



**SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



Krzysztof Śmiałkowski

Praca doktorska: **Oligofunkcjonalizacja klasterów boru jako bloków budulcowych nowych materiałów i związków bioaktywnych.**

Doctoral thesis: **Oligofunctionalization of boron clusters as building blocks for new materials and bioactive molecules.**

- Promotor/Supervisor
prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski
Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk
Pracownia Chemii Medycznej

Badania opisane w rozprawie były prowadzone w ramach projektu „Oligopodalne kompozyty kwasów nukleinowych i klasterów boru - nowy materiał dla bionanotechnologii.” NCN Symfonia 3, grant 015/16/W/ST5/00413

Łódź, 2024

Wykształcenie

- 03/2017 – 01/2019 **Politechnika Łódzka Wydział Chemiczny**

Kierunek: Chemia

Specjalizacja: Nowoczesna synteza i analiza związków organicznych

Poziom kształcenia: Magister

- 09/2012 – 10/2016 **Politechnika Łódzka Wydział Chemiczny**

Kierunek: Chemia

Specjalizacja: Chemia i fizyka polimerów

Poziom kształcenia: Inżynier

Spis publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej

1. **Śmiałkowski, K.**; Sardo, C.; Leśnikowski, Z. J. Metallacarborane synthons for molecular construction—oligofunctionalization of cobalt bis(1,2-dicarbollide) on boron and carbon atoms with extendable ligands. *Molecules* **2023**, *28*, 4118. **140 pkt. MEiN; IF = 4,6**
2. Bednarska-Szczepaniak, K.; Ebenryter-Olbińska, K.; Gajek, G.; **Śmiałkowski, K.**; Suwara, J.; Fiedorowicz, L.; Leśnikowski Z. Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity *Chem. Eur. J.* **2024**, e202303531. **140 pkt. MEiN; IF = 3,9**

Pozostała działalność naukowa

1. Udział w konferencjach naukowych.

- Sardo, C.; Hamera-Fałdyga, R.; **Śmiałkowski, K.**; Leśnikowski, Z. J. Functionalization of metallacarboranes – Synthesis of Cobalt bis dicarbollide cyclic phosphorothioate ester and its alkylation. XXII International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compunds. 22.11.2019, Łódź, plakat
- **Śmiałkowski, K.**; Sardo, C.; Leśnikowski, Z. J. Functionalization of metallacarboranes containing cobalt ion via alkylation method. The 4th Conference of the PhD Students of the Polish Academy of Sciences – KonDokPAN. 23.11.2020. Warszawa, prezentacja ustna

- **Śmiałkowski, K.;** Sardo, C.; Leśnikowski, Z. J. Unusual chirality of metallocarboranes containing phosphorothioate bridging moiety. 23rd International Conference on Phosphorus Chemistry. 5-9.07.2021, Częstochowa, plakat
- **Śmiałkowski, K.;** Leśnikowski, Z. J. Oligofunkcjonalizacja klastrów boru jako bloków budulcowych nowych materiałów oraz związków bioaktywnych. 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego. 13-17.09.2021, Łódź, prezentacja ustna
- **Śmiałkowski, K.;** Leśnikowski, Z. J. Oligofunkcjonalizacja metalokarboranów – synteza pochodnych bis(1,2-dikarba-*closo*-undekaborano)-*commo*-3,3'-kobaltanu (III) (-1) podstawionych równocześnie na atomach węgla i boru. VII ogólnopolskie seminarium „Postępy w chemii boru”. 3.06-5.06.2022, Radziejowice, prezentacja ustna
- **Śmiałkowski, K.;** Sardo, C.; Leśnikowski, Z. J. Oligofunctionalization of cobalt-bis(1,2-dicarbollide)ate (COSAN) as a building block for nanoconstructions. 9th European Conference On Boron Chemistry „EUROBORON”. 3.07-7.07.2022, Barcelona, plakat, **konferencja zagraniczna**
- **Śmiałkowski, K.;** Leśnikowski, Z. J. Synthesis of chromone derivatives modified by boron cluster (C₂H₁₂B₁₀). XXIII International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”. 28.10.2022, Łódź, plakat
- **Śmiałkowski, K.;** Leśnikowski, Z. J. Oligofunctionalization of boron clusters as a platform biologically active nanoparticles. Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, 18.05.2023, Łódź, prezentacja ustna
- **Śmiałkowski, K.;** Grűner B.; Leśnikowski, Z. J. Pochodne metalokarboranów – oligofunkcjonalizacja bis(1,2-dikarbolido) kobaltanu (III) podstawionego równocześnie na atomach boru i węgla. XIV Sesja magistrantów i doktorantów Łódzkiego środowiska Chemików. 13.06.2023, Łódź, plakat
- **Śmiałkowski, K.;** Leśnikowski, Z. J. Oligofunkcjonalizacja klastrów boru – synteza pochodnych karboranów i metalokarboranów podstawionych równocześnie na atomach węgla i boru. 65. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego. 18-22.09.2023, Toruń, prezentacja ustna

2. Udział w projektach badawczych.

- Oligopodalne kompozyty kwasów nukleinowych i klasterów boru - nowy materiał dla bionanotechnologii. NCN Symfonia 3, grant 015/16/W/ST5/00413, doktorant-stypendysta, kierownik projektu: prof. dr hab. Zbigniew Leśnikowski

3. Staże i kursy zagraniczne.

- Uczestnictwo w kursie prowadzonym przez Wydział Chemii i Farmacji Uniwersytetu w Würzburgu. Developments in Boron Chemistry: from Fundamental Studies to Applications. 27.09-01.10.2021.
- Staż naukowy w Instytucie Chemii Nieorganicznej Czeskiej Akademii Nauk w Husinec-Řež w okolicach Pragi w zespole kierowanym przez prof. Bohumira Grůnera, w ramach realizacji Indywidualnego Planu Badawczego. 01.09.2022-15.10.2022.

