	BEAS-2B
1a	$57 \pm 18$	8.2	$5 \pm 2$	93.8	469 ± 10
1c	$230 \pm 13$	0.9	456 ± 17	0.5	$215 \pm 7$
2a	$184 \pm 7$	1.4	84 ± 5	3.0	$257 \pm 5$
2c	$805 \pm 72$	0.2	$122 \pm 45$	1.6	$198 \pm 7$
cisplatin	$108 \pm 12$	0.02	$4 \pm 0.1$	0.7	$3 \pm 0.1$
tamoxifen	$72 \pm 9$	0.1	$37 \pm 5$	0.2	9 ± 0.2
5-fluorouracil	69 ± 21	0.1	$32 \pm 12$	0.2	6 ± 0.1

 $^{a}IC_{50}$  was defined as the compound concentration causing a 50% decrease in cell viability in compared to the viability of untreated cells. The selectivity index (SInd) was calculated from the simple equation:  $IC_{50}(BEAS\text{-}2B)/IC_{50}(A549 \text{ or }H1975)$ . Treatment time, 72 h.

against A549 in comparison to all three reference compounds tested. An important feature of binuclear compound 1a is that it shows a remarkably high selectivity index (SInd) toward H1975 (93.8) and A549 (8.2) cells. Higher selectivity toward cancer cells over nonmalignant BEAS-2B cells was also observed for compound 2a, which might be indicative of similar mechanisms for 1a and 2a but not for their mononuclear congeners 1c and 2c, respectively. Of remark is that the SInd for all reference drugs tested was low and ranged from 0.02 (A549 for cisplatin) to 0.7 (H1975 for cisplatin), indicating high undesirable toxicity toward nonmalignant cells. In other words, the most anticancer-active compound, 1a had an IC<sub>50</sub> value of 469  $\pm$  10  $\mu$ M against BEAS-2B cells, respectively, which is about 156-, 52-, and 78-times higher values than the IC<sub>50</sub> values for cisplatin, tamoxifen, and 5fluorouracil  $(3 \pm 0.1, 9 \pm 0.2, \text{ and } 6 \pm 0.1 \,\mu\text{M})$ , respectively, against the same BEAS-2B cells. Antiproliferative activity assays showed that cancer cells rich in ROS<sup>58,95</sup> are more susceptible to 1a and 2a in comparison to normal BEAS-2B cells. Likewise, mononuclear compounds 1c and 2c showed negligible activity in either cancer or noncancerous cells. For anticancer activity, the presence of two electronically connected ferrocenyl groups is required. However, of 1a and 2a compounds, the latter had one ferrocenyl entity more than the former but it shows a lower anticancer effect. This observation indicates that also the nucleotide thymidynyl entity contributes to the anticancer effect as well as the fact that a simple increase of the number of redox-active ferrocenyl

centers in a given scaffold does not immediately lead to the improved anticancer effect. In general, antiproliferative activity studies are in agreement with our earlier observation of the high anticancer activity of MV ferrocenyl compounds.<sup>16,61</sup> Oxidative stress (OS) resulting from ROS production is an important factor that takes part in the anticancer activity of organometallic compounds.<sup>27,31,59,60</sup> Concerning that, the aim of the following studies was to examine whether studied compounds generate ROS in cancer cells and how the viability of the treated cells changes in the presence of N-acetyl cysteine (NAC) free-radical scavenger.<sup>96</sup> Thus, we investigated the amount of ROS (OH<sup>•</sup>, O2<sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROO<sup>•</sup>) produced by compounds 1a and 1c and reference drugs at 20  $\mu$ M concentration and 1 h treatment time in H1975 and A549 cells. The measurements were performed using fluorescent probe 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate-acetyl ester (CM-H2DCF-DA) (Figures 11 and S28, see the SI).

Compounds 1a and 1c were more effective ROS generators than cisplatin, tamoxifen, and 5-fluorouracil in both cancer cell types. Of the two ferrocene compounds, the most effective ROS generator was binuclear complex 1a. It generated about 1.6 and 2.5 times more ROS than 1c in H1975 and A549 cells. Furthermore, 1a was about 2 and 2.5 times more potent in ROS generation than reference drugs in H1975 and A549 cells. The addition of NAC had almost no effect on ROS generation by cisplatin, tamoxifen, and 5-fluorouracil. Oppositely, the ROS amount produced by 1a in NAC-treated A549 and H1975 cells was approximatively between 0.4 and 0.8 times lower compared to A549 and H1975 NAC nontreated cells. This definitely pin points a key role of ROS in the mechanism of the anticancer action of 1a and corroborates with EPR study results (see the Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopic Study section). Further support for the pivotal role of ROS in inducing compound 1a anticancer activity was provided by the viability assays (Figures 12, S29, and S30, see the SI).

Cells treated with NAC were partially protected from the deleterious influence of compound 1a. Accordingly, the viability of H1975 cells treated with NAC and compound 1a increased approximately to 20% compared to cells treated only with compound 1a (Figure 12) and an analogous increase was also observed for A549 and BEAS-2B cells (Figures S29 and S30, see the SI). These results once again pinpoint the induction of OS/ROS as a key factor responsible for the antiproliferative activity of 1a.

![](_page_140_Figure_10.jpeg)

**Figure 11.** Relative ROS amount in H1975 cells treated with 20  $\mu$ M of compounds 1a and 1c and reference drugs with or without 50  $\mu$ M NAC. The ROS levels were measured by a fluorimetric assay in duplicates. Data are mean  $\pm$  standard deviation (SD) (n = 3). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001: compound-treated cells  $\nu$ s respective untreated (Ctrl) cells;  $^{\bigcirc\bigcirc \bigcirc}p < 0.001$ : compound-treated cells  $\nu$ s compound + NAC-treated cells.

![](_page_141_Figure_3.jpeg)

**Figure 12.** Viability of H1975 cells treated for 72 h with 20  $\mu$ M of compounds 1a and 1c and reference drugs with or without 50  $\mu$ M NAC. Cell viability was measured spectrophotometrically in triplicate. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001: compound-treated cells *vs* respective untreated (Ctrl) cells;  $^{\circ}p < 0.05$ : compound-treated cells *vs* compound +NAC-treated cells.

#### CONCLUSIONS

Two series of 1,2,3-triazole derivatives having one, two, or three ferrocenyl units in their molecular scaffolds were prepared. The synthetic approach utilized CuAAC reactions and enabled obtaining all representatives of a given series of compounds in a single synthetic step. The biferrocenyl (1a) and triferrocenyl (2a) complexes belong to weakly coupled class II mixed-valence systems according to Robin and Day.<sup>1</sup> The EPR study shows that 1a and 2a are better ROS generators than mononuclear complex 1c. Importantly, 1a and 2a showed higher anticancer activity toward A549 and H1975 NSCLC cells than their non-mixed-valence generating counterparts 1c and 2c. Their anticancer efficacy was similar to the efficacy of well-established anticancer drugs such as cisplatin, tamoxifen, and 5-fluorouracil. Of note, 1a and 2a are also characterized by very low toxicity against normal BEAS-2B cells. Observed with EPR studies, the ability for ROS generation of compounds 1a and 2a was further observed in vitro in A549 and H1975 cancer cells. Obtained data allow concluding that the highly deleterious effects of 1a and 2a in investigated cancer cells are primarily due to the ROS and oxidative stress generation. However, the increased ability for ROS generation is not the only mechanism through which these compounds work. This supposition is corroborated by the fact that thymidine derivative 1a has higher anticancer activity than triferrocenyl compound 2a, but of the two compounds, the latter one (2a) is more electron-rich and thus is more susceptible to oxidation in cancer cells. This observation underlines that the thymine portion of compound 1a has also contributed to the anticancer effect. This might be a valuable starting point for the design of new ferrocenyl mixed-valence systems conjugated to nucleic acid components such as nucleosides or nucleotides.

#### EXPERIMENTAL SECTION

**General Considerations.** All preparations were carried out using standard Schlenk techniques. Chromatographic separations were performed using silica gel 60 (Merck, 230–400 mesh ASTM). Azidothymidine (AZT) and ethynylferrocene were purchased from a commercial supplier and used without prior purification. Solvents were of reagent grade and also used without prior purification. 3-Azidopropanoylferrocene was synthesized according to the literature guidelines.<sup>97</sup> <sup>1</sup>H NMR (600 MHz) and <sup>13</sup>C{H} NMR (150 MHz) spectra were recorded with a Bruker ARX 600 spectrometer operating at 298 K in Fourier transform mode. Chemical shifts are given in  $\delta$  units (ppm) using residual dimethyl sulfoxide (DMSO) (<sup>1</sup>H  $\delta$  2.50 ppm, <sup>13</sup>C  $\delta$  39.5 ppm) or CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H  $\delta$  7.26 ppm, <sup>13</sup>C  $\delta$  77.0 ppm) peaks as a reference. All of the mass spectra were recorded using a Synapt G2-Si mass spectrometer (Waters) equipped with an

electrospray ionization (ESI) source and a quadrupole time-of-flight (quadrupole-TOF) mass analyzer. The mass spectrometer was operated in the positive ion detection mode. The measurements were performed with the capillary voltage set to 2.7 kV and the sampling cone voltage set to 20 V. The source temperature was 110 °C. To ensure the accuracy of mass measurements, data were collected in the centroid mode and mass was corrected during acquisition using leucine enkephalin solution as an external reference (Lock-Spray). The results of the measurements were processed using MassLynx 4.1 software (Waters) incorporated with the instrument. The IR spectra were recorded on a Fourier transform infrared (FTIR) Nexus Nicolet apparatus. Microanalyses were performed by Analytical Services of the Polish Academy of the Sciences (Łódź).

Synthesis of 1a-c. A Schlenk tube charged with AZT (120 mg, 0.45 mmol, 1.0 equiv), ethynylferrocene (189 mg, 0.90 mmol, 2.0 equiv), CuI (120 mg, 0.63 mmol, 1.4 equiv), and N-bromosuccinimide (96 mg, 0.54 mmol, 1.2 equiv) was flushed with argon. Then, anhydrous THF (6 mL) and N,N-diisopropylethylamine (0.08 mL, 0.45 mmol, 1.0 equiv) were added. The resulting reaction mixture was protected against light and stirred at ambient temperature for 24 h. Then, 50 mL of 2% aqueous solution of hydrogen chloride was added and the mixture was extracted with dichloromethane  $(2 \times 25 \text{ mL})$ . The organic layer was separated, dried over anhydrous Na2SO4, and transferred to a round-bottomed flask, and all volatiles were evaporated under reduced pressure. After evaporation, the remaining oil was subjected to column chromatography on SiO<sub>2</sub> (ethyl acetate/ chloroform/methanol 35:30:3 v/v/v). Three fractions were collected. The first fraction contained compound 1a, the second contained compound 1b, and the third contained compound 1c. Chromatographically purified compounds were crystallized from a mixture of dichloromethane/*n*-hexane to afford analytically pure samples. Compound 1a was obtained as an orange crystalline solid in 39% (120 mg) yield, compound 1b was obtained as a yellow crystalline solid in 9% (25 mg) yield, and compound 1c was obtained as a yellow crystalline solid in 6% (12 mg) yield.

3'-Deoxy-3'-(4-ferrocenyl-5-ethynylferrocenyl-1H-1,2,3-triazol-1yl)thymidine (1a). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 11.40$  (s, 1H, NH thymine), 7.87 (s, 1H, H6 thymine), 6.54 (t,  $J_{\rm H,H}$  = 6.6 Hz, 1H, H1'), 5.42 (m, 1H, H3'), 5.41 (t,  $J_{H,H}$  = 4.8 Hz, 1H, OH), 4.94 (pt,  $J_{H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.77 (pq,  $J_{H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.50 (pt,  $J_{H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.44 (pt,  $J_{H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.37 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub> Fc), 4.36 (m, 1H, H4'), 4.15 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub> Fc), 3.81 (m, 1H, H5'), 3.74 (m, 1H, H5'), 2.87 (m, 1H, H2'), 2.72 (m, 1H, H2'), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub> thymine) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR  $(150 \text{ MHz}, \text{DMSO-}d_6): \delta = 163.7, 150.5, 147.6, 136.1, 116.2, 109.7,$ 103.1, 84.45, 84.43, 74.3, 71.5, 71.4, 70.9, 69.97, 69.95, 69.3, 68.8, 66.3, 62.2, 61.4, 59.1, 36.4, 12.3 ppm. MS (TOF ES+): m/z =686.1155 (M + H<sup>+</sup>) (calcd for  $C_{34}H_{32}N_5O_4Fe_2$ : 686.1153). FTIR (CHCl<sub>3</sub>  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>]): 3386 (OH), 3093, 3014, 2925, 2852, 2211 (C C), 1687 (C=O), 1468, 1411, 1272, 1219, 1104, 1052, 754. Anal. Calcd for C34H31N5O4Fe2: C, 59.59%; H, 4.56%; N, 10.22%. Found: C, 59,29%; H, 4.60%; N, 10.10%.

3'-Deoxy-3'-(4-ferrocenyl-5-iodo-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (**1b**). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.47 (s, 1H, NH thymine), 7.29 (s, 1H, H6 thymine), 6.23 (t,  $J_{H,H}$  = 7.2 Hz, 1H, H1'), 5.50 (dt,  $J_{H,H}$  = 9.0, 3.6 Hz, 1H, H3'), 5.01 (s, 2H, C<sub>3</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.47 (m, 1H, H4'), 4.37 (s, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.14 (s, 5H, C<sub>3</sub>H<sub>5</sub> Fc), 4.04 (dt,  $J_{H,H}$  = 12.6, 2.4 Hz, 1H, H5'), 3.88 (ddd,  $J_{H,H}$  = 11.8, 9.0, 2.4 Hz, 1H, H5'), 3.52 (dd,  $J_{H,H}$  = 9.0, 2.4 Hz, 1H, OH), 3.20 (dt,  $J_{H,H}$  = 13.8, 8.4 Hz, 1H, H2'), 2.92 (dq,  $J_{H,H}$  = 13.8, 6.3, 3.0 Hz, 1H, H2'), 1.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub> thymine) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 163.4, 150.4, 150.3, 139.0, 111.5, 91.6, 85.9, 75.4, 74.3, 69.7, 69.6, 69.1, 67.4, 67.3, 62.7, 60.3, 36.6, 29.8, 12.5 ppm. MS (TOF ES+): m/z = 604.0143 (M + H<sup>+</sup>) (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>IFe: 604.0144). FTIR (KBr  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>]): 3391 (OH), 3082, 2926, 1689 (C=O), 1468, 1410, 1272, 1228, 1105, 1050, 879. Anal. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>IFe: C, 43.81%; H, 3.68%; N, 11.61%. Found: C, 43.85%; H, 3.61%; N, 11.64%.

3'-Deoxy-3'-(4-ferrocenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)thymidine (1c). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 11.37 (s, 1H, NH thymine), 8.37 (s, 1H, H 1,2,3-triazole), 7.83 (s, 1H, H6 thymine), 6.44 (t,  $J_{\rm H,H}$ = 6.6 Hz, 1H, H1'), 5.33 (m, 1H, H3'), 5.30 (t,  $J_{\rm H,H}$  = 4.8 Hz, 1H, OH), 4.70 (s, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.31 (s, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.24 (m, 1H, H4'), 4.05 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub> Fc), 3.72 (m, 1H, H5'), 3.65 (m, 1H, H5'), 2.77 (m, 1H, H2'), 2.68 (m, 1H, H2'), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub> thymine) pm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 163.7, 150.4, 145.5, 136.2, 120.1, 109.6, 84.4, 83.8, 75.7, 69.2, 68.2, 66.4, 66.3, 60.7, 59.1, 37.0, 12.2 ppm. MS (TOF ES+): m/z = 478.1169 (M + H<sup>+</sup>) (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Fe: 478.1178). FTIR (KBr  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>]): 3180, 3115, 3053, 2949, 2835, 1693 (C=O), 1463, 1277, 1039. Anal. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Fe: C, 55.36%; H, 4.86%; N, 14.67%. Found: C, 55.24%; H, 4.90%; N, 14.39%.

Synthesis of 1c. Ethynylferrocene (95 mg, 0.45 mmol, 1.2 equiv), sodium ascorbate (59 mg, 0.30 mmol, 0.8 equiv), and  $CuSO_4 \cdot SH_2O$  (20 mg, 0.08 mmol, 0.2 equiv) were added to a stirred solution of AZT (99 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv) in 4 mL of THF/H<sub>2</sub>O (1/1 v/v). The resulting reaction mixture was stirred at 60 °C for 6 h. Then, all volatiles were evaporated under reduced pressure and subsequently treated with 15 mL of DCM. The resulting suspension was filtered off through a Schott funnel, and the yellow filtrate was washed with 150 mL of distilled water and 30 mL of DCM. The resulting material was dried under reduced pressure overnight to afford an analytically pure sample as a yellow crystalline solid in 69% (122 mg) yield.

Synthesis of 2a-c. A Schlenk tube charged with 3-azidopropionylferrocene (150 mg, 0.53 mmol, 1.0 equiv), ethynylferrocene (223 mg, 1.06 mmol, 2.0 equiv), CuI (141 mg, 0.74 mmol, 1.4 equiv), and N-bromosuccinimide (112 mg, 0.63 mmol, 1.2 equiv) was flushed with argon. Then, anhydrous THF (6 mL) and N,N-diisopropylethylamine (0.09 mL, 0.53 mmol, 1.0 equiv) were added. The resulting reaction mixture was protected against light and stirred at ambient temperature for 24 h. Then, 60 mL of 2% aqueous solution of hydrogen chloride was added and the mixture was extracted with dichloromethane  $(2 \times 25 \text{ mL})$ . The organic layer was separated, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and transferred to a round-bottomed flask, and all volatiles were evaporated under reduced pressure. After evaporation, the remaining oil was subjected to column chromatography on SiO<sub>2</sub> (ethyl acetate/*n*-hexane 2:3 v/v). Two fractions were collected. The first fraction contained a mixture of compounds 2a and 2b, whereas the second contained compound 2c. Compound 2c was obtained as an orange crystalline solid in 15% (39 mg) yield following crystallization from a mixture of dichloromethane/n-hexane. The mixture of compounds 2a and 2b was subjected to column chromatography on SiO<sub>2</sub> (dichloromethane/ethyl acetate/acetone 300:7:2 v/v/v). Two fractions were collected. The first fraction contained compound 2a, and the second contained compound 2b. Chromatographically purified products were crystallized from a mixture of dichloromethane/n-hexane to afford analytically pure samples. Compound 2a was obtained as an orange crystalline solid in 22% (83 mg) yield, and compound 2b was obtained as an orange crystalline solid in 24% (78 mg) yield.