Wprowadzenie

Klaster boru to molekularne klaster zbudowane z atomów boru i atomów wodoru (borany), których struktura jest konsekwencją kombinacji wiązań 2c2e (klasycznych wiązań w chemii organicznej), oraz wiązań 3c2e [1]. Struktura klasterów stabilizowana jest przez trójwymiarową sieć zdelokalizowanych wiązań kowalencyjnych, w której atomy boru i innych pierwiastków (w przypadku heteroboranów) skoordynowane są co najmniej z trzema, a czasami nawet pięcioma lub sześcioma atomami tworząc wyjątkowo trwałe, „nieklasyczne” układy molekularne. Nietypowe dla klasycznych związków organicznych właściwości karboranów, w tym aromatyczność w trzech wymiarach sprawiają, że każde podstawienie przy atomie boru lub węgla zmienia rozkład gęstości elektronowych w całym klastrze, a co za tym idzie reaktywność wszystkich pozostałych atomów w cząsteczce również ulega zmianie. Końcowy efekt w postaci zmieniającej się reaktywności atomów boru i węgla klasterów jest wynikiem nakładania się wielu czynników [2]. We wstępie literaturowym podjąłem próbę ich skatalogowania i wykorzystania do wyjaśnienia preferencyjnego tworzenia się pochodnych dwupodstawionych karboranów i metalokarboranów względem ich pochodnych monopodstawionych. Jest to problem, który często komplikuje oligofunkcjonalizację karboranów i metalokarboranów w pożądanym kierunku i z którym miałem do czynienia także w moich badaniach.

Dzięki unikalnym właściwościom chemicznym, fizykochemicznym oraz biologicznym takim jak: stabilność chemiczna a jednocześnie podatność na modyfikacje, niska toksyczność,

wysoka lipofilowość (co jest korzystne dla zwiększenia transportu przez błony komórkowe i barierę krew-mózg), możliwość niekowalencyjnych oddziaływań z celami biologicznymi (poprzez tworzenie wiązań wodorowych oraz diwodorowych), klastery boru zostały z powodzeniem wykorzystane do syntezy cząsteczek bioaktywnych, testowanych następnie pod kątem oddziaływań z różnorodnymi celami biologicznymi [3]. Klastery boru, w porównaniu do związków organicznych szczególnie dobrze nadają się do wykorzystania jako sztywne, trójwymiarowe platformy, do których możliwe jest przyłączenie w sposób przestrzennie uorganizowany łańcuchów DNA (jak również podstawników niskocząsteczkowych) [4-6]. Moje badania nad oligofunkcjonalizacją klastrów boru, a więc kontrolowanym przyłączeniem kilku podstawników zarówno do atomów boru jak i węgla w różnych położeniach w cząsteczkach karboranów, bądź ich kompleksów z jonem kobaltu pozwoliły na otrzymanie konjugatów klastrów boru i DNA-oligonukleotydów i wykorzystanie ich jako bloków budulcowych nowego typu nanocząstek będących nośnikami terapeutycznych kwasów nukleinowych (TNAs, ang.: Therapeutic Nucleic Acids) [4, 7, 8]. Charakterystyczną cechą stosowanych w klinice terapeutycznych kwasów nukleinowych jest to, że są one stosowane w formie monoterapii i są skierowane przeciwko jednemu specyficznemu celowi biologicznemu i jednej specyficznej sekwencji RNA lub DNA [9]. Przeprowadzone przeze mnie badania i opracowane metody oligofunkcjonalizacji klastrów boru opisane w niniejszej pracy umożliwiły otrzymanie bloków budulcowych do konstrukcji nanocząstek zdolnych do jednoczesnego wyciszania dwóch różnych onkogenów, na przykładzie receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang.: Epidermal Growth Factor Receptor) i protoonkogenu komórkowego c-MYC (ang.: myelocytomatosis oncogene) ulegających nadekspresji w wielu typach nowotworów. Opisane przez nas i opublikowane ostatnio badania stanowią pierwszy przykład, choć na razie w modelu *in vitro*, terapii wielolekowej (dwulekowej) z wykorzystaniem technologii TNAs w oparciu o oligofunkcjonalizowane klastery boru [4].

Cel pracy

Celem ogólnym mojej pracy było stworzenie podstaw chemicznych syntezy kompozytów klastrów boru i antysensowych DNA-oligonukleotydów stanowiących bloki budulcowe nowego typu nanocząstek, nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych. Celem szczegółowym i środkiem do osiągnięcia tego celu było opracowanie metod oligofunkcjonalizacji karboranów i metalokarboranów poprzez kontrolowane przyłączenie określonych podstawników do atomów boru i węgla klastrów boru.