1-(3-Propionylferrocenyl)- $\overline{4}$ -ferrocenyl-5-ethynylferrocenyl-1H-1,2,3-triazole (**2a**). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 4.94 (pt,

1-(3-Propionyloferrocenyl)-4-ferrocenyl-5-iodo-1H-1,2,3-triazole (**2b**). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 4.91 (pt,  $J_{\rm H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.84 (pt,  $J_{\rm H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.66 (t,  $J_{\rm H,H}$  = 6.6 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 4.60 (pt,  $J_{\rm H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.36 (pt,  $J_{\rm H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.36 (pt,  $J_{\rm H,H}$  = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.10 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub> Fc), 3.48 (t,  $J_{\rm H,H}$  = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C(=O)) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 199.8, 148.0, 80.2, 78.3, 75.5, 72.4, 69.6, 69.2, 69.1, 68.4, 66.6, 45.2, 38.2 ppm. MS (TOF ES+): *m/z* = 619.9589 (M + H<sup>+</sup>) (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>OIFe<sub>2</sub>: 619.9585). FTIR (KBr  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>]): 3084, 2952, 2922, 2852, 1669, 1657, 1566, 1455, 1399, 1252, 1223, 1105, 1065, 998, 878, 817. Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>OIFe<sub>2</sub>: C, 48.50%; H, 3.58%; N, 6.79%. Found: C, 48.59%; H, 3.36%; N, 6.64%.

1-(3-Propionyloferrocenyl)-4-ferrocenyl-1H-1,2,3-triazole (2c). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 8.19 (s, 1H, H 1,2,3-triazole), 4.83 (pt, *J*<sub>H,H</sub> = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.68 (pt, *J*<sub>H,H</sub> = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.67 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, 2H, N–CH<sub>2</sub>), 4.59 (pt, *J*<sub>H,H</sub> = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.28 (pt, *J*<sub>H,H</sub> = 1.8 Hz, 2H, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub> Fc), 4.14 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub> Fc), 4.01 (s, 5H, C<sub>5</sub>H<sub>5</sub> Fc), 3.44 (t, *J*<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C(=O)) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 200.8, 146.3, 120.9, 78.1, 75.6, 72.9, 70.0, 69.6, 69.3, 68.6, 66.7, 44.6, 39.6 ppm. MS (TOF ES+): *m/z* = 494.0620 (M + H<sup>+</sup>) (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>OFe<sub>2</sub>: 494.0618). FTIR (KBr ν [cm<sup>-1</sup>]): 3107, 3075, 1659 (C=O), 1452, 1376, 1252, 1105, 1080, 1049, 999, 823, 812, 482. Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>OFe<sub>2</sub>: C, 60.89%; H, 4.70%; N, 8.52%. Found: C, 60.71%; H, 4.95%; N, 8.61%.

Synthesis of 2c. A Schlenk tube charged with 3-azidopropanoylferrocene (71 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv), ethynylferrocene (63 mg, 0.30 mmol, 1.2 equiv), sodium ascorbate (40 mg, 0.20 mmol, 0.8 equiv), and  $CuSO_4$ · $SH_2O$  (13 mg, 0.05 mmol, 0.2 equiv) was flushed with argon. Then, 6 mL of THF/H<sub>2</sub>O (1/1 v/v) was added. The resulting reaction mixture was stirred at ambient temperature for 24 h. Then, 50 mL of water was added and the mixture was extracted with chloroform (3 × 25 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and transferred to a round-bottomed flask, and all volatiles were evaporated under reduced pressure. After evaporation, the remaining oil was subjected to column chromatography on SiO<sub>2</sub> (chloroform/ethyl acetate 15:2 v/v). Chromatographically purified product was crystallized from a mixture of dichloromethane/*n*-hexane to afford an analytically pure sample. Compound 2c was obtained as an orange crystalline solid in 75% (93 mg) yield.

X-ray Structure Analysis. Good-quality single crystals of 1a, 2a, and 2c were selected for the X-ray diffraction experiments at T =100(2) K. Diffraction data were collected on an Agilent Technologies SuperNova Dual Source diffractometer with CuK $\alpha$  radiation ( $\lambda$  = 1.54184 Å) using CrysAlis RED software.<sup>98</sup> Analytical absorption correction using a multifaceted crystal model based on expressions derived by Clark and Reid (1a and 2c) and numerical absorption correction based on Gaussian integration over a multifaceted crystal model (2a) were applied.<sup>98,99</sup> The structural determination procedure was carried out using the SHELX package.<sup>100</sup> The structures were solved with an intrinsic phasing method, and then, successive leastsquares refinement was carried out based on the full-matrix leastsquares method on  $F^2$  using the SHELXL program.<sup>100</sup> All H-atoms were positioned geometrically with C-H bond lengths equal to 0.93, 0.96, 0.97, and 0.98 Å for the aromatic, methyl, methylene, and methine H-atoms, respectively, and constrained to ride on their

parent atoms with  $U_{iso}(H) = xU_{eq}(C)$ , where x = 1.2 for the aromatic, methylene, and methine and x = 1.5 for the methyl H-atoms. In the case of 1a, the N-H and O-H bond lengths were equal to 0.86 and 0.82 Å for the amine and hydroxyl H-atoms, respectively, and constrained to ride on their parent atoms with  $U_{iso}(H) = xU_{eq}(N,O)$ , where x = 1.2 for the amine and 1.5 for the hydroxyl H-atoms, respectively. Nine out of twelve cyclopentadienyl rings in 2a were subject to RIGU restraints, whereas on the N1A, N2A, N2B, C4B, and C26B atoms, ISOR restraints were additionally applied. These types of restraints were also used during refinement of 1a. RIGU was applied to restrain cyclopentadienyl moiety defined by atoms C20A-C24A, while atoms C19A-C24A, C13B, and C20B were subject to ISOR restraints. In the case of 1a, a few distinct peaks on the difference Fourier map are indicating the presence of disordered solvent molecules. All attempts to model disordered solvents used for crystallization failed. Therefore, solvent contribution has been removed by applying the appropriate MASK procedure in the Olex2 program.<sup>101</sup> The calculated void volume was approximately 947.9 Å<sup>3</sup> occupied by 187.0 electrons per unit cell. The figures for this publication were prepared using the Olex2 program.<sup>11</sup>

Electrochemistry. Measurements on 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> solutions of analytes 1a, 1c, 2a, and 2c in anhydrous dichloromethane solutions, containing 0.1 mol·L<sup>-1</sup>  $[NBu_4][B(C_6F_5)_4]$  as the supporting electrolyte, were conducted under an atmosphere of argon at 25 °C. A threeelectrode cell, which utilized a Pt auxiliary electrode, a glassy carbon working electrode (surface area 0.031  $\text{cm}^2$ ), and an Ag/Ag<sup>+</sup> (0.01  $mol \cdot L^{-1}$  AgNO<sub>3</sub>) reference electrode, was used as described in refs 82 and 102-104. Successive experiments under the same experimental conditions showed that all formal potentials were reproducible within  $\pm 5$  mV. Experimental potentials were referenced against an Ag/Ag<sup>+</sup> reference electrode, but results presented are referenced against the ferrocene [FcH/FcH<sup>+</sup> couple = 220 mV vs Ag/Ag<sup>+</sup>,  $\Delta E_p = 61$  mV; FcH = Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>] as an internal standard.<sup>82</sup> When decamethylferrocene [Fc\* = Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>Me<sub>5</sub>)<sub>2</sub>] was used as an internal standard, the experimentally measured potentials were converted into E vs  $FcH/FcH^+$  (under our conditions, the  $Fc^*/Fc^{*+}$  couple was at -614 mV vs FcH/FcH<sup>+</sup>,  $\Delta E_{\rm p} = 60$  mV).

**Spectroelectrochemistry.** The spectroelectrochemical measurements of **1a** and **2a** in anhydrous tetrahydrofuran containing  $[NBu_4][B(C_6F_5)_4]$  (0.1 mol·L<sup>-1</sup>) as the supporting electrolyte were performed at 25 °C in an optically transparent thin-layer electrochemistry (OTTLE) cell<sup>87</sup> with quartz windows (UV–vis/NIR, compounds **1a** and **2a**) by a Varian Cary 5000 spectrophotometer or CaF<sub>2</sub> windows (IR, **1a**) with a Nicolet IR200 spectrometer (Thermo Fisher). Between the spectroscopic measurements, the applied potentials were increased stepwise using step heights of 25, 50, or 100 mV. At the end of the measurements, the analyte was reduced at –500 mV vs Ag/AgCl for 30 min, and an additional spectrum was recorded to prove the reversibility of the oxidations.

**Computational Details.** Structures of 1a, 1c, 2a, and 2c (oxidized/reduced forms) were optimized using the gradient corrected pure functional BLYP, with an effective core potential (ECP) basis set from the Los Alamos National Laboratory, LANL2DZ,<sup>90</sup> on Fe atoms and with 6-31+G(d) basis set on other elements. All computational experiments were conducted using Gaussian 16 software.<sup>91</sup> The search for conformers was performed by molecular modeling software PCMODEL 10.0 (using the MMX force field).<sup>105</sup> Frequency calculations were performed to calculate thermal corrections to Gibbs free energies (at 298.15 K). Implicit solvation was modeled using the SCRF = SMD continuum solvation method at the (U)BLYP/6-31+G(d)/LANL2DZ level in dichloromethane ( $\varepsilon = 8.93$ ) as a model solvent.<sup>106</sup>

**EPR Measurements.** EPR measurements were performed using a CW X-band EMXplus spectrometer with a PremiumX microwave bridge and a high-sensitivity resonator (Bruker, Germany). The EPR spectra were registered at 100 kHz modulation and a microwave power of 5 mW at room temperature. An NMR teslameter (Bruker, Germany) was used for precise g value determination. For *in situ* EPR spectroelectrochemical experiments, a three-electrode EPR flat cell was used. A laminated gold mesh (Goodfellow, U.K.) as the working

electrode, an AgCl-coated silver wire as the pseudoreference electrode, and a platinum wire as the counter electrode were used in spectroelectrochemical experiments. The 0.1 M  $[N(Bu)_4][B-(C_6F_5)_4]$  in THF (anhydrous,  $\geq 99.9\%$ , inhibitor-free, Sigma-Aldrich) was used as the supporting electrolyte. Cell assembling and the measurements were performed under an inert (nitrogen) atmosphere. In the spin-trapping experiments, dimethylformamide (DMF, anhydrous,  $\geq 99.8\%$ , Sigma-Aldrich) solutions were bubbled with air, oxygen, or nitrogen for 2 h. 50 mM spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO,  $\geq 99.0\%$  (GC), Dojindo, Japan) and 1.5 mM ferrocene compound were added to the solution one after another.

**Biological Assays.** *Cells.* Human non-small-cell lung cancer cell lines A549 and H1975 and the human bronchial epithelial BEAS-2B cell line were purchased from ATCC (Manassas, VA). Cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 media supplemented with 10% v/v fetal bovine serum, 100 U·mL<sup>-1</sup> penicillin, and 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> streptomycin. Cells were grown in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

**Reactive Oxygen Species (ROS) Generation.** Cells were incubated for 1 h in a fresh medium or in a medium containing 20  $\mu$ M of compounds 1a and 1c and tamoxifen, 5-fluorouracil, and cisplatin, alone or together with 50  $\mu$ M N-acetyl cysteine (NAC). Then, detached cells were resuspended in 0.5 mL of phosphate-buffered saline (PBS) containing 10  $\mu$ M·L<sup>-1</sup> fluorescent probe 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate-acetyl ester (CM-H2DCFDA) and incubated for 15 min at 37 °C. Afterward, the incubation cells were centrifuged at 13,000 rpm for 30 s and resuspended in 0.5 mL of PBS. The fluorescence of each sample (index of ROS levels) was read at 488 nm ( $\lambda_{\text{excitation}}$ ) and 520 nm ( $\lambda_{\text{emission}}$ ). The results were expressed as DCF fluorescence per mg cell proteins normalized  $\nu$ s control.

Cell Viability with the Crystal Violet Assay. Crystal violet staining was used to assess cell viability. Cells were seeded in a 24-well plate and incubated with 20  $\mu$ M concentration of compounds 1a, 1c, 2a, and 2c and tamoxifen, 5-fluorouracil, and cisplatin, with or without 50  $\mu$ M NAC. After 72 h, the medium was discarded and cells were stained for 30 min with 5% w/v crystal violet solution in 66% v/ v methanol, 200  $\mu$ L per well. After staining, the crystal violet solution was removed, and the 24-well plate was washed with water to eliminate the excess solution. When dried, the plates were photographed. Quantitation of crystal violet staining was performed after solubilizing the dye in 10% acetic acid, 400  $\mu$ L per well, and reading the absorbance of each well at 540 nm (HT Synergy 96-well microplate reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). The relative absorbance of untreated cells was considered as 100% viability; results were expressed as a percentage of viable cells vs untreated cells. To calculate  $IC_{50}$ , cells were incubated 72 h with increasing concentrations (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM) of compounds 1a, 1c, 2a, and 2c and tamoxifen, 5-fluorouracil, and cisplatin.  $\mathrm{IC}_{\mathrm{50}}$  was defined as the concentration of each compound that reduced the cell viability to 50% compared to untreated cells, producing 50% cell death (GraphPad Prism, version 5).

#### ASSOCIATED CONTENT

#### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.inorgchem.2c01110.

Spectra (<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/NMR), EPR spectra, crystal data, and biological data (PDF)

#### Accession Codes

CCDC 2158730–2158732 contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/data\_request/cif, or by emailing data\_request@ccdc.cam.ac.uk, or by contacting The
Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033.

CCDC 2158732 (1a), 2158730 (2a), and 2158731 (2c) contain the supporting crystallographic data for this paper. The data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Center via www.ccdc.cam.ac.uk/ structures or by emailing data\_request@ccdc.cam.ac.uk or by contacting The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, U.K.; fax: +44 1223 336033.

### AUTHOR INFORMATION

### **Corresponding Author**

Konrad Kowalski – Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Łódź, 91-403 Łódź, Poland; orcid.org/0000-0003-0600-3205; Email: konrad.kowalski@chemia.uni.lodz.pl, kondor15@ wp.pl

### Authors

**Przemysław Biegański** – Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Łódź, 91-403 Łódź, Poland

Eduard Kovalski – Institut für Chemie, Anorganische Chemie, Fakultät für Naturwissenschaften, Technische Universität Chemnitz, D-09107 Chemnitz, Germany

**Noel Israel** – Leibniz Institute for Solid State and Materials Research (IFW Dresden), D-01069 Dresden, Germany

**Evgenia Dmitrieva** – Leibniz Institute for Solid State and Materials Research (IFW Dresden), D-01069 Dresden, Germany; © orcid.org/0000-0001-7490-617X

Damian Trzybiński – Faculty of Chemistry, Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw, 02-089 Warszawa, Poland

Krzysztof Woźniak – Faculty of Chemistry, Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw, 02-089 Warszawa, Poland; o orcid.org/0000-0002-0277-294X

Valerije Vrček – Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia; o orcid.org/0000-0003-1624-8126

Martina Godel – Department of Oncology, University of Torino, 10126 Turin, Italy

Chiara Riganti – Department of Oncology, University of Torino, 10126 Turin, Italy; Occid.org/0000-0001-9787-4836

Joanna Kopecka – Department of Oncology, University of Torino, 10126 Turin, Italy

Heinrich Lang – Institut für Chemie, Anorganische Chemie, Fakultät für Naturwissenschaften, Technische Universität Chemnitz, D-09107 Chemnitz, Germany; MAIN Research Center, Technische Universität Chemnitz, 09126 Chemnitz, Germany; Orcid.org/0000-0001-9744-7906

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acs.inorgchem.2c01110

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

### ACKNOWLEDGMENTS

K.K. thanks the National Science Center in Cracow, Poland (grant OPUS UMO-2018/29/B/ST5/00055) for financial support. Crystallographic measurements were performed at the Biological and Chemical Research Centre, University of

Warsaw, established within the project cofinanced by the European Union from the European Regional Development Fund under the Operational Programme Innovative Economy, 2007–2013. The X-ray diffraction data were collected at the Core Facility for Crystallographic and Biophysical Research to support the development of medicinal products sponsored by the Foundation for Polish Science (FNP). The research plan has received funding from the Italian Association of Cancer Research (IG21408 project to C.R.); Intramural Grant Funding 2020 (J.K.).

### REFERENCES

(1) Aguirre-Etcheverry, P.; O'Hare, D. Electronic Communication through Unsaturated Hydrocarbon Bridges in Homobimetallic Organometallic Complexes. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4839–4864.

(2) Kaim, W.; Sarkar, B. Mixed valency in ruthenium complexes— Coordinative aspects. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 584–594.

(3) Ceccon, A.; Santi, S.; Orian, L.; Bisello, A. Electronic communication in heterobinuclear organometallic complexes through unsaturated hydrocarbon bridges. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 683–724.

(4) Glover, S. D.; Goeltz, J. C.; Lear, B. J.; Kubiak, C. P. Mixed Valency at the Nearly Delocalized Limit: Fundamentals and Forecast. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 2009, 585–594.

(5) Barlow, S.; O'Hare, D. Metal–Metal Interactions in Linked Metallocenes. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 637–670.

(6) D'Alessandro, D. M.; Keene, F. R. Intervalence charge Transfer (IVCT) in Trinuclear and Tetranuclear Complexes of Iron, Ruthenium, and Osmium. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2270–2298.

(7) Ward, M. D. Metal-Metal Interactions in Binuclear Complexes Exhibiting Mixed Valency; Molecular Wires and Switches. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 121–134.

(8) Paul, F.; Lapinte, C. Organometallic Molecular Wires and Other Nanoscale-sized Devices. An Approach using the Organoiron (dppe)Cp\*Fe Building Block. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *178–180*, 431–509.

(9) Lapinte, C. Magnetic perturbation of the redox potentials of localized and delocalized mixed-valence complexes. *J. Organomet. Chem.* **2008**, 693, 793–801.

(10) Ratner, M.; Jortner, J. *Molecular Electronics;* Blackwell Science: Malden, MA, 1997.

(11) Carroll, R. L.; Gorman, C. B. The Genesis of Molecular Electronics. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 4378–4400.

(12) Robertson, N.; McGowan, C. A. A comparison of potential molecular wires as components for molecular electronics. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 96–103.

(13) Collier, P. C.; Wong, W. E.; Belohradský, M.; Raymo, M. F.; Stoddart, F. J.; Kuekes, J. P.; Williams, S. R.; Heath, R. Electronically Configurable Molecular-Based Logic Gates. *Science* **1999**, *285*, 391– 394.

(14) Winter, R. F. Half-Wave Potential Splittings  $\Delta E_{1/2}$  as a Measure of Electronic Coupling in Mixed-Valent Systems: Triumphs and Defeats. *Organometallics* **2014**, *33*, 4517–4536.

(15) Kaim, W.; Fiedler, J. Spectroelectrochemistry: the best of two worlds. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3373–3382.

(16) Kowalski, K.; Linseis, M.; Winter, R. F.; Zabel, M.; Záliš, S.; Kelm, H.; Krüger, H.-J.; Sarkar, B.; Kaim, W. Charge Delocalization in a Heterobimetallic Ferrocene-(Vinyl)Ru(CO)Cl( $P^{i}Pr_{3}$ )<sub>2</sub> System. Organometallics **2009**, 28, 4196–4209.

(17) Allen, G. C.; Hush, N. S. Intervalence Transfer Absorption. Part 1. Qualitative Evidence for Intervalence-Transfer Absorption in Inorganic Systems in Solution and in the Solid State. *Progress in Inorganic Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 1967; Vol. 8, pp 357– 389.

(18) Hush, N. S. Intervalence-Transfer Absorption. Part 2. Theoretical Considerations and Spectroscopic Data. *Progress in Inorganic Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 1967; Vol. 8, pp 391–444.

(19) Robin, M. B.; Day, P. Mixed Valence Chemistry-A Survey and Classification. *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry*; Elsevier, 1968; Vol. 10, pp 247–422.