Zadania przeze mnie realizowane obejmowały:

- oligofunkcjonalizację 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu na atomach boru B₉ i B₁₂ oraz atomach węgla C₁ i C₂
- oligofunkcjonalizację metalokarboranu zawierającego kobalt, bis(1,2-dikarba-*closo*-undekaborano)-3,3'-kobaltanu (III) na atomach boru B₈ i B_{8'} oraz atomach węgla C₁, C₂, C_{1'} lub C_{2'}
- syntezę cyklicznych estrów tiofosforanowych 8,8'-dihydroksy-[bis(1,2-dikarba-*closo*-undekaborano)]-3,3'-kobaltanu (III), pochodnych metalokarboranu o zahamowanej rotacji
- opracowanie metody alkiłowania na atomie siarki cyklicznych estrów tiofosforanowych 8,8'-dihydroksy-[bis(1,2-dikarba-*closo*-undekaborano)]-3,3'-kobaltanu (III) liniowymi i rozgałęzionymi odczynnikami alkiłującymi
- synteza z wykorzystaniem opisanych w punktach powyżej platform do przyłączania DNA-oligonukleotydów metodą amidofosforynową
- opracowanie metody i synteza pochodnych genisteiny modyfikowanej klasterem boru

Metodyka i wyniki

W ramach projektu Symfonia 3 kierowanego przez Profesora Zbigniewa Leśnikowskiego otrzymałem cztery nowe typy oligofunkcjonalizowanych klasterów boru, z których dwa zostały wykorzystane dotychczas do otrzymania generacji II [4] i III [8] nanocząstek, nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych stanowiąc istotne rozwinięcie wcześniejszych badań prowadzonych w naszej Pracowni, zakończonych opracowaniem metody otrzymywania nanocząstek I generacji [5]. Charakterystyczną cechą otrzymanych przeze mnie pochodnych klasterów boru jest obecność jednego podstawnika hydroksyalkilowego oraz dwóch podstawników hydroksyalkilowych zawierających trytylową grupę ochronną. Podstawnik hydroksyalkilowy służy by przyłączyć klaster do stałego złoża LCA-CPG (ang.: long chain alkylamine controlled pore glass) stosowanego w automatycznej, chemicznej syntezie kwasów nukleinowych; natomiast grupy hydroksylowe zablokowane grupami trytylowymi stanowią miejsce przyłączania, po odblokowaniu, dwóch łańcuchów DNA. Ochronna grupa trytylowa usuwana jest w warunkach kwasowych w procesie przyłączania DNA-oligomerów do oligofunkcjonalizowanych klasterów boru w procesie automatycznej syntezy DNA na fazie stałej metodą amidofosforynową [10].

Pierwszym etapem realizacji projektu przedstawionego w Indywidualnym Planie Badawczym była oligofunkcjonalizacja *orto*-karboranu. Celem zadania była synteza 1-hydroksymetylo-9,12-bis(trytyloksypropylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu, pochodnej karboranowej umożliwiającej przyłączenie do klastra boru antysensowych DNA-oligonukleotydów i wykorzystanie otrzymanych w ten sposób bloków budulcowych do otrzymywania funkcjonalnych nanocząstek drugiej generacji posiadających zdolność do wyciszania dwóch genów EGFR i c-Myc jednocześnie [4]. Zoptymalizowałem 3-etapową syntezę, na drodze której przyłączyłem do atomów boru B₉ i B₁₂ dwa podstawniki trytyloksyalkilowe poprzez utworzenie wiązania bor-węgiel w reakcji sprzęgania Kumady 9,12-dijodo-1,2-dikarba-*closo*-dodekarboranu z przygotowanym *in situ* odczynnikiem Grignarda, bromkiem 3-O-(trytyloksy)propylomagnezowym w obecności katalizatora tetrakis(trifenylfosfino)palladu(0) będącego kompleksem palladu [6]. Było to możliwe dzięki przeprowadzeniu szeroko zakrojonych, systematycznych badań wpływu miejsca przyłączenia podstawników do klastra i warunków reakcji. W celu przyłączenia podstawnika hydroksyalkilowego zaadaptowałem metodę opisaną w literaturze dla reakcji paraformaldehydu z niepodstawionym *orto*-karboranem przy użyciu jako zasady do deprotonacji grupy C-H karboranu fluorku tetrabutylamonowego (TBAF) zwiększającego szansę na powstanie w przewodzie produktu monopodstawionego na atomie węgla [11]. Otrzymana pochodna została wykorzystana do syntezy jednego z bloków budulcowych funkcjonalnych nanocząstek drugiej generacji posiadających zdolność do wyciszania genów EGFR i c-Myc jednocześnie [4]

Badania nad oligofunkcjonalizacją metalokarboranów rozpocząłem syntezując opisany w literaturze 8,8'-dihydroksy-bis-(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltan [12] wykorzystywany przeze mnie jako substrat wyjściowy wychodząc z dostępnego handlowo bis-(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu (COSAN). Następnie w reakcjach substytucji nukleofilowej stosując wodorek sodu do deprotonacji grup hydroksylowych oraz odpowiednie odczynniki alkilujące otrzymałem pochodne COSANU: 8,8'-di-3-O-(*tert*-butylodimetylosililopropylo)- oraz 8,8'-di-4-O-(trytyloksybutylo)-bis-(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltan [7]. 8,8'-Di-3-O-(*tert*-butylodimetylosililopropylo)-bis-(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltan wykorzystałem jako związek modelowy w badaniach mających na celu rozpoznanie możliwości przyłączenia podstawników do atomów węgla pochodnych COSANU funkcjonalizowanych wcześniej na atomach boru i otrzymywania pochodnych trój- i czteropodstawionych metalokarboranu. Przyłączenie podstawników hydroksyalkilowych do atomów węgla metalokarboranu przeprowadziłem w reakcjach otwarcia pierścienia cyklicznego eteru w reakcji z aktywowanym metalokarboranem,