(20) Kealy, T. J.; Pauson, P. L. A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature* **1951**, *168*, 1039–1040.

(21) Wilkinson, G.; Rosenblum, M.; Whiting, M. C.; Woodward, R. B. The structure of iron bis-cyclopentadienyl. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 2125–2126.

(22) Long, N. J. Metallocenes—An Introduction to Sandwich Complexes; Blackwell Science: Oxford, 1998.

(23) Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. Organometallic anticancer compounds. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3–25.

(24) Štěpnička, P., Ed. Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules; Wiley-VCH: Chichester, 2008.

(25) Heinze, K.; Lang, H. Ferrocene—Beauty and Function. Organometallics 2013, 32, 5623-6146.

(26) Dai, L.-X.; Hou, X.-L. Chiral Ferrocenes in Asymmetric Catalysis; Wiley-VCH: Weinheim, 2010.

(27) Patra, M.; Gasser, G. The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1*, No. 0066.

(28) Manners, I., Ed. Synthetic Metal-Containing Polymers; Wiley-VCH: Weinheim, 2004.

(29) Štěpnička, P. Eur. J. Inorg. Chem., 2021. Special Collection: Ferrocene Chemistry.

(30) Bertuzzi, D. L.; Perli, G.; Braga, C. B.; Ornelas, C. Synthesis, characterization, and anticancer activity of folate  $\gamma$ -ferrocenyl conjugates. *New J. Chem.* **2020**, *44*, 4694–4703.

(31) Biegański, P.; Godel, M.; Riganti, C.; Kawano, D. F.; Kopecka, J.; Kowalski, K. Click ferrocenyl-erlotynib conjugates active against erlotinib-resistant non-small cell lung cells *in vitro. Bioorg. Chem.* **2022**, *119*, No. 105514.

(32) Sharma, B.; Kumar, V. Has Ferrocene Really Delivered Its Role in Accentuating the Bioactivity of Organic Scaffolds? *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 16865–16921.

(33) Vessières, A.; Wang, Y.; McGlinchey, M. J.; Jaouen, G. Multifaceted chemical behaviour of metallocene (M = Fe, Os) quinone methides. Their contribution to biology. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, 430, No. 213658.

(34) Chellan, P.; Sadler, P. J. Enhancing the Activity of Drugs by Conjugation to Organometallic Fragments. *Chem.—Eur. J.* **2020**, *26*, 8676–8688.

(35) Sansook, S.; Hassell-Hart, S.; Ocasio, C.; Spencer, J. Ferrocenes in medicinal chemistry; a personal perspective. *J. Organomet. Chem.* **2020**, 905, No. 121017.

(36) Connelly, N. G.; Geiger, W. E. Chemical Redox Agents for Organometallic Chemistry. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 877–910.

(37) Hildebrandt, A.; Lang, H. (Multi)ferrocenyl Five-Membered Heterocycles: Excellent Connecting Units for Electron Transfer Studies. *Organometallics* **2013**, *32*, 5640–5653.

(38) Diallo, A. K.; Absalon, C.; Ruiz, J.; Astruc, D. Ferrocenyl-Terminated Redox Stars: Synthesis and Electronic Effects in Mixed-Valence Stabilization. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 629–641.

(39) Pfaff, U.; Filipczyk, G.; Hildebrandt, A.; Korb, M.; Lang, H. 1,3,5-Triferrocenyl-2,4,6-tris(ethynylferrocenyl)-benzene – a new member of the family of multiferrocenyl-functionalized cyclic systems. *Dalton Trans.* **2014**, 43, 16310–16321.

(40) Pfaff, U.; Hildebrandt, A.; Schaarschmidt, D.; Hahn, T.; Liebing, S.; Kortus, J.; Lang, H. Di- and Triferrocenyl (Hetero)-Aromatics: Synthesis, Characterization, (Spectro-)Electrochemistry, and Calculations. *Organometallics* **2012**, *31*, 6761–6771.

(41) Hildebrandt, A.; Schaarschmidt, D.; Lang, H. Electronically Intercommunicating Iron Centers in Di- and Tetraferrocenyl Pyrroles. *Organometallics* **2011**, *30*, 556–563.

(42) Korb, M.; Pfaff, U.; Hildebrandt, A.; Rüffer, T.; Lang, H. 3,4-Ferrocenyl-Functionalized Pyrroles: Synthesis, Structure, and (Spectro)Electrochemical Studies. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 2014, 1051–1061.

(43) Pfaff, U.; Hildebrandt, A.; Schaarschmidt, D.; Rüffer, T.; Low, P. J.; Lang, H. Molecular Wires using (Oligo)pyrroles as Connecting

Units: An Electron Transfer Study. Organometallics 2013, 32, 6106–6117.

pubs.acs.org/IC

(44) Speck, J. M.; Schaarschmidt, D.; Lang, H. Atropisomeric 3,3',4,4',5,5'-Hexaferrocenyl-2,2'-bithiophene: Synthesis, Solid-State Structure, and Electrochemistry. *Organometallics* **2012**, *31*, 1975–1982.

(45) Hildebrandt, A.; Rüffer, T.; Erasmus, E.; Swarts, J. C.; Lang, H. A Star-Shaped Supercrowded 2,3,4,5-Tetraferrocenylthiophene: Synthesis, Solid-State Structure, and Electrochemistry. *Organometallics* **2010**, *29*, 4900–4905.

(46) Speck, J. M.; Korb, M.; Rüffer, T.; Hildebrandt, A.; Lang, H. Substituent Influence on Charge Transfer Interactions in  $\alpha,\alpha'$ -Diferrocenylthiophenes. *Organometallics* **2014**, 33, 4813–4823.

(47) Speck, J. M.; Claus, R.; Hildebrandt, A.; Rüffer, T.; Erasmus, E.; van As, L.; Swarts, J. C.; Lang, H. Electron Transfer Studies on Ferrocenylthiophenes: Synthesis, Properties, and Electrochemistry. *Organometallics* **2012**, *31*, 6373–6380.

(48) Speck, J. M.; Korb, M.; Schade, A.; Spange, S.; Lang, H. Ferrocenes Bridged by Ethylenediamino Thiophene: Varying Charge Transfer Properties in a Series of 3,4-Di-N-substituted 2,5-Diferrocenyl Thiophenes. *Organometallics* **2015**, *34*, 3788–3798.

(49) Ogawa, S.; Muraoka, H.; Kikuta, K.; Saito, F.; Sato, R. Design of reversible multi-electron redox systems using benzochalcogenophenes containing aryl and/or ferrocenyl fragments. *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 60–69.

(50) Caballero, A.; Lloveras, V.; Curiel, D.; Tárraga, A.; Espinosa, A.; García, R.; Vidal-Gancedo, J.; Rovira, C.; Wurst, K.; Molina, P.; Veciana, J. Electroactive Thiazole Derivatives Capped with Ferrocenyl Units Showing Charge-Transfer Transition and Selective Ion-Sensing Properties: A Combined Experimental and Theoretical Study. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 825–838.

(51) Miesel, D.; Hildebrandt, A.; Korb, M.; Schaarschmidt, D.; Lang, H. Transition-Metal Carbonyl Complexes of 2,5-Diferrocenyl-1-phenyl-1H-phosphole. *Organometallics* **2015**, *34*, 4293–4304.

(52) Miesel, D.; Hildebrandt, A.; Korb, M.; Low, P. J.; Lang, H. Synthesis and (Spectro)electrochemical Behavior of 2,5-Diferrocenyl-1-phenyl-1H-phosphole. *Organometallics* **2013**, *32*, 2993–3002.

(53) Lehrich, S. W.; Hildebrandt, A.; Rüffer, T.; Korb, M.; Low, P. J.; Lang, H. Synthesis, Characterization, Electrochemistry, and Computational Studies of Ferrocenyl-Substituted Siloles. *Organometallics* **2014**, *33*, 4836–4845.

(54) Yu, C. J.; Wan, Y.; Yowanto, H.; Li, J.; Tao, C.; James, M. D.; Tan, C. L.; Blackburn, G. F.; Meade, T. J. Electronic Detection of Single-Base Mismatches in DNA with Ferrocene-Modified Probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11155–11161.

(55) Patolsky, F.; Weizmann, Y.; Willner, I. Redox-Active Nucleic-Acid Replica for the Amplified Bioelectrocatalytic Detection of Viral DNA. J. Am. Chem. Soc. **2002**, 124, 770–772.

(56) Simonova, A.; Magriñá, I.; Sýkorová, V.; Pohl, R.; Ortiz, M.; Havran, L.; Fojta, M.; O'Sullivan, C. K.; Hocek, M. Tuning of Oxidation Potential of Ferrocene for Ratiomeric Redox Labeling and Coding of Nucleotides and DNA. *Chem.—Eur. J.* **2020**, *26*, 1286– 1291.

(57) Jaouen, G.; Vessières, A.; Top, S. Ferrocifen type anti cancer drugs. *Chem. Soc. Rev.* 2015, 44, 8802–8817.

(58) Halliwell, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem. J.* 2007, 401, 1–11.

(59) Hagen, H.; Marzenell, P.; Jentzsch, E.; Wenz, F.; Veldwijk, M. R.; Mokhir, A. Aminoferrocene-Based Prodrugs Activated by Reactive Oxygen Species. J. Med. Chem. 2012, 55, 924–934.

(60) Xu, H.-G.; Schikora, M.; Sisa, M.; Daum, S.; Klemt, I.; Janko, C.; Alexiou, C.; Bila, G.; Bilyy, R.; Gong, W.; Schmitt, M.; Sellner, L.; Mokhir, A. An Endoplasmic Reticulum Specific Pro-amplifier of Reactive Oxygen Species in Cancer Cells. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 11158–11162.

(61) Ott, I.; Kowalski, K.; Gust, R.; Maurer, J.; Mücke, P.; Winter, R. F. Comparative biological evaluation of two ethylene linked mixed binuclear ferrocene/ruthenium organometallic species. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 866–869.

(62) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

(63) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.

(64) Fantoni, N. Z.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. A Hitchhiker's Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids. *Chem. Rev.* 2021, 121, 7122–7154.

(65) Gharpure, S. J.; Naveen, S.; Chavan, R. S.; Padmaja. Regioselective Synthesis of Halotriazoles and their Utility in Metal Catalyzed Coupling Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 2020, 6870– 6886.

(66) Ornelas, C.; Aranzaes, J. R.; Cloutet, E.; Alves, S.; Astruc, D. Click assembly of 1,2,3-triazole-linked dendrimers, including ferrocenyl dendrimers, which sense both oxo anions and metal cations. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 872–877.

(67) Maity, R.; Sarkar, B. Chemistry of Compounds Based on 1,2,3-Triazolylidene-Type Mesoionic Carbenes. *JACS Au* **2022**, *2*, 22–57.

(68) McKenzie, L. K.; El-Khoury, R.; Thorpe, J. D.; Damha, M. J.; Hollenstein, M. Recent progress in non-native nucleic acid modifications. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 5126–5164.

(69) Gerard, B.; Ryan, J.; Beeler, A. B.; Porco, J. A., Jr. Synthesis of 1,4,5-trisubstituted-1,2,3-triazoles by copper-catalyzed cycloaddition-coupling of azides and terminal alkynes. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 6405–6411.

(70) Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy, G.; Yus, M. Copper-Catalysed Multicomponent Click Synthesis of 5-Alkynyl 1,2,3-Triazoles under Ambient Conditions. *Synlett* **2012**, *23*, 2179–2182.

(71) Li, L.; Fan, X.; Zhang, Y.; Zhu, A.; Zhang, G. Controllable Synthesis of Bis(1,2,3-triazole)s and 5-Alkynyl-triazoles via Temperature Effect on Copper-catalyzed Huisgen Cycloaddition. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 9939–9946.

(72) Wang, W.; Wei, F.; Ma, Y.; Tung, C.-H.; Xu, Z. Copper(I)-Catalyzed Three-Component Click/Alkynylation: One-Pot Synthesis of 5-Alkynyl-1,2,3-triazoles. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4158–4161.

(73) Yamamoto, K.; Bruun, T.; Kim, J. Y.; Zhang, L.; Lautens, M. A New Multicomponent Multicatalyst Reaction  $(MC)^2R$ : Chemoselective Cycloaddition and Latent Catalyst Activation for the Synthesis of Fully Substituted 1,2,3-Triazoles. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2644–2647.

(74) Li, L.; Zhang, G.; Zhu, A.; Zhang, L. A Convenient Preparation of 5-Iodo-1,4-disubstituted-1,2,3-triazole: Multicomponent One-Pot Reaction of Azide and Alkyne Mediated by CuI-NBS. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 3630–3633.

(75) Skiba, J.; Yuan, Q.; Hildebrandt, A.; Lang, H.; Trzybiński, D.; Woźniak, K.; Balogh, R. K.; Gyurcsik, B.; Vrček, V.; Kowalski, K. Ferrocenyl GNA Nucleosides: A Bridge between Organic and Organometallic Xeno-nucleic Acids. *ChemPlusChem* **2018**, *83*, 77–86. (76) Anisimov, I.; Saloman, S.; Hildebrandt, A.; Lang, H.; Trzybiński, D.; Woźniak, K.; Šakić, D.; Vrček, V.; Kowalski, K. 1,1'-Bis(thymine)ferrocene Nucleoside: Synthesis and Study of its Stereoselective Formation. *ChemPlusChem* **2017**, *82*, 859–866.

(77) Cremer, D.; Pople, J. A. General definition of ring puckering coordinates. J. Am. Chem. Soc. **1975**, 97, 1354–1358.

(78) Rao, S. T.; Westhof, E.; Sundaralingam, M. Exact method for the calculation of pseudorotation parameters P,  $\tau_{\rm m}$  and their errors. A comparison of the Altona-Sundaralingam and Cremer-Pople treatment of puckering of five-membered rings. *Acta Crystallogr., Sect. A* **1981**, 37, 421–425.

(79) Gericke, H. J.; Barnard, N. I.; Erasmus, E.; Swarts, J. C.; Cook, M. J.; Aquino, M. A. S. Solvent and electrolyte effects in enhancing the identification of intramolecular electronic communication in a multi redox-active diruthenium tetraferrocenoate complex, a triple-sandwiched dicadmium phthalocyanine and a ruthenocene-containing  $\beta$ -diketone. *Inorg. Chim. Acta* **2010**, 363, 2222–2232.

(80) LeSuer, R. J.; Geiger, W. E. Improved Electrochemistry in Low-Polarity Media Using Tetrakis(pentafluorophenyl)borate Salts as Supporting Electrolytes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 248–250.

(81) Hildebrandt, A.; Miesel, D.; Yuan, Q.; Freytag, J.; Mahrholdt, J.; Lang, H. Anion and solvent dependency of the electronic coupling strength in mixed valent class II systems. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 13162–13168.

(82) Gritzner, G.; Kuta, J. Recommendations on reporting electrode potentials in nonaqueous solvents. *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 461–466.

(83) Verschoor-Kirss, M.; Kreisz, J.; Feighery, W.; Reiff, W. M.; Frommen, C. M.; Kirss, R. U. Synthesis and chemical oxidation of 3ferrocenylpyrrole and ferrocenyl-substituted triazoles: Iron versus ligand based oxidation. *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 3262–3269.

(84) Romero, T.; Orenes, R. A.; Tárraga, A.; Molina, P. Preparation, Structural Characterization, Electrochemistry, and Sensing Properties toward Anions and Cations of Ferrocene-Triazole Derivatives. *Organometallics* **2013**, *32*, 5740–5753.

(85) Djaković, S.; Maračič, S.; Lapić, J.; Kovalski, E.; Hildebrandt, A.; Lang, H.; Vrček, V.; Raić-Malić, S.; Cetina, M. Triazole-tethered ferrocene-quinoline conjugates: solid-state structure analysis, electrochemistry and theoretical calculations. *Struct. Chem.* **2021**, *32*, 2291–2301.

(86) Krejčik, M.; Daněk, M.; Hartl, F. Simple construction of an infrared optically transparent thin-layer electrochemical cell: Applications to the redox reactions of ferrocene,  $Mn_2(CO)_{10}$  and Mn- $(CO)_3(3,5-di-t-butyl-catecholate)^-$ . J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. **1991**, 317, 179–187.

(87) Miesel, D.; Hildebrandt, A.; Rüffer, T.; Schaarschmidt, D.; Lang, H. Electron-Transfer Studies of trans-Platinum Bis(acetylide) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 2014, 5541–5553.

(88) Strehler, F.; Rüffer, T.; Noll, J.; Schaarschmidt, D.; Hildebrandt, A.; Lang, H. Z. Cationic tri(ferrocenecarbonitrile)silver(I). *Z. Naturforsch.* **2018**, *73*, 759–764.

(89) Since the exact electron transfer distance and transition dipole moment was unknown, the geometrical distance between the redox centers was used for  $r_{ab}$  instead. Hence,  $H_{ab}$  is only an approximation.

(90) Hay, P. J.; Wadt, W. R. *Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 299–310.

(91) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian 16, revision C.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2016. With GaussView program used for structure drawing and visualization (ref: GaussView, version 6; Dennington, Roy; Keith, Todd A.; Millam, John M. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2016). (92) Buettner, G. R. Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts.

Free Radical Biol. Med. **1987**, 2, 259–303.

(93) Mišik, V.; Riesz, P. EPR study of free radicals induced by ultrasound in organic liquids. Probing the temperatures of cavitation regions. *Ultrason. Sonochem.* **1996**, *3*, 25–37.

(94) Zeh, G.; Haines, P.; Miehlich, M. E.; Kienz, T.; Neidlinger, A.; Friedrich, R. P.; Alexiou, C.; Hampel, F.; Guldi, D. M.; Meyer, K.; Schatz, J.; Heinze, K.; Mokhir, A. Anticancer Effect of an Electronically Couplet Oligoferrocene. *Organometallics* **2020**, *39*, 3112–3120.

(95) Schumacker, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 175–176.

(96) Kerksick, C.; Willoughby, D. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. J. Int. Soc. Sports Nutr. 2005, 2, 38–44.

(97) Pavlogradskaya, L. V.; Shemyakina, D. A.; Eroshenko, D. V.; Borisova, I. A.; Glushkov, V. A. Synthesis of Di- and Triterpenoid Ferrocenyltriazoles. *Russ. J. Org. Chem.* **2018**, *54*, 126–130.

(98) CrysAlis CCD and CrysAlis RED, Oxford Diffraction; Oxford Diffraction Ltd.: Yarnton, 2008.

(99) Clark, R. C.; Reid, J. S. The analytical calculation of absorption in multifaceted crystals. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **1995**, *51*, 887–897.

(100) Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr., Sect. C: Struct. Chem.* **2015**, *71*, 3–8.

(101) Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42*, 339–341.

(102) LeSuer, R. J.; Buttolph, C.; Geiger, W. E. Comparison of the Conductivity Properties of the Tetrabutylammonium Salt of Tetrakis-(pentafluorophenyl)borate Anion with Those of Traditional Supporting Electrolyte Anions in Nonaqueous Solvents. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6395–6401.

(103) Hildebrandt, A.; Miesel, D.; Lang, H. Electrostatic interactions within mixed-valent compounds. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, 371, 56–66.