stosując roztwór tlenku etylenu w tetrahydrofuranie. Do deprotonacji grup C-H metalokarboranu w celu generowania centrum nukleofilowego zastosowałem n-butyloplit [13]. Pomimo zastosowania dimetoksyetanu (DME) jako rozpuszczalnika mogącego teoretycznie promować powstawanie produktu monopodstawienia (modulujący wpływ rozpuszczalnika na tę reakcję został poruszony w części literaturowej pracy [13, 14]) w reakcji powstaje głównie produkt dwupodstawiony. Analiza widm ^{11}B -NMR produktów i obserwowana wielość sygnałów odpowiadającym atomom boru B_8 oraz B_8 metalokarboranu świadczy o tym, że każdy z produktów, monopodstawienia oraz dwupodstawienia powstaje w postaci skomplikowanej mieszaniny diastereoizomerów [7].

Ze względu na niskie wydajności syntezy pochodnych oraz ich powstawanie w postaci mieszaniny diastereoizomerów co mogłoby w późniejszych etapach przyłączania do klastra boru łańcuchów DNA-oligonukleotydów prowadzić do powstawania mieszaniny diastereoizomerycznych bloków budulcowych nanocząstek, zdecydowałem się na przeprowadzenie badań mających na celu opracowanie pochodnej COSANU o zablokowanej rotacji ligandów karboranylowych co potencjalnie mogłoby przyczynić się do podwyższenia wydajności alkilowania grup C-H poprzez zmniejszenie zawady przestrzennej tych grup przez rotujące wraz z ligandami karboranylowymi podstawniki przy atomach boru B_8 i B_8 . W tym celu wykorzystałem opisaną w literaturze koncepcję syntezy cyklicznych estrów kwasu fosforowego i 8,8'-dihydroksy-COSANU [15] z tą różnicą, że reszta kwasu fosforowego została zastąpiona resztą kwasu tiofosforowego, różne też były metody otrzymania obu typów połączeń. W tym miejscu chciałbym podkreślić, że ta pozornie niewielka różnica sprawia że trudne do dalszej funkcjonalizacji pochodne kwasu fosforowego zastąpione są podatnymi na dalsze przekształcenia na drodze alkilowania atomu siarki pochodnymi kwasu tiofosforowego. Aby otrzymać cykliczny tiofosforanu 8,8'-dihydroksy-COSANU zaadaptowałem powszechnie stosowaną w syntezie tiofosforanowych pochodnych nukleotydów metodę opartą na usiarczaniu reszty kwasu H-fosfonowego w estrach nukleozydowych kwasu H-fosfonowego [16, 17, 18]. Cykliczny H-fosfonian 8,8'-dihydroksy-COSANU otrzymałem w prostej, dwuetapowej syntezie prowadzonej bez wyodrębniania produktu pośredniego. 8,8'-Dihydroksy-COSAN został przekształcony w imidazolid cyklicznego estru kwasu fosfonowego w reakcji z triimidazolidem kwasu fosfonowego $[\text{P}(\text{Im})_3]$ otrzymanym *in situ* z imidazolu i trichlorku fosforu. Następnie powstały cykliczny imidazolid został zhydrolizowany do cyklicznego H-fosfonianu [17]. Cykliczny ester tiofosforanowy 8,8'-dihydroksy-COSANU otrzymałem w reakcji usiarczania siarką elementarną (S_8) wobec silnej zasady organicznej 1,8-diazabicyklo(5.4.0)undek-7-enu (DBU) stosując metodę opisaną dla dinukleozydowych

diestrów kwasu H-fosfonowego [18]. Na drodze S-alkilowania grupy tiofosforanowej przyłączyłem zarówno liniowe jak i rozgałęzione podstawniki trytyloksyalkilowe [7]. Na potrzeby funkcjonalizacji COSANU jako platformy dla DNA-oligomerów i syntezy bloków budulcowych nanocząstek, kompozytów klasterów boru i DNA-oligonukleotydów koniecznym jest jednak wprowadzenie co najmniej dwóch podstawników zawierających grupy hydroksylowe zablokowane grupami trytylowymi. Rozgałęziony odczynnik tego typu, 4-(1,3-bis(trytyloksy)propan-2-yloksy)butylo-p-toluenosulfonian umożliwiający spełnienie tych wymogów otrzymałem na drodze dogodnej, dwuetapowej syntezy stosując jako substrat do syntezy glicerol. W pierwszym etapie otrzymałem opisany w literaturze 1,3-bis(trytyloksy)propan-2-ol wprowadzając trytylowe grupy ochronne grup hydroksylowych w pozycjach 1- i 3- glicerolu [19]. W kolejnym etapie stosując wodorek sodu do deprotonacji wolnej grupy hydroksylowej pochodną glicerolu poddałem reakcji z 1,4-bis(tosyloksy)butanem [7].

Przyłączenie grup hydroksyalkilowych do atomów węgla C_1 lub C_2 i $C_{1'}$ lub $C_{2'}$ S-alkilowanych pochodnych cyklicznego tiofosforanu 8,8'-dihydroksy COSANU przeprowadziłem stosując metodę, którą wykorzystałem w celu funkcjonalizacji 8,8'-alkoksy-pochodnych, w których grupa hydroksylowa podstawników przyłączonych do atomów boru zablokowana została grupą *tert*-butylodimetylosililową (TBDMS). Pomimo zastosowania DME jako rozpuszczalnika kompleksującego jon litu produkty podstawienia na atomach węgla powstają w postaci mieszaniny produktów mono- i dwupodstawionych ze stosunkowo niskimi wydajnościami. Związki powstają w postaci skomplikowanej mieszaniny diastereoizomerów co dobrze ilustrują widma ^{11}B - oraz ^{31}P -NMR obu połączeń. Złożona stereochemia związków może wynikać z jednej strony z faktu, że mostek tiofosforanowy wymusza przyjęcie określonych konformacji przez metalokarboran co zakłóca jego symetrię jak również przez fakt, że w przypadku monopodstawienia grupa hydroksyetylowa może znajdować się przy węglu C_1 , $C_{1'}$, C_2 lub $C_{2'}$ które to położenia nie są równocenne przy zablokowanej rotacji metalokarboranu. W przypadku dwupodstawienia możliwe są kombinacje C_1 i $C_{1'}$, C_1 i $C_{2'}$, $C_{1'}$ i C_2 , C_2 i $C_{2'}$ oraz najmniej prawdopodobne podstawienie wicynalne C_1 i C_2 lub $C_{1'}$ i $C_{2'}$ [13].

Podczas stażu naukowego w Instytucie Chemii Nieorganicznej Czeskiej Akademii Nauk w Husinec-Řež w pobliżu Pragi w zespole kierowanym przez prof. Bohumira Grůnera, w ramach wieloletniej współpracy między Pracowniami prof. Grůnera i Pracownią Chemii Medycznej kierowaną przez prof. Leńnikowskiego opracowałem metodę syntezy 8-(5-hydroksy-3-oksa-pentoksy)-[1,1'-di(2-trytyloksyetylo)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu, który został wykorzystany do syntezy bloków budulcowych do konstrukcji funkcjonalnych

nanocząstek kompozytów metalokarboranu i antysensowych oligonukleotydów trzeciej generacji [8]. Zdecydowałem się na odwrotną kolejność przyłączania podstawników rozpoczynając procedurę syntezy oligofunkcjonalizowanego COSANU od przyłączenia podstawników hydroksyalkilowych do atomów węgla metalokarboranu, a dopiero w następnej kolejności do atomów boru otrzymując w pierwszym etapie opisany w literaturze 1,1'-di(2-hydroksyetylo)-COSAN [13]. W odróżnieniu od poprzednich syntez pochodnych COSANU tym razem zależało mi na otrzymaniu produktu nie C-mono- lecz C-dwupodstawienia. Kluczowym etapem jest rozdział diastereoizomerycznych produktów dwupodstawienia co pozwala na użycie w kolejnych etapach oligofunkcjonalizacji jednej, stereochemicznie zdefiniowanej pochodnej COSANU. Poprzez krystalizację frakcyjną kontrolując czystość diastereoizomeryczną kolejnych frakcji za pomocą HPLC wyodrębniłem izomer C_1 i C_1' _{anty} [20]. W kolejnych etapach wprowadziłem trytylowe grupy ochronnych grup hydroksylowych w reakcji z chlorkiem trytylu [19], a następnie przyłączyłem pierścień dioksanu przy użyciu eteratu trifluorku boru jako kwasu Lewisa [21]. Ostatnim etapem syntezy było otwarcie pierścienia dioksanowego otrzymanego adduktu metalokarboran-dioskan stosując 1M roztwór wodorotlenku potasu. [21]

Badania dotyczące syntezy bloków budulcowych nanocząstek drugiej oraz trzeciej generacji były prowadzone we współpracy z Pracownią Terapeutycznych Kwasów Nukleinowych kierowaną przez Profesor Barbarę Nawrot (Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych CBMiM), konsorcjanta w realizacji projektu Symfonia 3 (grant 015/16/W/ST5/00413) [4, 5 8]. Nanocząstki o właściwościach równoczesnego wyciszania dwóch onkogenów, EGFR oraz c-MYC (nanocząstki drugiej generacji) zbudowane zostały z dwóch bloków budulcowych. Jednym z bloków budulcowych jest oligofunkcjonalizowana pochodna *orto*-karboranu posiadająca w pozycjach B₉ i B₁₂ klastrera dwa 22-merowe łańcuchy oligonukleotydowe o sekwencji komplementarnej (antysensowej) do fragmentu sekwencji mRNA EGFR pomiędzy 51 a 74 nukleotydem począwszy od kodonu startowego AUG [22] oraz w pozycji C₁ klastrera krótki fragment 3'-UmAmCm-5' („m” oznacza grupę metylową przyłączoną do atomu tlenu w pozycji 2' reszty cukrowej nukleozydu). Drugim blokiem budulcowym jest łącznik w postaci dupleksu, który zbudowany jest z dwóch komplementarnych DNA-oligomerów, jeden z nich jest antysensowy do fragmentu genu c-MYC i zawiera sekwencję nukleotydów komplementarną do pierwszych pięciu kodonów sekwencji mRNA c-MYC [23] oraz „lepkie” końce komplementarne do sekwencji końca 5' bloku budulcowego będącego kompozytem klastrera boru i antysensowego oligonukleotydu anty-EGFR oraz oligonukleotydu do niego komplementarnego. Nanocząstki drugiej generacji

zostały otrzymane poprzez zmieszanie ze sobą w odpowiednich warunkach wymienionych wyżej bloków budulcowych w stosunku molowym 1:1:1. Proces składania ślędzony był za pomocą elektroforezy w niedenaturującym żelu poliakryloamidowym (PAGE). Głównym produktem składnia bloków budulcowych są nanocząstki zbudowane z około 300 par zasad (600 jednostek nukleotydów) DNA co odpowiada cyklicznym nanocząstkom, heksamerom zbudowanym z 6 kompozytów oligofunkcjonalizowanego *orto*-kraboranu i antysensowych anti-EGFR DNA-oligomerów oraz dwuniciowych łączników zawierających w jednej z nici sekwencje antysensowego oligonukleotydu skierowanego przeciw c-MYC. Tworzenie się cyklicznych nanocząstek dodatkowo potwierdzają badania przy użyciu kriomikroskopii elektronowej (cryo-TEM) oraz parametry termodynamiczne asocjacji i dysocjacji oligonukleotydów (T_m , temperatury mięknięcia oligonukleotydów). Dwufazowy przebieg mięknięcia nanocząstek ilustrowany przez dwa punkty przegięcia jest zgodny z budową nanocząstek składających się z dwu głównych dwuniciowych komponentów o różnych właściwościach [4].

Badania zdolności do wyciszania genów EGFR i c-MYC przez otrzymane nanocząstki przeprowadzono *in vitro* wykorzystując jako model biologiczny komórki raka trzustki PANC-1. Pomiar aktywności biologicznej prowadzono dwoma metodami, na poziomie mRNA określając stężenie wyciszanego mRNA metodą RT-PCR, jak również na poziomie biosyntetyzowanego na bazie mRNA białka określając jego stężenie w komórkach metodą wewnątrzkomórkowego wybarwienia białek za pomocą odpowiednio znakowanych przeciwciał. W przypadku metody RT-PCR obserwowano obniżenie stężenia docelowego mRNA, zarówno EGFR jak i c-MYC o ok. 90%, natomiast poziom białek zarówno EGFR jak i c-MYC obniżał się o ok. 25-35 %. W obydwu przypadkach efekt biologiczny należy uznać za wysoce zadowalający tym bardziej, że zarówno otrzymane nanocząstki jak i ich komponenty, ze względu na charakter zastosowanej technologii, umożliwiają ich wszechstronną optymalizację [4].

Prowadząc badania nad oligofunkcjonalizacją karboranów oraz metalokarboranów jako platform dla antysensowych DNA-oligonukleotydów zajmowałem się także jako zadaniem dodatkowym opracowywaniem syntezy analogów genisteiny zawierających w swojej strukturze klaster boru, będącymi potencjalnymi, selektywnymi modulatorami aktywności receptora estrogenowego. Znajomość prac Endo dotyczących zależności pomiędzy hydrofobowością fenoli modyfikowanych 1,2-, 1,7-, 1,12-dikarba-*closo*-dodekaboranem, a ich powinowactwem do receptora estrogenowego alfa (ER α) [24, 25, 26], oraz znajomość właściwości genisteiny jako modulatora receptora estrogenowego ER β [27] zainspirowały mnie

do przeprowadzenia 5-etapowej syntezy analogu genisteiny modyfikowanego hydrofobowym farmakoforem karboranylowym w pozycji 3- układu izoflawonu i wykorzystanie go do badań powinowactwa do receptorów estrogenowych alfa i beta. Syntezę przeprowadziłem analogicznie do chemicznej syntezy genisteiny opisaney w literaturze [28]. Różnica polega na zastosowaniu grup 2-metoksyetoksymetylowych (MEM) zamiast grup metoksymetylowych (MOM) jako grup ochronnych funkcji hydroksyloowych w pozycjach 5- i 7- układu izoflawonu co wynikało z braku dostępności handlowej chlorku metoksymetylowego (MOMCl) oraz na czwartym etapie syntezy przeprowadziłem reakcję sprzęgania Sonogashiry 3-jodo-5,7-bis((2-metoksyetoksy)metoksy)-4H-chromen-4-onu z 9-etynylo-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranem zamiast sprzęgania Suzuki-Miyaura z kwasem 4-hydroksyfenyloborowym, które prowadzi do otrzymania genisteiny [28, 29]. W ramach tego nurtu otrzymałem dwa karboranylowe analogi genisteiny 3-(1,2-dikarba-*closo*-dodekaboran-9-etynylo)-5,7-dihydrokso-4H-chromen-4-on oraz 6-metylo-3-(1,2-dikarba-*closo*-dodekaboran-9-etynylo)-4H-chromen-4-on, które wykazały zróżnicowaną cytotoksyczność *in vitro* w liniach komórkowych Huh70 (badania cytotoksyczności wykonane przez dr Katarzynę Bednarską-Szczepaniak). Otrzymane pochodne badane są pod kątem selektywności powinowactwa do receptorów ER α i β w CiMUS University of Santiago de Compostela, Hiszpania, w ramach współpracy.

Podsumowanie

Klaster boru, w porównaniu do związków organicznych, szczególnie dobrze nadają się do wykorzystania jako sztywne, trójwymiarowe platformy, do których możliwe jest przyłączenie w sposób przestrzennie uorganizowany łańcuchów DNA (jak również podstawników niskocząsteczkowych) umożliwiając otrzymywanie zarówno nowych związków biologicznie aktywnych jak i nowych materiałów. Kluczem do tych zastosowań, zarówno w przypadku karboranów jak i metalokarboranów jest racjonalnie zaplanowana synteza ich pochodnych. Szczególnym wyzwaniem jest oligofunkcjonalizacja rozumiana jako przyłączenie do szkieletu klastera więcej niż dwóch podstawników. W tym kontekście chemia metalokarboranów stanowi podobne, choć równocześnie znacznie większe wyzwanie niż chemia karboranów. Wynika to z faktu bardziej złożonej budowy metalokarboranów niż karboranów i obecności dwóch ligandów karboranylowych podatnych na niezależne do pewnego stopnia modyfikacje jak również dynamicznych właściwości metalokarboranów wynikających z możliwości rotacji ligandów karboranylowych wokół centralnie koordynowanego jonu metalu. Dodatkowym, utrudniającym niekiedy otrzymanie pożądaných

pochodnych metalokarboranów lecz równocześnie fascynującym zjawiskiem, jest unikalna stereochemia metalokarboranów.

W wyniku kilkuletnich badań opracowałem szereg użytecznych w praktyce metod oligofunkcjonalizacji zarówno 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu jak i jego kompleksu z metalem, bis(1,2-dikarba-*closo*-undekaborano)-3,3'-kobaltanu (III) umożliwiającymi przyłączanie jednego, dwóch, trzech lub czterech podstawników zarówno do atomów boru jak i węgla.

Do najważniejszych osiągnięć tych prac zaliczam:

- Opracowanie metody syntezy trójpodstawionej pochodnej 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu zawierającej grupę hydroksymetylową, wykorzystanej z powodzeniem do otrzymania funkcjonalnych nanocząstek drugiej generacji, kompozytów klasterów boru i terapeutycznych kwasów nukleinowych.
- Opracowanie oryginalnej metody funkcjonalizacji metalokarboranów na drodze alkilowania na atomie siarki cyklicznego tiofosforanu bis(8,8'-dihydroksy-1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu (III). Metoda ta pozwala na łatwe przyłączanie do metalokarboranu szerokiej gamy podstawników.
- Opracowanie metody syntezy trójpodstawionej pochodnej metalokarboranu, 8-(5-hydroksy-3-oksa-pentoksy)-[1,1'-di(2-O-trytyloksyetylo)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu] (III), wykorzystanego do otrzymania funkcjonalnych nanocząstek trzeciej generacji, kompozytów klasterów boru i terapeutycznych kwasów nukleinowych.
- Wykorzystanie ^{11}B -NMR i ^1H -NMR do analizy wpływu wprowadzania podstawników w strukturę karboranu lub metalokarboranu na zmianę właściwości cząsteczki związanej ze zmieniającym się rozkładem gęstości elektronowych oraz stereochemią otrzymanych pochodnych.
- Synteza pierwszych analogów genisteiny modyfikowanych klasterem boru.

Wszystkie wymienione pochodne i stojące za nimi badania chemiczne stanowią oryginalny wkład w chemię klasterów boru.

Literatura

- [1] Grimes, R. N. *Carboranes*. Elsevier: Boston, **2016**.
- [2] Heřmánek, S. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 325–326
- [3] Leśnikowski, Z. J. Challenges and Opportunities for the Application of boron clusters in drug design. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (17), 7738–7758.
- [4] Bednarska-Szczepaniak, K.; Ebenryter-Olbińska, K.; Gajek, G.; Śmiałkowski, K.; Suwara, J.; Fiedorowicz, L.; Leśnikowski Z. Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity *Chem. Eur. J.* **2024**, e202303531
- [5] Kaniowski, D.; Ebenryter-Olbińska, K.; Kulik, K.; Janczak, S.; Maciaszek, A.; Bednarska-Szczepaniak, K.; Nawrot, B.; Lesnikowski, Z. Boron clusters as a platform for new materials: composites of nucleic acids and oligofunctionalized carboranes (C₂B₁₀H₁₂) and their assembly into functional nanoparticles. *Nanoscale* **2020**, *12*, 103–114.
- [6] Janczak, S.; Olejniczak, A.; Balabańska, S.; Chmielewski, M. K.; Lupu, M.; Viñas, C.; Lesnikowski, Z. J. Boron clusters as a platform for new materials: synthesis of functionalized *o*-carborane (C₂B₁₀H₁₂). Derivatives incorporating DNA fragments. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 15118–15122.
- [7] Śmiałkowski, K.; Sardo, C.; Leśnikowski, Z. J. Metallacarborane synthons for molecular construction—oligofunctionalization of cobalt bis(1,2-dicarbollide) on boron and carbon atoms with extendable ligands. *Molecules* **2023**, *28*, 4118.
- [8] Śmiałkowski, K.; Bednarska-Szczepaniak, K.; Kulik, K.; Suwara, J.; Grüner, B.; Nawrot, B.; Leśnikowski Z.J. Synthesis of Composites of DNA and Boron Cluster-Metal Complexes and Their Assembly Into Functional Nanoparticles with anti-EGFR Gene Silencing Activity. Praca w przygotowaniu do druku.
- [9] Kulkarni, J.A.; Witzigmann, D.; Thomson, S.B.; Chen, S.; Leavitt, B.R.; Pieter, R.; Cullis, P. R.; van der Meel R. The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16*, 630–643.
- [10] T. Brown, D. J. S. Brown w *Oligonucleotides and analogues. A Practical Approach*. Ed.: F. Eckstein, IRL Press: Oxford, **1991**, 1–24.
- [11] Nakamura, H.; Aoyagi, K.; Yamamoto, Y. Tetrabutylammonium fluoride promoted novel reactions of *o*-carborane: inter- and intramolecular additions to aldehydes and ketones and annulation via enals and enones. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1167–1171.
- [12] Plešek, J.; Grüner, B.; Báča, J.; Fusek, J.; Čísařová, I. Syntheses of the B(8)-hydroxy- and B(8,8′)-dihydroxy-derivatives of the bis(1,2-dicarbollido)-3-cobalt(1-)ate ion by its reductive acetoxylation and hydroxylation: molecular structure of [8,8′-μ-CH₃C(O)₂<(1,2-C₂B₉H₁₀)₂-3-Co]⁰ zwitterion determined by X-Ray diffraction analysis. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *649*, 181–190.
- [13] Grüner, B.; Švec, P.; Šícha, V.; Padělková, Z. Direct and facile synthesis of carbon substituted alkylhydroxy derivatives of cobalt bis(1,2-dicarbollide), versatile building blocks for synthetic purposes. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 7498–7512.
- [14] Vinas, C.; Benakki, R.; Teixidor, F.; Casabo, J. Dimethoxyethane as a solvent for the synthesis of C-monosubstituted *o*-carborane derivatives. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3844–3845.
- [15] Plešek, J.; Grüner, B.; Čísařová, I.; Báča, J.; Selucký, P.; Rais, J. Functionalized cobalt bis(dicarbollide) ions as selective extraction reagents for removal of M²⁺ and M³⁺ cations from nuclear waste, crystal and molecular structures of the [8,8′-μ-CIP(O)(O)₂<(1,2-C₂B₉H₁₀)₂-3,3′-Co]HN(C₂H₅)₃ and [8,8′-μ-Et₂NP(O)(O)₂<(1,2-C₂B₉H₁₀)₂-3,3′-Co](HN(CH₃)₃). *J. Organomet. Chem.* **2002**, *657*, 59–70.

- [16] Garegg, P. J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Stroemberg, R. Nucleoside Hydrogenphosphonates w *Oligonucleotide Synthesis*. *Chem. Informationsdienst* **1986**, *17*, 168-169.
- [17] Stawinski, J.; Ströberg, R. Di- and oligonucleotide synthesis using H-phosphonate chemistry. w *Oligonucleotide Synthesis*. Herdewijn, P. Ed.; Humana Press: Totowa, **2005**, 81–100.
- [18] Wallin, R.; Kalek, M.; Bartoszewicz, A.; Thelin, M.; Stawinski, J. On the sulfurization of H-phosphonate diesters and phosphite triesters using elemental sulfur. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2009**, *184*, 908–916.
- [19] Hronowski, L. J. J.; Szarek, W. A.; Hay, G. W.; Krebs, A.; Depew, W. T. Synthesis and characterization of 1-*O*- β -lactosyl-(*R,S*)-glycerols and 1,3-di-*O*- β -lactosylglycerol. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 203–218.
- [20] Nekvinda, J.; Švehla, J.; Čisarová, I.; Grüner, B. Chemistry of cobalt bis(1,2-dicarbollide) ion; the synthesis of carbon substituted alkylamino derivatives from hydroxyalkyl derivatives via methylsulfonyl or p-toluenesulfonyl esters. *J. Organomet. Chem.* **2015**, *798*, 112–120.
- [21] Semioshkin, A. A.; Sivaev, I. B.; Bregadze, V. I. Cyclic oxonium derivatives of polyhedral boron hydrides and their synthetic applications. *Dalton Trans.* **2008**, *8*, 977–992.
- [22] Petch, A. K.; Sohail, M.; Hughes, M. D.; Benter, I.; Darling, J.; Southern, E. M.; Akhtar, S. Messenger RNA expression profiling of genes involved in Epidermal Growth Factor Receptor signalling in human cancer cells treated with scanning array-designed antisense oligonucleotides. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 819–830.
- [23] Bennett, M. R.; Anglin, S.; McEwan, J. R.; Jagoe, R.; Newby, A. C.; Evan, G. I. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by c-Myc antisense oligodeoxynucleotides. *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 820–828.
- [24] Endo, Y.; Yamamoto, K.; Kagechika, H. Utility of boron clusters for drug design. Relation between estrogen receptor binding affinity and hydrophobicity of phenols bearing various types of carboranyl groups. *Bioorg Med Chem Lett.* **2003**, *13*, 4089–4092.
- [25] Sedlák, D.; Wilson, T. A.; Tjarks, W.; Radomska, H. S.; Wang, H.; Kolla, J. N.; Leśnikowski, Z. J.; Špičáková, A.; Ali, T.; Ishita, K.; Rakotondraibe, L. H.; Vibhute, S.; Wang, D.; Anzenbacher, P.; Bennett, C.; Bartunek, P.; Coss, C. C. Structure–activity relationship of para-carborane selective estrogen receptor β agonists. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 9330–9353.
- [26] Hirata, M.; Inada, M.; Matsumoto, C.; Takita, M.; Ogawa, T.; Endo, Y.; Miyaura, C. A novel carborane analog, BE360, with a carbon-containing polyhedral boron-cluster is a new Selective Estrogen Receptor Modulator for bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *380*, 218–222.
- [27] Manas, E. S.; Xu, Z. B.; Unwalla, R. J.; Somers, W. S. Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor- β Using X-Ray crystallography and computational methods. *Structure* **2004**, *12*, 2197–2207.
- [28] St. Denis, J.; Gordon Iv, J.; Carroll, V.; Priefer, R. Novel synthesis of the isoflavone genistein. *Synthesis* **2010**, *10*, 1590–1592.
- [29] Himmelsbach, A.; Finze, M. Dicarba-*closo*-dodecaboranes with one and two ethynyl groups bonded to boron. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *13*, 2012–2024.