(104) Miesel, D.; Hildebrandt, A.; Lang, H. Molecular electrochemistry of multi-redox functionalized 5-membered heterocycles. *Curr. Opin. Electrochem.* **2018**, *8*, 39–44.

(105) Gilbert, K. E. *Pcmodel*, version 10.0; Serena Software: Bloomington, IN, 2014.

(106) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378–6396.

## **Recommended by ACS**

pubs.acs.org/IC

### Influence of Polyoxovanadate and Phthalocyanine on 4f Electron Transfer in Gold-Confined Monolayers Probed with EGaIn Top Contacts

Saurabh Soni, Ryan C. Chiechi, et al. DECEMBER 07, 2023 ACS APPLIED NANO MATERIALS

READ 🗹

# HNODThia: A Promising Chelator for the Development of <sup>64</sup>Cu Radiopharmaceuticals

Ina Hierlmeier, Mark D. Bartholomä, et al. JULY 24, 2023 INORGANIC CHEMISTRY

D	с.	Λ Ι		
n	C/	-	$\mathcal{D}$	Ľ

#### Gd(III) and Yb(III) Complexes Derived from a New Water-Soluble Dioxopolyazacyclohexane Macrocycle

Rosa E. Navarro, Alex J. Salazar-Medina, et al. SEPTEMBER 11, 2023 ACS OMEGA

READ 🗹

### Synthesis, X-ray Structures, and Optical and Magnetic Properties of Cu(II) Octafluorooctakisperfluoro(isopropyl)phthalocyanine: The Effects of...

ctakispernuoro(isopropyi)pittiaiocyanine. The Effects

Maxim A. Faraonov, Dmitri V. Konarev, *et al.* JULY 12, 2023 INORGANIC CHEMISTRY READ Z

Get More Suggestions >

# 13. Oświadczenia współautorów publikacji



# Faculty of Pharmaceutical Sciences University of Campinas (UNICAMP)

Group on Research and Development of Bioactive Compounds

January 24, 2024

To Whom It May Concern:

With this letter I confirm that MSc Przemysław Biegański contributed to the publication listed below. This manuscript is part of his PhD thesis. My contribution to this work pertains to structures optimizations and docking studies. The contribution of MSc Przemysław Biegański pertains to the synthesis and characterization of erlotinib conjugates as well as to spectroscopic characterization of these compounds.

P. Biegański, M. Godel, C. Riganti, D. F. Kawano, J. Kopecka, K. Kowalski, Click ferrocenyl erlotinib conjugates active against erlotinib resistant non small cell lung cancer cells in vitro, Bioorganic Chemistry, 2022, 119, 105514.

P. Biegański, A. Gorski, N. Dutkiewicz, D. F. Kawano, P. Zmora, K. Kowalski, Organometallic erlotinib conjugates against lung cancer cells and as SARS CoV 1/2 entry inhibitors - article in preparation.

If you would like further information, please feel free to contact me. Sincerely,

alam

Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano



Zentrum für Materialien, Architekturen und Integration von Nanomembranen (MAIN) Forschergruppe Anorganische Chemie Prof. Dr. Heinrich Lang

Technische Universität Chemnitz · 09107 Chemnitz

Bearbeitenin Adresse Raum Telefon Fax E-Mail Internet

Prof. Dr. Heinrich Lang Rosenbergstr. 6, 09125 Chemnitz. C50.313 +49 371 531-38350 +49 371 531-838350 heinrich.lang@chemie.tu-chemnitz.de www.tu-chemnitz.de/main

Ort, Datum

Chemnitz, 24.01.2024

To whom it may concern!

# **Confirmation Letter**

With this letter I confirm that MSc Przemysław Biegański contributed to the publication listed below. This manuscript is part of his PhD thesis. I supervised the (spectro)electrochemical measurements, which were carried out in my laboratory by Dr. Eduard Kovalski. We also did write the electrochemical section of the manuscript. The contribution of MSc Przemysław Biegański pertains to the synthesis and characterization of compounds as well as to obtaining single crystals suitable for XRD analysis.

 P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski, Electronic Coupling in 1,2,3 Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells, *Inorganic Chemistry*, 2022, 61, 9650-9666.

Sincerely

(Heinrich Lang)

Dienst- u. Paketanschrift: Technische Universität Chemnitz Straße der Nationen 62 · 09111 Chemnitz Postanschrift: Technische Universität Chemnitz · 09107 Chemnitz · GERMANY

Bankverbindung: Hauptkasse des Freistaates Sachsen - Deutsche Bundesbank IBAN: DE22 8600 0000 0086 0015 22 · BIC: MARKDEF1860



To

MSc Przemysław Biegański Department of Organic Chemistry Faculty of Chemistry University of Łódź 91-403 Łódź, Poland E-Mail: przemyslaw.bieganski@edu.uni.lodz.pl

sile 20 - 010EG Drach

From

**Dr. Evgenia Dmitrieva** Leibniz Institute for Solid State and Materials Research (IFW) Dresden Helmholtzstrasse 20 01069 Dresden, Germany

Phone: +49 351 4659 658 Fax +49 351 4659 745 e.dmitrieva@ifw-dresden.de

### Declaration

With this letter I confirm that MSc Przemysław Biegański contributed to the publication listed below. This manuscript is part of his PhD thesis. My contribution was due to electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopic studies reported in publication. The contribution of MSc Przemysław Biegański pertains to the synthesis and characterization of compounds as well as to obtaining of crystals suitable for XRD analysis.

 P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski, Electronic Coupling in 1,2,3 Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells, *Inorganic Chemistry*, 2022, *61*, 9650-9666.

Dr. Evgenia Dmitrieva

ENG

Dresden, 24 January 2024



Leibniz-Institut für Festkörper- und Werkstoffforschung Dresden e. V. • Helmholtzstraße 20 • 01069 Dresden • Germany Executive Board: Prof. Dr. Bernd Büchner • Juliane Schmidt Deutsche Bank • SWIFT (BIC): DEUT DE 8C • IBAN: DE35 8707 0000 0535 3131 00 Ust-IDNr. DE 140 303 135 • Steuernummer: 203/140/04400 • VR Dresden Nr. 1369





Leibniz Institute for Solid State and Materials Research

To

MSc Przemysław Biegański Department of Organic Chemistry Faculty of Chemistry University of Łódź 91-403 Łódź, Poland E-Mail: przemyslaw.bieganski@edu.uni.lodz.pl

Heimholtzstraße 20 + 01069 Dresden + Ger

From

Noel Israel Leibniz Institute for Solid State and Materials Research (IFW) Dresden Helmholtzstrasse 20 01069 Dresden, Germany

Phone: +49 351 4659 658 Fax +49 351 4659 745 n.israel@ifw-dresden.de

## Declaration

With this letter I confirm that MSc Przemysław Biegański contributed to the publication listed below. This manuscript is part of his PhD thesis. My contribution was due to electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopic studies reported in publication. The contribution of MSc Przemysław Biegański pertains to the synthesis and characterization of compounds as well as to obtaining of crystals suitable for XRD analysis.

1. P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski, Electronic Coupling in 1,2,3 Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells, Inorganic Chemistry, 2022, 61, 9650-9666.

Noel Israel Nol Joral

Dresden, 24 January 2024



Leibniz-Institut für Festkörper- und Werkstoffforschung Dresden e. V. • Helmholtzstraße 20 • 01069 Dresden • Germany Executive Board: Prof. Dr. Bernd Büchner • Juliane Schmidt Deutsche Bank • SWIFT (BIC): DEUT DE 8C • IBAN: DE35 8707 0000 0535 3131 00 Ust-IDNr. DE 140 303 135 • Steuernummer: 203/140/04400 • VR Dresden Nr. 1369



Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego

UNIWERSYTET WAR5ZAWSKI

Dr Damian Trzybiński Laboratorium Badań Strukturalnych i Biochemicznych Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego ul. Żwirki i Wigury 101 02-089 Warszawa E-mail: dtrzybinski@cnbc.uw.edu.pl

Warszawa, 25 stycznia 2024 roku

## Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w niżej cytowanej publikacji składającej się na pracę doktorską mgr inż. Przemysława Biegańskiego obejmował wykonanie pomiarów dyfrakcyjnych monokryształów kompleksów 1a, 2a i 2c (numery związków w publikacji) oraz ustalenie ich struktury krystalograficznej wraz z jej szczegółową analizą i opisem. Poniżej cytowana praca związana jest z tematyką realizowaną w zespole prof. dr hab. Konrada Kowalskiego, który był inicjatorem naszej współpracy. Pan mgr inż. Przemysław Biegański wykonał syntezę nowych ferrocenylowych pochodnych opisanych w niżej cytowanej publikacji [1], przeprowadził ich pełną analizę spektroskopową oraz otrzymał monokryształy związków 1a, 2a i 2c.

1. P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski, Electronic Coupling in 1,2,3 Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells, Inorganic Chemistry, 2022, 61, 9650 9666.

Z poważaniem

Damian tyum



**Prof. dr hab. Krzysztof Woźniak,** Fellow Chem Eur Department of Chemistry, Pasteura 1, 02-093 Warszawa, Poland <u>kwozniak@chem.uw.edu.pl</u>, Phone: +48 504076064

Warszawa, 28/01/2024

# Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w niżej cytowanej publikacji składającej się na pracę doktorską mgr inż. Przemysława Biegańskiego obejmował rentgenowskie badania strukturalne monokryształów, które były wykonane w kierowanym przeze mnie laboratorium. Poniżej cytowana praca związana jest z tematyką realizowaną w zespole prof. dr hab. Konrada Kowalskiego, który był inicjatorem naszej współpracy. Pan mgr inż. Przemysław Biegański wykonał syntezę nowych ferrocenylowych pochodnych opisanych w niżej cytowanej publikacji, przeprowadził ich pełną analizę spektroskopową oraz otrzymał monokryształy związków 1a, 2a i 2c.

 P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski, Electronic Coupling in 1,2,3 Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells, *Inorganic Chemistry*, **2022**, *61*, 9650-9666.

Kraucatof	Elektronicznie		
RIZYSZLOI	podpisany przez		
Woźniak:	Krzysztof Woźniak;		
	Uniwersytet		
Uniwersyte	t Warszawski		
Warszawski	Data: 2024.01.29		
	01:21:46 +01'00'		

Core Facility for Crystallography and Biophysics, Laboratory for Structural and Biochemical Research Biological and Chemical Research Centre, Department of Chemistry, University of Warsaw ul. Zwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa, Poland. tel: +48 22 55 26 744, email: cfcbuw@cnbc.uw.edu.pl http://crystal.chem.uw.edu.pl/researchprojects/cfcb.html





European Union European Regional Development Fund



Turyn 29/01/2024

Oświadczam, że mój udział w niżej cytowanych publikacjach składających się na pracę doktorską mgr inż. Przemysława Biegańskiego obejmował wykonanie kompleksowych badań aktywności przeciwnowotworowej na liniach komórkowych nowotworów płuc oraz wszystkich testów biochemicznych opisanych ww. publikacjach. Poniżej cytowane prace związane są z tematyką realizowaną w zespole prof. dr hab. Konrada Kowalskiego, który był inicjatorem naszej współpracy. Poddane badaniom związki chemiczne opisane w poniżej cytowanych publikacjach zostały otrzymane i scharakteryzowane przez mgr inż. Przemysława Biegańskiego.

- 1. P. Biegański, M. Godel, C. Riganti, D. F. Kawano, J. Kopecka, K. Kowalski, Click ferrocenyl erlotinib conjugates active against erlotinib resistant non small cell lung cancer cells in vitro, *Bioorganic Chemistry*, **2022**, *119*, 105514.
- P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski, Electronic Coupling in 1,2,3 Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells, *Inorganic Chemistry*, **2022**, *61*, 9650-9666.

Joanna Kopechie

Turyn 29/01/2024

Oświadczam, że mój udział w niżej cytowanych publikacjach składających się na pracę doktorską mgr inż. Przemysława Biegańskiego obejmował wykonanie kompleksowych badań aktywności przeciwnowotworowej na liniach komórkowych nowotworów płuc oraz wszystkich testów biochemicznych opisanych ww. publikacjach. Poniżej cytowane prace związane są z tematyką realizowaną w zespole prof. dr hab. Konrada Kowalskiego, który był inicjatorem naszej współpracy. Poddane badaniom związki chemiczne opisane w poniżej cytowanych publikacjach zostały otrzymane i scharakteryzowane przez mgr inż. Przemysława Biegańskiego.

- 1. P. Biegański, M. Godel, C. Riganti, D. F. Kawano, J. Kopecka, K. Kowalski, Click ferrocenyl erlotinib conjugates active against erlotinib resistant non small cell lung cancer cells in vitro, *Bioorganic Chemistry*, **2022**, *119*, 105514.
- P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski, Electronic Coupling in 1,2,3 Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells, *Inorganic Chemistry*, **2022**, *61*, 9650-9666.

Chiara Riganti Chiere Riganh

Turyn 29/01/2024

Oświadczam, że mój udział w niżej cytowanych publikacjach składających się na pracę doktorską mgr inż. Przemysława Biegańskiego obejmował wykonanie kompleksowych badań aktywności przeciwnowotworowej na liniach komórkowych nowotworów płuc oraz wszystkich testów biochemicznych opisanych ww. publikacjach. Poniżej cytowane prace związane są z tematyką realizowaną w zespole prof. dr hab. Konrada Kowalskiego, który był inicjatorem naszej współpracy. Poddane badaniom związki chemiczne opisane w poniżej cytowanych publikacjach zostały otrzymane i scharakteryzowane przez mgr inż. Przemysława Biegańskiego.

- 1. P. Biegański, M. Godel, C. Riganti, D. F. Kawano, J. Kopecka, K. Kowalski, Click ferrocenyl erlotinib conjugates active against erlotinib resistant non small cell lung cancer cells in vitro, *Bioorganic Chemistry*, **2022**, *119*, 105514.
- P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski, Electronic Coupling in 1,2,3 Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells, *Inorganic Chemistry*, **2022**, *61*, 9650-9666.

Mortine Goslel



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET A. Kovačića 1, PP 156, 10000 ZAGREB



FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY UNIVERSITY OF ZAGREB A. Kovačića 1, POB 156, 10000 ZAGREB, CROATIA

Tel. +385-1-4818-288, 4856-201; Fax: +385-1-4856-201; E-mail:dekanat@pharma.hr

Zagreb, January 31, 2024

To whom it may concern:

Dear Sirs, Please find enclosed the following declaration:

With this letter I confirm that MSc Przemysław Biegański contributed to the publication listed below. This manuscript is part of his PhD thesis. My contribution to this work pertains to structures optimizations and DFT calculations. The contribution of MSc Przemysław Biegański pertains to the synthesis and characterization of ferrocenyl compounds as well as to obtaining of crystals suitable for XRD analysis.

 P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski, Electronic Coupling in 1,2,3 Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells, Inorganic Chemistry, 2022, 61, 9650-9666.

Sincerely,

Work

Prof . Dr. Valerije Vrček

Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia



ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań tel. centrala 61 852 85 03, tekretariat 61 852 89 19 faks: 61 852 05 32, e-mail. ibch@ibch.poznan.pl REGON 000649327 NIP 777-00-02-062 http://www.ibch.poznan.pl

Poznań, 01.02.2024 r.

# **OŚWIADCZENIE**

Niniejszym oświadczam, iż w poniższym artykule będącym w trakcie przygotowania oraz składającym się na pracę doktorską mgr. inż. Przemysława Biegańskiego, członkowie Zakładu Wirusologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk (zaznaczeni gwiazdką) brali udział w badaniach aktywności przeciwnowotworowej oraz przeciwwirusowej zsyntezowanych związków. Analizowane metaloorganiczne i organiczne pochodne erlotynibu zostały otrzymane i scharakteryzowane przez mgr. inż. Przemysława Biegańskiego.

P. Biegański, A. Gorski, N. Dutkiewicz, M. Gazecka\*, R. Nowak\*, M. Trybus\*, P. Jackowiak\*, D. F. Kawano, P. Zmora\*, K. Kowalski. Organometallic erlotinib conjugates against lung cancer cells and as emerging viruses entry inhibitors – artykuł w trakcie przygotowania

W imieniu Zespołu,

dr Paweł Zmora Kierownik Zakładu Wirusologii Molekularnej Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

e-mail: <u>pzmora@ibch.poznan.pl</u>

telefon: +48 61 852 58 03 wew. 1606

Aleksander Gorski Imię i nazwisko

Warszawa, dnia 09.03.2024

# **OŚWIADCZENIE**

Oświadczam, że mój udział w niżej wskazanej publikacji składającej się na pracę doktorską mgr inż. Przemysława Biegańskiego obejmował charakterystykę fotofizyczną renowych koniugatów erlotynibu (związki 9 i 10). Poniżej wskazana praca związana jest z tematyką realizowaną w zespole prof. dr hab. Konrada Kowalskiego, który był inicjatorem naszej współpracy. Poddane pomiarom renowe pochodne erlotynibu zostały otrzymane i scharakteryzowane przez mgr inż. Przemysława Biegańskiego.

 P. Biegański, M. Gazecka, R. Nowak, A. Gorski, N. Dutkiewicz, D. F. Kawano, P. Zmora, K. Kowalski, Organometallic erlotinib conjugates against lung cancer cells and as SARS CoV 1/2 entry inhibitors – artykuł w trakcie przygotowania.

Signed by / Podpisano przez: Abh Aleksander Gorski Date / Data: 2024-03-09 16:05

Podpis



Prof. dr hab. Konrad Kowalski Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii Katedra Chemii Organicznej Tamka 12, 91-403, Łódź Telefon: (042) 6355759 email: konrad.kowalski@chemia.uni.lodz.pl

Łódź, 29.04.2024

## Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w niżej cytowanych publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej Pana Przemysława Biegańskiego polegał na opracowaniu koncepcji badań, koordynowaniu i nadzorowaniu prac badawczych, dyskusji uzyskanych wyników, redakcji manuskryptów oraz korespondencji z redaktorami czasopism i recenzentami. Pan Przemysław Biegański przeprowadzał wszystkie eksperymenty i analizy spektroskopowe otrzymanych produktów.

[P1] P. Biegański, M. Godel, C. Riganti, D. F. Kawano, J. Kopecka, K. Kowalski, Click ferrocenyl erlotinib conjugates active against erlotinib resistant non small cell lung cancer cells in vitro, *Bioorganic Chemistry*, **2022**, *119*, 105514.

[P2] P. Biegański, E. Kovalski, N. Israel, E. Dmitrieva, D. Trzybiński, K. Woźniak, V. Vrček, M. Godel, C. Riganti, J. Kopecka, H. Lang, K. Kowalski, Electronic Coupling in 1,2,3 Triazole Bridged Ferrocenes and Its Impact on Reactive Oxygen Species Generation and Deleterious Activity in Cancer Cells, *Inorganic Chemistry*, **2022**, *61*, 9650-9666.

[P3] P. Biegański, M. Gazecka, R. Nowak, A. Gorski, N. Dutkiewicz, D. F. Kawano, P. Zmora,
K. Kowalski, Organometallic erlotinib conjugates against lung cancer cells and as SARS-CoV 1/2 entry inhibitors - manuskrypt w trakcie recenzji w czasopiśmie *Organometallics*.

Z poważaniem,

I dowalski

Prof. dr hab. Konrad Kowalski

prof. dr hab. Konrad Kowalski Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki