



**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

Łódź, 2024

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

Pracę dedykuję Rodzicom. Moim najważniejszym nauczycielom.

Serdecznie dziękuję prof. dr hab. Zbigniewowi Leśnikowskiemu za promotorski trud, codzienne motywowanie do działania oraz cierpliwość. Dziękuję również za przekazaną wiedzę oraz niezliczone chemiczne dyskusje.

Dziękuję również wszystkim członkom Zespołu badawczego Pracowni Chemii Medycznej, z którymi miałem przyjemność pracować.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	9
SPIS PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ PRACY DOKTORSKIEJ.....	11
POZOSTAŁA DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA	12
STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ	15
DOCTORAL DISSERTATION ABSTRACT	18
CEL PRACY.....	21
1. WSTĘP LITERATUROWY	22
1.1. Wprowadzenie	22
1.2. Budowa klastrów boru.	23
1.3. Wybrane właściwości dikarbadodekaboranów ($C_2B_{10}H_{12}$).....	26
1.4. Wpływ podstawników na reaktywność wiązania C-H w 1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaboranie (6) i podstawienie przy atomie węgla klastrera.	38
1.5. Budowa i wybrane właściwości metalokarboranów.	46
1.6. Podstawienie przy atomach węgla lub boru w metalokarboranach na przykładzie bis(1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaborano)- <i>commo</i> -3,3'-kobaltanu (III) (13).....	52
2. OMÓWIENIE BADAŃ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ PRACY DOKTORSKIEJ.....	62
2.1. Oligofunkcjonalizacja 1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaboranu ($C_2B_{10}H_{12}$) (6). Opracowanie metody syntezy syntonów do otrzymywania kompozytów DNA i klastrów boru jako bloków budulcowych nanocząstek drugiej generacji.....	66
2.1.1. Funkcjonalizacja 1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaboranu (6) na atomach boru B_9 i B_{12} klastrera. Synteza 9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaboranu (11).	66
2.1.2. Wprowadzenie podstawnika hydroksymetylowego w pozycje C_1 lub C_2 klastrera, funkcyjonalizowanego na atomach boru B_9 i B_{12} . Synteza 1-hydroksymetylo-9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaboranu (1).....	69
2.1.3. Porównanie widm 1H i $^{11}B\{^1H\}$ -NMR oligofunkcjonalizowanych pochodnych 1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaboranu (6), związków 1 , 11 , 12 . Wpływ wprowadzonych podstawników na kwasowość grup C-H mierzony zmianą przesunięcia chemicznego. .	70
2.2. Oligofunkcjonalizacja bis(1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaborano)- <i>commo</i> -3,3'-kobaltanu (III) (13). Opracowanie metody syntezy syntonów do otrzymywania kompozytów DNA i klastrów boru jako bloków budulcowych nanocząstek trzeciej generacji.....	73
2.2.1. Funkcjonalizacja na atomach boru B_8 i $B_{8'}$ poprzez alkilowanie grup hydroksylowych w 8,8'-dihydroksy-bis(1,2-dikarbolido)-3-kobaltanie (III) (14).....	74

2.2.2.	Funkcjonalizacja na atomach węgla pochodnej 8,8'-dialkoksy-[bis(1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaborano)]- <i>commo</i> -3,3'-kobaltanu (III) (20) funkcjonalizowanej na atomach boru B ₈ i B _{8'} w reakcji z tlenkiem etylenu.	77
2.2.3.	Funkcjonalizacja na atomach boru B ₈ i B _{8'} . Synteza estru kwasu tiofosforowego 8,8'-dihydroksy-[bis(1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaborano)]- <i>commo</i> -3,3'-kobaltanu (III) (24), pochodnej metalokarboranu o zahamowanej rotacji.....	80
2.2.4.	Alkilowanie na atomie siarki cyklicznego estru kwasu tiofosforowego 8,8'-dihydroksy-[bis(1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaborano)]- <i>commo</i> -3,3'-kobaltanu (III) (24).....	82
2.2.5.	Funkcjonalizacja na atomach węgla S-alkilowanej pochodnej 31 cyklicznego estru kwasu tiofosforowego 8,8'-dihydroksy-[bis(1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaborano)]- <i>commo</i> -3,3'-kobaltanu (III) (24) w reakcji z tlenkiem etylenu.	84
2.2.6.	Metoda syntezy 8-(5-hydroksy-3-oksa-pentoksy)-[1,1'-di(2-O-trytyloksyetylo)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu (2), syntonu do otrzymywania kompozytów DNA i klasterów boru trzeciej generacji.	87
3.	Otrzymywanie nanocząstek drugiej generacji posiadających zdolność równoczesnego wyciszania dwóch onkogenów: EGFR oraz c-MYC.....	90
3.1.	Synteza bloków budulcowych do konstrukcji nanocząstek drugiej generacji.	90
3.2.	Składanie otrzymanych bloków budulcowych w nanocząstki drugiej generacji, badania fizykochemiczne i biologiczne.....	92
4.	Synteza i wstępne badania biologiczne analogów genisteiny zawierających w swojej strukturze klaster boru.....	94
4.1.	Synteza 9-etynylo-1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaboranu.	94
4.2.	Synteza 3-(1,2-dikarba- <i>closo</i> -dodekaboran-9-etynylo)-5,7-dihydroksy-4H-chromen-4-onu (46).....	95
4.3.	Wstępne badania biologiczne otrzymanych analogów 46 i 48 genisteiny.....	98
	PODSUMOWANIE.....	99
	BIBLIOGRAFIA.....	101
	KOPIE PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ PRACY DOKTORSKIEJ.....	109

WYKAZ SKRÓTÓW

Asn	Asparagina (ang.: asparagine)
AUG	Kodon startowy trzech nukleotydów różniących się rodzajem zasady azotowej wchodzącej w ich skład. A – adenina U – uracyl G - guanina
CBMiM	Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych w Łodzi (ang.: The Centre of Molecular and Macromolecular Studies)
c-MYC	Protoonkogen komórkowy (ang.: myelocytomatosis oncogene)
COVID-19	Choroba wywołana przez koronawirus SARS-CoV-2 (ang.: coronavirus disease 2019)
CSD	Krystalograficzna baza danych małych cząsteczek związków organicznych i metaloorganicznych. (ang.: Cambridge Structural Database)
DBU	Zasada organiczna, 1,8-diazabicyklo(5.4.0)undek-7-en
DIPEA	N,N-Diisopropylodetyloamina (ang.: N,N-diisopropylethylamine)
DME	1,2-Dimetoksyetan (ang.: 1,2-dimethoxyethane)
DMSO	Dimetylosulfotlenek (ang.: dimethylsulfoxide)
DMTr	Grupa ochronna dimetoksytrytylowa (ang.: dimethoxytriyl group)
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy (ang.: deoxyribonucleic acid)
EGFR	Receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (Epidermal Growth Factor Receptor)
EINS	Mechanizm substytucji nukleofilowej indukowanej elektrofilem (ang.: electrophile induced nucleophilic substitution)
EMA	Europejska agencja leków (ang.: European Medicines Agency)
FDA	Agencja żywności i leków w USA (ang.: U.S. Food and Drug Administration)
Gln	Glicyna (ang.: glycine)
hCAII	Anhydraza węglanowa (ang.: carbonic anhydrase)
HMPA	Triamid heksametylofosforowy (ang.: hexamethylphosphoramide)
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang.: high-performance liquid chromatography)
IC ₅₀	Połowa maksymalnego stężenia hamującego (ang.: half maximal inhibitory concentration)
Im	Imidazol (ang.: imidazole)
LCA-CPG	ang.: long chain alkylamine controlled pore glass
MEM	Grupa ochronna 2-metoksyetoksymetylowa (ang.: 2-methoxyethoxymethyl)
miRNA	mikroRNA (ang.: microRNA)
MOM	Grupa ochronna metoksymetylowa (ang.: methoxymethyl)
mRNA	Informacyjny RNA (ang.: messenger RNA)
MTT	Bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy (ang.: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)
n-BuLi	n-Butylolit (ang.: n-buthyllithium)
NMR	Magnetyczny rezonans jądrowy (ang.: Nuclear Magnetic Resonance)
NPA	Analiza populacyjna (ang.: Natural Population Analysis)
PAGE	Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym (ang.: polyacrylamide gel electrophoresis)
PAN	Polska Akademia Nauk (ang.: Polish Academy of Sciences)
PANC-1	Komórki ludzkiego nowotworu trzustki (ang.: human pancreatic cancer cell line)
Phe	Fenylalanina (phenylalanine)
RNA	Kwas rybonukleinowy (ang.: ribonucleic acid)
RT	Temperatura pokojowa (ang.: room temperature)

WYKAZ SKRÓTÓW

RT-PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang.: reverse transcription polymerase chain reaction)
SEP	Szkieletowe pary elektronowe (ang.: skeletal electron pairs)
siRNA	Małe, interferujące RNA (ang.: small interfering RNA)
TBAF	Fluorek tetrabutylamonowy (ang.: tetrabutylammonium fluoride)
TBDMS	Grupa ochronna <i>tert</i> -butylodimetylosililowa (ang.: <i>tert</i> -buthyldimethylsilyl protecting group)
THF	Tetrahydrofuran (ang.: tetrahydrofuran)
TLC	Chromatografia cienkowarstwowa (ang.: thin-layer chromatography)
TNA	Terapeutyczne kwasy nukleinowe (ang.: therapeutic nucleic acids)
Tr	Grupa ochronna trytylowa (ang.: trityl protecting group)
X-Ray	Rentgenografia strukturalna (ang.: X-ray crystallography)

**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.
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.

POZOSTAŁA DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA**1. Udział w konferencjach naukowych.**

- Sardo, C.; Hamera-Fałdyga, R.; **Śmiałkowski, K.**; Leśnikowski, Z. J. Functionalization of metallocarboranes – Synthesis of Cobalt bis dicarbollide cyclic phosphorothioate ester and its alkylation. XXII International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds. 22.11.2019, Łódź, plakat
- **Śmiałkowski, K.**; Sardo, C.; Leśnikowski, Z. J. Functionalization of metallocarboranes 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 klasterów 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)-*com*-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.;** Grúner 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 klastrów boru - nowy materiał dla bionanotechnologii. NCN Symfonia 3, grant 015/16/W/ST5/00413, doktorant-stypendysta, kierownik: prof. dr hab. Zbigniew Leśnikowski

3. Działalność dydaktyczna.

- Udział w XX Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki „Nowe horyzonty”. Kwasy nukleinowe w konstrukcji nowych materiałów dla bionanotechnologii - od molekuly życia do molekularnego przewodnika” – prezentacja będąca połączeniem wykładu popularnonaukowego wraz z przedstawieniem wyników badań w ramach pracy doktorskiej. 18-25.10.2021, Łódź
- Indywidualna opieka nad studentami II stopnia realizującymi praktyki w Instytucie Biologii Medycznej w Pracowni Chemii Medycznej. Zapoznanie studentów z chemią klastrów boru, nietypowych związków nieorganicznych oraz ich koniugatów ze związkami organicznymi.
- Zajęcia dydaktyczne prowadzone w ramach przedmiotu „Praktyka dydaktyczna” szkoły doktorskiej BioMedChem:
 - i. Chemia Organiczna, Konwersatorium – samodzielne prowadzenie ćwiczeń z chemii organicznej dla studentów (Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego) 2019/2020
 - ii. Diagnostyka zakażeń – uczestniczenie w prowadzeniu zajęć (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego) 2019/2020
 - iii. Mikrobiologia ogólna II – uczestniczenie w prowadzeniu zajęć (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego) 2019/2020

- iv. Chemia Organiczna, Laboratorium – uczestniczenie w prowadzeniu zajęć (Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego) 2020/2021
- v. Immunologia – uczestniczenie w prowadzeniu zajęć (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego) 2020/2021

4. 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.

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Moim zadaniem w ramach badań opisanych w niniejszej pracy doktorskiej było stworzenie podstaw chemicznych umożliwiających otrzymywanie, zaprojektowanych jako jeden z celów projektu Symfonia 3, nanocząstek, nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych. Cele te były również podstawą Indywidualnego Planu Badawczego w Szkole Doktorskiej BioMedChem. Zadanie to zostało zrealizowane w wyniku kilkuletnich badań i umożliwiło opracowanie użytecznych w praktyce metod oligofunkcjonalizacji zarówno *orto*-karboranu jak i jego kompleksu z metalem, metalokarboranu zawierającego kobalt i wykorzystanie ich do konstrukcji nanocząstek nowego typu, nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych.

Struktura klastrów boru, stabilizowana jest przez trójwymiarową sieć zdelokalizowanych wiązań kowalencyjnych w której atomy boru (i węgla) skoordynowane są co najmniej z trzema, a czasami nawet pięcioma lub sześcioma atomami boru tworząc wyjątkowo trwałe, „nieklasyczne” układy molekularne. Unikalne 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 klastrów jest wynikiem nakładania się wielu czynników. 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.

W części dotyczącej prac własnych opisałem wyniki badań nad oligofunkcjonalizacją 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu na atomach boru B₉ i B₁₂ oraz atomach węgla C₁ i C₂, a także nad oligonukcjonalizacją metalokarboranu zawierającego kobalt, bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)-*commo*-3,3'-kobaltanu (III) na atomach boru B₈ i B₈' oraz atomach węgla C₁, C₂, C₁' lub C₂'. Ze względu na cel praktyczny prowadzonych przeze mnie badań jakim było otrzymanie funkcjonalizowanych pochodnych klastrów boru umożliwiających syntezę bloków budulcowych nanocząstek, kompozytów klastrów boru i antysensowych DNA-oligonukleotydów, musiały one spełniać wymóg przyłączenia do klastra dwóch podstawników zablokowanych grupą trytylową i jednego podstawnika z wolną grupą hydroksylową. Cel praktyczny uzależniony był od prowadzonych równolegle badań podstawowych rozwijających

wiedzę na temat chemii klastrów boru, metod ich oligofunkcjonalizacji poprzez przyłączanie w sposób w miarę możliwości kontrolowany, jednego, dwóch, trzech lub czterech podstawników do atomów boru i węgla, jak również poszerzania wiedzy o stereochemii tych skomplikowanych układów.

W części dotyczącej oligofunkcjonalizacji 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu zmodyfikowałem i zoptymalizowałem opisaną wcześniej metodę syntezy 9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu, związku kluczowego w dalszych etapach syntezy, oraz opracowałem metodę przyłączania do niego podstawnika hydroksyalkilowego. Otrzymany w ten sposób trójpodstawiony 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboran został z powodzeniem wykorzystany do otrzymania funkcjonalnych nanocząstek drugiej generacji, kompozytów klastrów boru i DNA-oligomerów. Wykorzystując spektroskopię ^{11}B -NMR i ^1H -NMR zanalizowałem wpływ wprowadzania kolejnych podstawników w strukturę 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu na zmianę właściwości klastra związaną ze zmieniającym się rozkładem gęstości elektronowych w cząsteczce oraz stereochemię otrzymanych pochodnych.

W części dotyczącej oligofunkcjonalizacji metalokarboranu, bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)-*commo*-3,3'-kobaltanu (III) (COSAN) opracowałem: 1) metodę syntezy pochodnych COSANU dwupodstawionych na atomach boru B_8 i B_8' grupami hydroksyalkilowymi zablokowanymi grupami trytylowymi lub *tert*-butylodimetylosililowymi; 2) metodę syntezy pochodnych COSANU funkcjonalizowanych na atomach B_8 i B_8' i dodatkowo mono- lub dwufunkcjonalizowanych na atomach węgla C_1 , C_1' , C_2 lub C_2' ; 3) metodę syntezy cyklicznych estrów tiofosforanowych 8,8'-dihydroksy-COSANU, pochodnych o zahamowanej rotacji, alkilowanych na atomie siarki podstawnikami alkilowymi liniowymi lub rozgałęzionymi; 4) metodę oligofunkcjonalizacji grupami hydroksyalkilowymi na atomach węgla C_1 , C_1' , C_2 lub C_2' pochodnych COSANU o zahamowanej rotacji, wymienionych w punkcie 3; 5) metody syntezy 8-(5-hydroksy-3-oksa-pentoksy)-[1,1'-di(2-O-trytyloksyetylo)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu (III), nowego typu oligofunkcjonalizowanej pochodnej COSANU. Pochodna ta została już wykorzystana do otrzymania nanocząstek trzeciej generacji. Wszystkie wymienione pochodne i stojące za nimi badania chemiczne stanowią oryginalny wkład w chemię klastrów boru.

Ponadto, podobnie jak w przypadku 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu, wykorzystując spektroskopię ^{11}B -NMR i ^1H -NMR zanalizowałem wpływ wprowadzania podstawników w strukturę metalokarboranu na zmianę właściwości cząsteczki związaną ze zmieniającym się rozkładem gęstości elektronowych w cząsteczce oraz stereochemię otrzymanych pochodnych. Złożoność tych procesów i zależności w przypadku metalokarboranów jest nawet jeszcze

większa niż w przypadku 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu. Wyniki moich badań mogą stanowić przyczynek do ich lepszego zrozumienia.

Następnie opisałem pokrótce wykorzystanie otrzymywanych przeze mnie oligofunkcjonalizowanych klasterów boru do: 1) syntezy bloków budulcowych nanocząstek, kompozytów klasterów boru i antysensowych DNA-oligonukleotydów poprzez przyłączenie DNA-oligomeru do funkcjonalizowanego klastera boru, 2) konstrukcji nanocząstek na drodze składania otrzymanych bloków budulcowych i 3) badania właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej uzyskanych nanocząstek. Część pierwsza tych prac zrealizowana została w ramach współpracy z Pracownią Terapeutycznych Kwasów Nukleinowych kierowaną przez Profesor Barbarę Nawrot (Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych CBMiM), a część druga i trzecia zostały zrealizowane w naszej Pracowni w Instytucie Biologii Medycznej PAN, głównie przez Panią dr Katarzynę Bednarską-Szczepaniak i Panią dr Gabrielę Gajek (w ramach umowy zlecenia). Szczegółowy opis tych badań znajduje się w Publikacji 2 (pozycja 9 Bibliografii), której jestem współautorem. Praca ta wraz z Publikacją 1 (pozycja 94 Bibliografii) stanowią podstawę mojej dysertacji. Praca stanowiąca pozycję 101 Bibliografii, podsumowuje najnowsze wyniki moich badań opisane w części 2.2.6 i jest w przygotowaniu do druku.

W końcowej części pracy opisuję wyniki wstępnych badań nad syntezą analogów genisteiny zawierających klaster boru, 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu. Wątek ten co prawda nie wiąże się bezpośrednio z zagadnieniem oligofunkcjonalizacji klasterów boru jednak nawiązuje do tytułu mojej pracy w kontekście syntezy związków bioaktywnych. Genisteina jest związkiem naturalnym z grupy flawonoidów o szerokim spektrum aktywności. Mnie zainteresowało jej działanie hormonopodobne i powinowactwo do receptorów β -estrogenowych (ER). Otrzymałem dwie pochodne genisteiny z klasterem boru, pochodne te wykazały zróżnicowaną cytotoksyczność *in vitro* w liniach komórkowych Huh70 (badania cytotoksyczności wykonane przez dr Katarzynę Bednarską-Szczepaniak). Obecnie otrzymane pochodne są w trakcie badań selektywności powinowactwa do receptorów ER α i β w CiMUS University of Santiago de Compostela, Hiszpania, w ramach współpracy.

DOCTORAL DISSERTATION ABSTRACT

The objective of the research described in this doctoral thesis was to create chemical basis for the preparation of new types of nanoparticles designed as therapeutic nucleic acid carriers, being one of the tasks of the Symfonia 3 grant project. These aims were also the basis for the Individual Research Plan at the BioMedChem Doctoral School. The planned aim was achieved as a result of several years of research and allowed the development of useful in-practice methods of oligofunctionalization of both *ortho*-carborane as well as its complex with a metal, metallocarborane containing cobalt cation, and their use in the construction of new types of nanoparticles.

The structure of boron clusters is stabilized by a three-dimensional network of delocalized covalent bonds in which boron (and carbon) atoms are coordinated with at least three, and sometimes even five or six, boron atoms, creating extremely stable, "non-classical" molecular systems. The unique properties of carboranes, including aromaticity in three dimensions cause each substitution at a boron or carbon atom change of the distribution of electron densities throughout the whole molecular cluster, and therefore change the reactivity of all other atoms in the molecule. The reactivity change of boron and carbon atoms is the result of the overlap of many factors. In the literature introductory part of the thesis, I attempted to catalog these factors and use them to explain the preferential formation of derivatives of disubstituted carboranes and metallocarboranes compared to their monosubstituted derivatives. This is a problem that often complicates the oligofunctionalization of carboranes and metallocarboranes in the desired form which I also encountered in my research.

In the experimental part of my thesis, I described the results of research on the oligofunctionalization of 1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane on boron atoms B₉ and B₁₂ and carbon atoms C₁ and C₂, as well as on the oligofunctionalization of a metallocarborane containing cobalt, bis(1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane)-*com*-3,3'-cobaltate (III) (COSAN) on boron atoms B₈ and B_{8'} and carbon atoms C₁, C₂, C_{1'} or C_{2'}. Due to the practical goal of my research, which was to obtain functionalized derivatives of boron clusters allowing the synthesis of building blocks of nanoparticles, composites of boron clusters and antisense DNA-oligonucleotides, they had to comply with the requirement of attaching two substituents with a trityl protection group and one substituent with a free hydroxyl group to the cluster. The practical goal depended on parallel basic research broadening knowledge about the chemistry of boron clusters, methods of their oligofunctionalization by attaching, if possible, in a

controlled manner, one, two, three, or four substituents to boron and carbon atoms, as well as expanding knowledge about the stereochemistry of these complex systems.

In the section on oligofunctionalization of 1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane, I modified and optimized the previously described method of synthesis of 9,12-bis(3-O-trityloxyprop-1-yl)-1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane, the key compound for further synthetic steps and I designed the method of attaching hydroxyalkyl substituent. Thus synthesized trisubstituted 1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane was successfully used to obtain functional nanoparticles of second generation, composites of boron clusters, and DNA-oligomers. Using ^{11}B -NMR and ^1H -NMR spectroscopy I analyzed the influence of incorporation of subsequent substituents into boron cluster structure on its properties change related to the changing of electron density distribution in cluster and stereochemistry of obtained derivatives.

In the section on functionalization of metallacarborane bis(1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane)-*com*-3,3'-cobaltate (III) (COSAN) I designed: 1) synthesis method of COSAN derivatives, disubstituted on boron atoms B_8 and B_8' with alkylhydroxy groups with trityl or *tert*-butyldimethylsilyl protections, 2) synthesis method of COSAN derivatives functionalized on B_8 and B_8' boron atoms and simultaneously mono- or difunctionalized on carbon atoms C_1 , C_1' , C_2 , C_2' , 3) synthesis method of cyclic thiophosphate esters of 8,8'-dihydroxy COSAN with hampered rotation of carboranyl ligands, alkylated on sulfur atom with linear or branched substituents, 4) method of oligofunctionalization with alkylhydroxy groups on carbon atoms C_1 , C_1' , C_2 or C_2' of COSAN derivatives with hampered rotation of carboranyl ligands mentioned in 3, 5) method of synthesis of 8-(5-hydroxy-3-oxa-pentoxy)-[1,1'-di(2-O-trityloxyethyl)-bis(1,2-dicarbollide)-3,3'-cobaltate (III), a new type of oligofunctionalized derivative of COSAN. This derivative was used to obtain nanoparticles of third generation. All of the above-mentioned derivatives and chemical research constitute original contributions to boron clusters chemistry.

Moreover, similar to 1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane, using ^{11}B -NMR and ^1H -NMR spectroscopy I analyzed the influence of incorporation of substituents into metallacarborane structure on its properties change connected with the changing distribution of electron density and stereochemistry of obtained derivatives. The complexity of these processes for metallacarboranes is even bigger than for 1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane. The results of my research may contribute to its better understanding.

Next, I described, in short, the use of obtained oligofunctionalized boron clusters in 1) synthesis of building blocks of nanoparticles, composites of boron clusters and anti-sense DNA-oligonucleotides by incorporation of DNA-oligomer to functionalized boron cluster, 2) assemble of nanoparticles by annealing of obtained building blocks, 3) research on

physicochemical properties and biological activity of nanoparticles. The first part was carried out in the cooperation with Laboratory of Nucleic Acid Therapeutics (Centre of Molecular and Macromolecular Studies), and the second and the third parts were performed in our Laboratory in the Institute of Medical Biology of Polish Academy of Sciences, mainly by dr Katarzyna Bednarska-Szczepaniak and dr Gabriela Gajek. A more detailed description of this research can be found in Publication 2 (position 9 of the Bibliography) of which I am a co-author. This work along with Publication 1 (position 94 of the Bibliography) constitute the basis of my thesis. The work positioned as 101 in the Bibliography part sums up the latest results of research described in part 2.2.6 and is in preparation for publication.

In the last part of my thesis, I described the results of preliminary research on the synthesis of genistein analogs containing 1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane in the structure. This project is not directly connected with oligofunctionalization of boron clusters but refers to the title of the thesis in the context of the synthesis of bioactive compounds. Genistein is a natural compound belonging to flavonoid group with a wide spectrum of activities. I was mostly interested in its hormone-like activity and affinity to β -estrogen receptor (ER). I obtained two analogs of genistein containing boron cluster that show different in vitro cytotoxicity in cell lines Huh70 (cytotoxicity tests were carried out by dr Katarzyna Bednarska-Szczepaniak). Currently, the obtained derivatives are being examined as potential selective α - and β - estrogen modulators within collaboration with Dr Geert A. Daudey of the Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Disease University of Santiago de Compostela, Spain.

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 przyłączanie 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
- oligonukcjonalizację metalokarboranu zawierającego kobalt, bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)-*commo*-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*-dodekaborano)]-*commo*-3,3'-kobaltanu (III), pochodnych metalokarboranu o zahamowanej rotacji
- opracowanie metody alkilowania na atomie siarki cyklicznych estrów tiofosforanowych 8,8'-dihydroksy-[bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)]-*commo*-3,3'-kobaltanu (III) liniowymi i rozgałęzionymi odczynnikami alkilującymi
- synteza z wykorzystaniem opisanych w punktach powyżej platform do przyłączania DNA-oligonukleotydów metodą amidofosforynową
- Opracowanie metody i synteza pochodnych genisteiny modyfikowanej klasterem boru

1. WSTĘP LITERATUROWY

1.1. Wprowadzenie

Początków chemii medycznej klastrów boru można doszukiwać się pod koniec lat siedemdziesiątych XX wieku w pracach Fischli dotyczących oddziaływania chymotrypsyny z peptydem zawierającym karboranyloalaninę [1] oraz prac Eschera dotyczących właściwości farmakologicznych angiotensyny II zawierającej ten sam analog alaniny [2]. Kolejnym krokiem w rozwoju chemii medycznej klastrów boru są prace Endo i współpracowników na początku XXI wieku nad modulatorami receptorów estrogenowych zawierającymi karboran, opartymi na szkieletach steroidowych, takich jak estradiol i androgen [3]. W tym też mniej więcej okresie w badania w obszarze chemii medycznej klastrów boru włączyła się również nasza Pracownia [4], przede wszystkim w zakresie modyfikacji kwasów nukleinowych (DNA i RNA) i ich komponentów (nukleozydów i nukleotydów) klastrami boru oraz badań ich właściwości fizykochemicznych, biologicznych i zastosowań [5].

Moje badania nad oligofunkcjonalizacją klastrów boru jako platform dla DNA-oligonukleotydów i bloków budulcowych do konstrukcji nanocząstek, nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych mieszczą się w tym nurcie - tworzenia podstaw chemicznych syntezy i badań biologicznych koniugatów klastrów boru i kwasów nukleinowych jako potencjalnych bioterapeutyków. Chociaż pomysł kontrolowania ekspresji genów za pomocą oligonukleotydów antysensownych (krótkich fragmentów DNA) został zaproponowany przez Stephensona i Zamecnika prawie pół wieku temu [6] postęp w zastosowaniach klinicznych kwasów nukleinowych był powolny. Sytuacja ta uległa zmianie na przełomie XX i XXI wieku otwierając nową erę w chemioterapii. Oprócz antysensownych oligonukleotydów opracowano wiele innych typów terapeutycznych kwasów nukleinowych (TNA, *ang.: therapeutic nucleic acids*) takich jak małe interferujące RNA (siRNA), mikro-RNA (miRNA), aptamery czy też rybozomy. Tempo rozwoju leków na bazie kwasów nukleinowych przyspieszyło w wyniku licznych badań klinicznych i zezwoleń agencji regulacyjnych takich jak U.S. Food and Drug Administration (FDA), czy też European Medicines Agency (EMA) na wprowadzenie na rynek TNA. Do chwili obecnej szesnaście leków oligonukleotydowych uzyskało zgodę organów regulacyjnych FDA/EMA na stosowanie w praktyce klinicznej: Fomivirsen (Ionis Pharmaceuticals, 1998, wycofany w 2008), Pegaptanib (NeXstar Pharma, 2004), Mipomirsen (Ionis Pharmaceuticals, 2013), Defibrotide (Jazz Pharma, 2016), Eteplirsen (Sarepta Therapeutics, 2016), Nusinersen (Ionis Pharmaceuticals, 2016), Inotersen (Ionis Pharmaceuticals, 2018), Patisiran (Alnylan

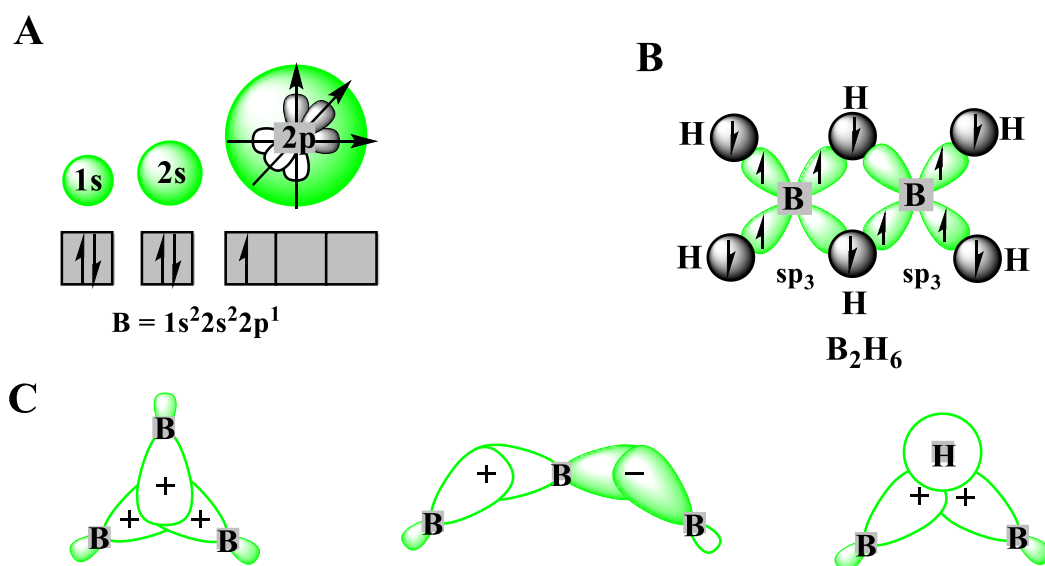
Pharmaceuticals, 2018), Golodirsén (Sarepta Therapeutics, 2019), Givosiran (Alnylam Pharmaceuticals, 2019), Volanesó Ren (Ionis Pharmaceuticals, 2019), Viltólarsén (NS Pharma, 2020), Lumasiran (Alnylan Pharmaceuticals, 2020), Inclisiran (Novartis/Alnylam Pharmaceuticals, 2021), Casimersén (Sarepta Therapeutics, 2021), Vutrisiran (Alnylam Pharmaceuticals, 2022). Do powyższych leków należy dodać szczepionki mRNA przeciw Covid-19 wprowadzone w okresie pandemii takie jak Spikevax (Moderna Biotech, 2020) i Comirnaty (Pfizer Inc., 2021) [7, 8]. Charakterystyczną cechą wszystkich wymienionych TNA jest to, że są one stosowane w formie monoterapii i są skierowane przeciwko jednemu specyficznemu celowi biologicznemu i jednej specyficjnej sekwencji RNA lub DNA. 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, receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR, *ang.: Epidermal Growth Factor Receptor*) i protoonkogeny komórkowego c-MYC (*ang.: myelocytomatosis oncogene*) ulegających nadekspresji w wielu typach nowotworów. W przypadku tradycyjnej chemioterapii skuteczność terapii wielolekowych jest znana i szeroko stosowana. Opisane przez nas i opublikowane ostatnio badania [9] stanowią pierwszy przykład, choć na razie w modelu *in vitro*, terapii wielolekowej (dwulekowej) z wykorzystaniem technologii TNA w oparciu o oligofunkcjonalizowane klasterzy boru.

1.2. Budowa klastrów boru.

Karborany, klasterzy molekularne zawierające w swojej strukturze atomy boru i węgla oraz związane z nimi atomy wodoru, znane są od połowy lat pięćdziesiątych XX wieku choć ich właściwości i struktura zostały poznane lepiej dopiero kilka dekad później. Struktura karboranów, i szerzej innych klastrów boru, stabilizowana jest przez trójwymiarową sieć zdelokalizowanych wiązań kowalencyjnych. W przeciwieństwie do klasycznych organoboranów takich jak borabenzen (C_5H_5B) atomy boru (i węgla) w karboranach skoordynowane są co najmniej z trzema, a czasami nawet pięcioma lub sześcioma atomami boru tworząc wyjątkowo trwałe „nieklasyczne” struktury molekularne. Unikalne właściwości karboranów, w tym aromatyczność w trzech wymiarach (*ang.: 3D aromaticity*) 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. Zjawisko to choć dobrze rozpoznane w literaturze, ciągle wymyka się precyzyjnemu opisowi, co utrudnia przewidywanie przebiegu kolejnych reakcji podstawienia

w klastrach boru mających prowadzić do pożądanej oligofunkcjonalizacji. Końcowy efekt w postaci zmieniającej się reaktywności atomów boru i węgla klastrów jest wynikiem nakładania się wielu czynników, poniższy wstęp literaturowy stanowi 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.

Bor jest pierwiastkiem o liczbie atomowej 5, posiadającym 3 elektrony walencyjne i konfigurację $1s^2 2s^2 2p^1$. W stanie wzbudzonym przyjmuje hybrydyzację trygonalną sp^2 z wolnym orbitalem p, dzięki czemu jest w stanie przyjąć parę elektronową wraz ze zmianą hybrydyzacji na sp^3 co czyni go silnym centrum kwasu Lewisa [5, 10, 11]. Ze względu na niską elektroujemność boru oraz to, że posiada tylko 3 elektrony walencyjne na 4 walencyjnych orbitalach bor jest zdolny do tworzenia wiązań 3-centrowych, 2-elektronowych ($3c2e$), czyli takich, w których jedna para elektronowa łączy ze sobą 3 centra (atomy). Takie nakładanie się orbitali walencyjnych pozwala na tworzenie wiązań B-H-B, B-B-B, a nawet wiązań wielocentrowych (**Rysunek 1**) [12].



Rysunek 1. Konfiguracja elektronowa boru w stanie podstawowym (A); 3-centrowe-2-elektronowe wiązanie w diboranie B_2H_6 (B); typy wiązań 3 centrowych: zamknięte B-B-B, otwarte B-B-B, otwarte B-H-B (C).

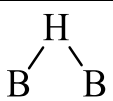
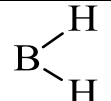
Konsekwencją kombinacji wiązań $2c2e$ (klasycznych wiązań w chemii organicznej), oraz wiązań $3c2e$ jest tworzenie się struktur o zdelokalizowanej gęstości elektronowej, co zostało po raz pierwszy opisane przez Williama N. Lipscomba (nagroda Nobla z dziedziny chemii w 1976 roku) [13]. Przykładem cząsteczek o takich strukturach są borany (borowodory)

o wzorze ogólnym B_nH_m i odpowiadające im aniony, o strukturze deltahedronów, wielościanów których powierzchnie są trójkątami równobocznymi. Nie wszystkie borany są związkami stabilnymi, liczba stabilnych boranów ogranicza się do związków, dla których $n = 6-12$ [12]. Strukturę boranów można przewidzieć stosując reguły Wade’a-Mingosa [12], dzięki którym znana jest ilość szkieletowych par elektronowych SEP (*ang.*: *skeletal electron pairs*) w strukturach wielościennych. Liczba SEP odnosi się nie tylko do wiązań B-B-B, ale także do mostkowych wiązań B-H-B jeśli takie występują w strukturze. Deltahedralne borany (klastery boru) możemy podzielić na klastery o strukturze (**Rysunek 2, Tabela 1**):

- *closo* – zamknięte, struktury posiadające n wierzchołków i $4n+2$ elektronów walencyjnych, gdzie $n+1$ par elektronów jest zaangażowane w wiązania szkieletowe
- *nido* – otwarte, „gniazdowe” struktury o liczbie wierzchołków $n+1$ (jeden wierzchołek jest określany jako „fantomalny”) i $4n+4$ elektronach walencyjnych, gdzie $n+2$ par elektronowych tworzą szkielet
- *arachno* – otwarte, „pajęczynowe” struktury o liczbie wierzchołków $n+2$ (dwa wierzchołki „fantomalne”), $4n+6$ elektronów walencyjnych oraz $n+3$ par elektronowych

W przypadku serii klasterów boru o takiej samej ilości wierzchołków n zmiana z *closo*- do *arachno*- wymaga dodatkowej pary SEP, od $n+1$ dla *closo*- do $n+3$ dla *arachno*-. Z tego względu całościowy ładunek klastera musi albo wzrastać albo musi zostać dodany do struktury mostkowy atom wodoru (**Rysunek 2**) [14]. W strukturze klasterów boru występują atomy wodoru o różnym położeniu w klastrze co również może wskazywać na formę geometryczną związku (**Tabela 1**) [15,16].

Tabela 1. Rodzaje atomów wodoru w boranach i karboranach

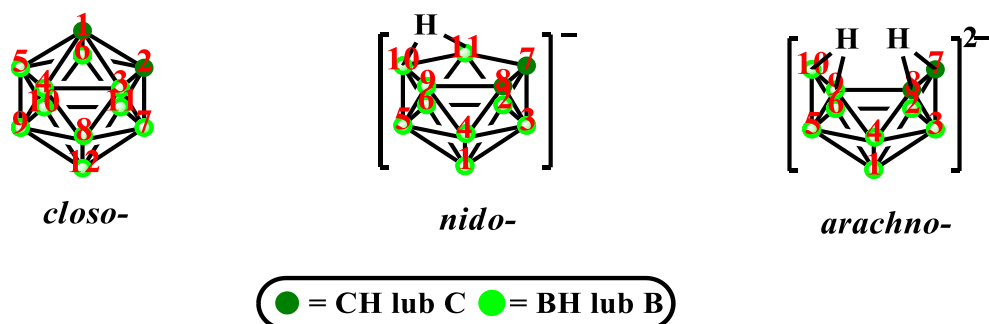
Struktura klastera	Rodzaj atomu wodoru		
	egzo-terminalne atomy wodoru	mostkowe atomy wodoru	endo-terminalne atomy wodoru
	B—H		
<i>closo</i> -	+	rzadko	brak
<i>nido</i> -	+	+	rzadko
<i>arachno</i> -	+	+	+

Pochodne boranów zawierające w swojej strukturze atomy innych pierwiastków niż bor są również znane i nazywane są heteroboranami. Przyjmuje się, że heteroatom może zastąpić jednostkę B-H nie naruszając struktury klastra. Na przykład w *closo*-dodekaboranie $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ zastąpienie dwóch jednostek B-H dwoma izoelektronowymi grupami C-H powoduje powstanie dikarbadodekaboranu, jeśli jednostki B-H zastąpione grupami C-H sąsiadują ze sobą, powstanie 1,2-dikarbra-*closo*-dodekaboran ($C_2B_{10}H_{12}$). W warunkach silnie zasadowych zachodzi regioselektywne usunięcie grupy BH^+ z karboranu, które prowadzi do utworzenia ujemnie naładowanego klastra *nido*- $[C_2B_9H_{12}]^-$, a oderwanie kolejnej grupy BH^+ do utworzenia klastra *arachno*- o podwójnym ładunku ujemnym, $[C_2B_8H_{12}]^{2-}$ (**Schemat 3**, **Schemat 6**) [14].

1.3. Wybrane właściwości dikarbadodekaboranów ($C_2B_{10}H_{12}$)

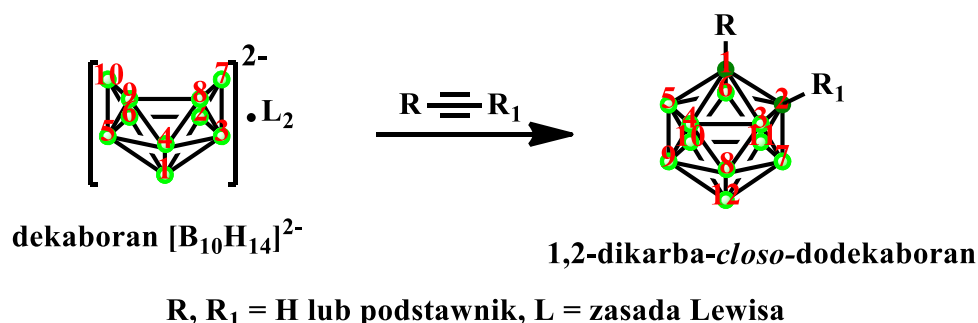
Ze względu na swoją strukturę elektronową i stereochemię lista właściwości klastrów boru odróżniających je od związków organicznych jest długa, niżej omówione są niektóre z nich, na przykładzie klastrów typu dikarbadodekaboranów, mogące mieć znaczenie dla zastosowań klastrów boru w chemii medycznej.

Dikarbra-*closo*-dodekaborany są najczęściej wykorzystywanymi w chemii klastrów boru karboranami ze względu na łatwą dostępność i stabilność, a zarazem podatność na modyfikacje chemiczne. Dwa atomy węgla oraz dziesięć atomów boru tworzą szkielet ikozaedru, dwudziestościanu foremego, którego podstawową jednostką architektoniczną jest trójkąt. Atomy węgla w karboranach biorą udział w tworzeniu wiązań wielocentrowych i tak jak atomy boru są sześciokoordynacyjne. W karboranach, zdelokalizowane elektrony biorące udział w tworzeniu trójwymiarowego szkieletu klastra spełniają regułę 3D aromatyczności Wade-Mingos'a, dlatego też karborany nazywa się strukturami aromatycznymi w trzech wymiarach, „3D aromatycznymi” bądź „superaromatycznymi” [17]. W odróżnieniu od organicznych związków aromatycznych, w których mamy do czynienia ze zdelokalizowanymi elektronami wiązań π węgiel-węgiel, w klastrach boru ich aromatyczność jest wynikiem udziału również wiązań σ [12].



Rysunek 2. Struktura 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu oraz jego pochodnych *nido*- i *arachno*-

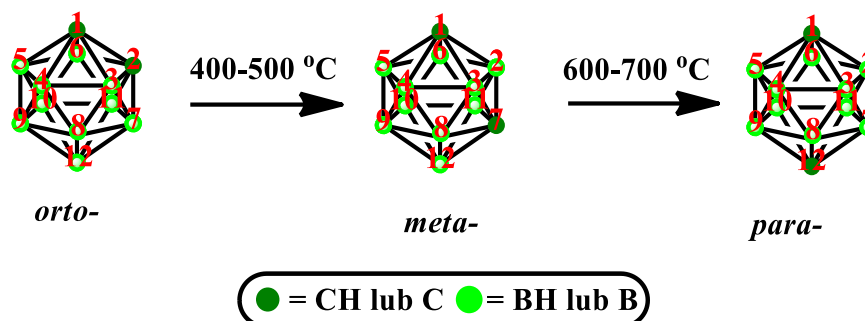
Synteza *orto*-karboranu, jednego z izomerów dikarba-*closo*-dodekaboranu (**Schemat 1**) została po raz pierwszy opublikowana w roku 1963 [18, 19]. *orto*-Karboran został otrzymany w reakcji acetyleny z wygenerowanym *in situ* kompleksem dekaboranu i zasady Lewisa $B_{10}H_{12}L_2$ ($L = CH_3CN, RSR, R_3N$). W reakcji można stosować acetylen z różnymi podstawnikami w celu otrzymania odpowiednich, podstawionych na atomach węgla karboranów. Reakcja nie powinna być prowadzona w obecności ugrupowań nukleofilowych w substracie organicznym, gdyż prowadzi to do niszczenia utworzonego kompleksu dekaboranu z kwasem Lewisa i powoduje niskie wydajności reakcji względem pożądanego produktu [15, 20].



Schemat 1. Reakcja dekaboranu z acetylenem i jego pochodnymi.

Karborany są związkami stabilnymi w obecności utleniaczy, alkoholi i silnych kwasów, cechują się także wysoką odpornością termiczną nawet do 400 °C. W zależności od położenia atomów węgla w klastrze dikarba-*closo*-dodekaboranu ($C_2B_{10}H_{12}$) może on występować w postaci trzech izomerów: 1,2-(*orto*-) 1,7-(*meta*-), 1,12-(*para*-) różniących się między innymi polarnością i momentem dipolowym zmniejszających się w kolejności: *orto*- > *meta*- > *para*- . Izomery *meta*- i *para*- są otrzymywane poprzez termiczną izomeryzację *orto*-karboranu w warunkach inertnych [12]. W temperaturach 400-500 °C izomer *orto*- przekształca się w izomer

meta-, który w temperaturach 600-700 °C ulega izomeryzacji do *para*-karboranu (**Schemat 2**) [15, 20].



Schemat 2. Izomery *orto*-, *meta*-, *para*- dikarba-*closo*-dodekaboranu.

Wprowadzenie atomów węgla w strukturę klastra wpływa na odległości między wszystkimi atomami w całej cząsteczce, w zależności od izomeru (**Tabela 2**). Długość wiązania B-B wynosi od 1,771 do 1,808 Å (dla porównania, w dodekaboranie (B₁₂H₁₂)²⁻ długość wiązania B-B jest stała i wynosi 1,787 Å). Wiązania C-H są krótsze od wiązań B-H. Długość wiązania C-C jest najkrótsza dla niepodstawionego izomeru *orto*- i wzrasta wraz z przyłączeniem podstawników o dużej objętości bądź podstawników elektronodonorowych [21].

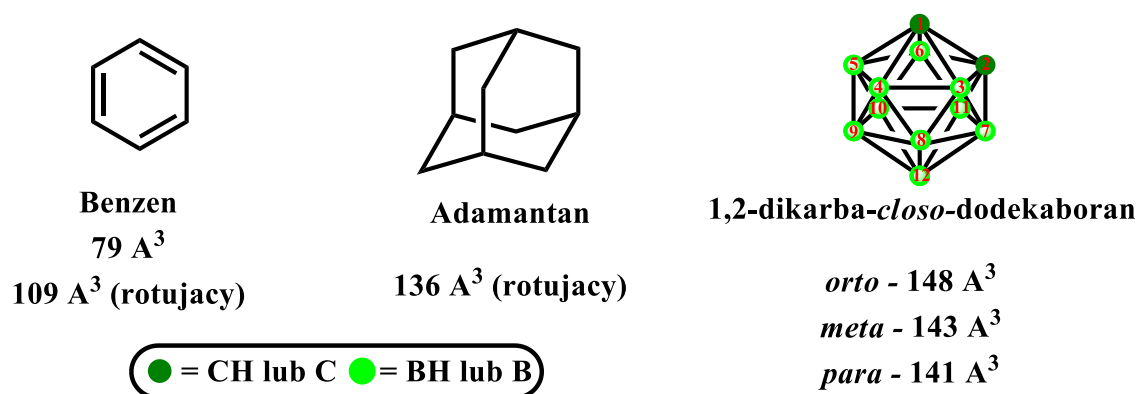
Tabela 2. Długości wiązań w izomerach dikarba-*closo*-dodekaboranu wyznaczone metodą dyfrakcji elektronów w fazie gazowej (GED, *ang.*: *gas electron diffraction*) [21].

Izomer	CC [Å]	CH [Å]	BH [Å]	CB [Å]	BB [Å]
<i>orto</i> -	1,624	1,071	1,192–1,196	1,700–1,734	1,774–1,808
<i>meta</i> -	2,575	1,072	1,194–1,197	1,675–1,730	1,771–1,801
<i>para</i> -	3,029	1,072	1,191	1,698	1,774–1,784

Klaster boru daje możliwość przyłączania podstawników w sposób umożliwiający różne ich ułożenie w przestrzeni względem siebie, co czyni je bardziej użytecznymi od płaskich aromatycznych związków organicznych, jako rusztowań w konstrukcji trójwymiarowych struktur związków bioaktywnych i nowych leków [5, 22].

Izomer *para*- ma kształt nieco wydłużony i najmniej przypomina dwudziestościan foremny, posiada też najmniejszą objętość. W przypadku objętości van der Waalsa (V_{vdw}), która jest ważnym parametrem wykorzystywanym w projektowaniu leków, objętości te, wyznaczone na podstawie struktur krystalograficznych wynoszą 148, 143 i 141 Å³ dla izomerów

odpowiednio *orto*-, *meta*-, *para*-. Dla porównania dla adamantanu, benzenu i rotującego pierścienia fenylogowego wynoszą one 136, 79 i 109 Å³ (**Rysunek 3**) [22]. Objętości wszystkich izomerów dikarba-*closo*-dodekaboranu są zbliżone do objętości adamantanu i prawie dwukrotnie większe od objętości benzenu, nawet gdy uwzględnić rotację pierścienia fenylogowego. Te różnice w V_{vdw} powinny być brane pod uwagę w przypadku projektowania i syntezy związków bioaktywnych, w których cząsteczka adamantanu bądź pierścienia aromatycznego zastąpiona zostanie klasterem boru [22].



Rysunek 3. Obliczone objętości van der Waalsa dla benzenu, adamantanu i karboranów na podstawie struktur krystalograficznych [22].

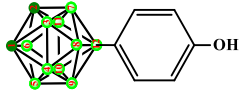
Dikarba-*closo*-dodekaborany mają właściwości wysoce hydrofobowe co spowodowane jest przede wszystkim wodorkowym charakterem atomów wodoru grup B-H klasterów uniemożliwiającym tworzenie przez nie klasycznych wiązań wodorowych z cząsteczkami wody. Należy przy tym zwrócić uwagę na relacje między hydrofobowością a lipofilowością, parametrem częściej stosowanym w charakterystyce związków biologicznie aktywnych. Lipofilowość definiowana jest jako powinowactwo do środowiska lipofilowego. Hydrofobowość jest konsekwencją występowania niepolarnych grup i oddziaływań między nimi, lub innych czynników takich jak wspomniany wyżej wodorkowy charakter atomów wodoru w grupach B-H. Hydrofobowość jest więc komponentem lipofilowości.

Pierwsze badania hydrofobowości karboranów były prowadzone porównując ze sobą C(α)-podstawione pochodne glicyny (fenyloalaninę i jej analogi) w układzie *n*-oktanol/woda [23]. Pierścień fenyłowy fenyloalaniny został zastąpiony: *orto*-karboranem, adamantanem, *tert*-butylem o wartościach parametru hydrofobowości π : 4,20, 3,64, 1,79 ($\pi_{\text{podstawnik}} = \log P_{\text{aminokwas}} - \log P_{\text{glicyna}}$; gdzie $\log P$ to logarytm ze współczynnika podziału P, używany do określenia lipofilowości substancji) [24]. Aminokwas modyfikowany karboranem wykazywał

największą hydrofobowość, a ich wprowadzenie w strukturę peptydu zwiększało odporność na działanie enzymów proteolitycznych i zwiększało efektywność wiązania do określonych receptorów [25].

Porównywano także właściwości hydrofobowe fenolowych pochodnych karboranów (**Tabela 3**) [26]. Podstawnik fenolowy przyłączono do atomów boru i węgla w różnych pozycjach w izomerach dikarba-*closo*-dodekaboranu: *orto*- ($C_{1/2}$, $B_{3/6}$, $B_{9/12}$); *meta*- ($C_{1/7}$, $B_{2/3}$, $B_{9/10}$) i *para*- ($C_{1/12}$, B_2). Dla wszystkich pochodnych wyznaczono współczynnik podziału logP metodą HPLC oraz parametr hydrofobowości π Hansa-Fujity [24]. C-podstawione pochodne karboranów wykazywały większą hydrofobowość niż pochodne z podstawnikiem adamantylowym. Hydrofobowość zależała od rodzaju izomeru oraz miejsca w klastrze do którego przyłączono podstawnik fenolowy. Parametry logP oraz π malały wraz ze wzrostem odległości podstawnika od atomów węgla karboranu. Obecność wolnych grup C-H klastra o charakterze kwasowym pozwala na tworzenie się słabych wiązań wodorowych z rozpuszczalnikiem (wodą) korelując z obniżoną hydrofobowością fenolowych pochodnych karboranów niepodstawionych na atomach węgla [26].

Tabela 3. Wartości logP oraz π dla karboranylowych pochodnych fenoli [26].

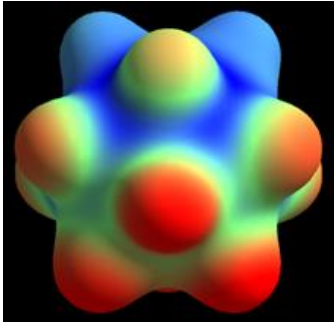
Związek 	Miejsce podstawienia w klastrze	logP	π
4-cykloheksylofenol	-	4,40	2,97
4-(1-adamantylo)fenol	-	5,46	4,04
4-(<i>o</i> -karboran-9-ylo)fenol	$B_{9/12}$	4,11	2,69
4-(<i>m</i> -karboran-9-ylo)fenol	$B_{9/10}$	4,59	3,17
4-(<i>o</i> -karboran-3-ylo)fenol	$B_{3/6}$	5,13	3,71
4-(<i>p</i> -karboran-2-ylo)fenol	B_{2-11}	5,43	4,01
4-(<i>m</i> -karboran-2-ylo)fenol	$B_{2/3}$	5,50	4,08
4-(<i>m</i> -karboran-1-ylo)fenol	$C_{1/7}$	5,68	4,26
4-(<i>o</i> -karboran-1-ylo)fenol	$C_{1/2}$	5,72	4,30
4-(<i>p</i> -karboran-1-ylo)fenol	$C_{1/12}$	5,86	4,44


Warto zwrócić uwagę, że poza wpływem miejsca podstawienia w klastrach na lipofilowość pochodnych do których są przyłączone, badania te rzucają także światło na różne

właściwości atomów boru w tym samym izomerze, np. $B_{9/12}$ vs. $B_{3/6}$ w *orto*-karboranie: 4-(*o*-karboran-9-ylo)fenol ($B_{9/12}$) $\log P = 4.11$ i 4-(*o*-karboran-3-ylo)fenol ($B_{3/6}$) $\log P = 5,13$.

Ze względu na różnice w elektroujemności atomów węgla i boru wiązania B-C są silniejsze niż wiązania C-C. Dlatego też dwa atomy węgla preferują pozycję nieprzyległą do siebie co ma znaczący wpływ na zwiększoną stabilność izomeru *para*- w porównaniu do dwóch pozostałych izomerów. Strukturę elektronową dikarba-*closo*-dodekaboranu zbadano także metodami obliczeniowymi poprzez wykonanie analizy populacyjnej NPA (*ang.*; *Natural Population Analysis*) (**Tabela 4**) [22]. Analiza NPA dodatkowo potwierdza, że atomy wodoru przyłączone do atomów węgla są znacznie bardziej kwasowe od tych, które są przyłączone do atomów boru. Ułożenie atomów węgla w klastrze ma także wpływ na moment dipolowy karboranu, wartości momentów dipolowych dla izomerów dikarba-*closo*-dodekaboranu wynoszą odpowiednio: 4,53 D (*orto*-), 2,85 D (*meta*-), 0 D (*para*-) [22].

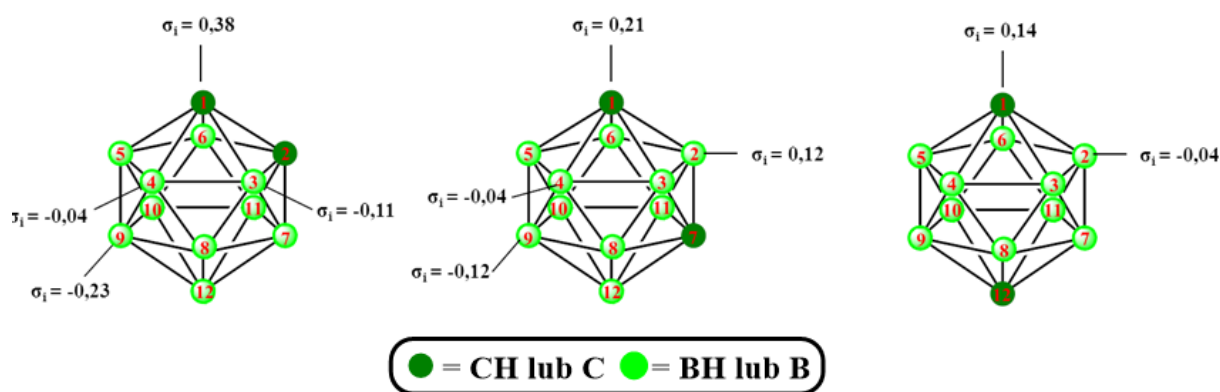
Tabela 4. Rozkład ładunku w niepodstawionych izomerach dikarba-*closo*-dodekaboranu $C_2B_{10}H_{12}$ wyznaczony metodą NPA. [22, 27]

<i>o</i> - $C_2B_{10}H_{12}$		<i>m</i> - $C_2B_{10}H_{12}$		<i>p</i> - $C_2B_{10}H_{12}$	
$C_{1/2}$	-0,496	$C_{1/7}$	-0,639	C	-0,664
$H_{1/2}$	0,300	$H_{1/7}$	0,299	H_C	0,299
$B_{3/6}$	0,158	$B_{3/2}$	0,149	B	0,005
$H_{3/6}$	0,054	$H_{3/2}$	0,066	H_B	0,068
$B_{4/5/7/11}$	0,000	$B_{4/6/8/11}$	-0,021		
$H_{4/5/7/11}$	0,069	$H_{4/6/8/11}$	0,073		
$B_{8/10}$	-0,165	$B_{5/12}$	0,058		
$H_{8/10}$	0,078	$H_{5/12}$	0,056		
$B_{9/12}$	-0,139	$B_{9/10}$	-0,176		
$H_{9/12}$	0,073	$H_{9/10}$	0,080		

Rysunek ilustrujący rozkład gęstości elektronowych w 1,2-dikarba-*closo*-dodeboranie został przygotowany na podstawie obliczeń i udostępniony dzięki uprzejmości dr Katarzyny Bednarskiej. Ładunek ujemny  Ładunek dodatni.

Różnice w rozkładzie gęstości elektronowej wynikające z różnego położenia atomów węgla w izomerach dikarba-*closo*-dodekaboranu powodują zmiany w efekcie indukcyjnym klastrów jako podstawników. Największe zmiany w efekcie indukcyjnym w zależności od miejsca klastra, do którego przyłączono podstawnik wykazuje: *orto*-karboran -0,23 do +0,38; potem *meta*- -0,12 do +0,21; *para*- -0,04 do +0,14 (**Rysunek 4**) [22]. Karborany wykazują

elektronoakceptorowy efekt indukcyjny względem podstawników przyłączonych do atomów węgla. Efekt ten zależy od izomeru i maleje zgodnie z kolejnością *orto-* > *meta-* > *para-*. W przypadku podstawników przyłączonych do atomów boru efekt indukcyjny karboranu zależy nie tylko od izomeru, ale także od położenia atomu boru w klastrze (**Rysunek 4**). Karboran jest silnie elektrodonorowy względem podstawnika przyłączonego do atomów boru najbardziej oddalonych od atomów węgla w klastrze: B_{9/12} (*orto-*); B_{9/10} (*meta-*). Dla podstawników przyłączonych do B_{4/5/7/11} (*orto-*) i B_{4/6/8/11} (*meta-*) oraz B₂ (*para-*) karboran wykazuje właściwości elektronoobojętne, a dla atomów B_{3/6} (*orto-*) i B_{2/3} (*meta-*) elektronoakceptorowe [22, 28].



Rysunek 4. Efekt indukcyjny σ_i w izomerach *orto-*, *meta-* i *para-*karboranu [22, 28].

Silny efekt elektronoakceptorowy karboranów powoduje wysoką kwasowością C-karboksy-, C-hydrokso-, C-merkaptokarboranów [22, 28, 29, 30]. Podane w **Tabeli 5** literaturowe wartości pK_a zostały wyznaczone metodą miareczkowania potencjometrycznego w roztworach 50% etanolu w wodzie, a także w metanolu, acetonitrylu i eterze dietylowym [30]. Najsilniejszymi kwasami, pochodnymi karboranów, są te, których grupy kwasowe zostały przyłączone bezpośrednio do atomu węgla klastra, przy czym ich kwasowość maleje w kolejności: *orto-* > *meta-* > *para-*. Dla porównania pK_a kwasu benzoowego wynosi 5,76 (**Tabela 5**) [22, 31]. Kwasy będące pochodnymi karboranów, w których grupa karboksylowa przyłączona jest do atomu boru (B-podstawione kwasy) charakteryzują się większą wartością pK_a , a różnice w kwasowościach pomiędzy B-podstawionymi izomerami są znacznie mniejsze niż w przypadku C-podstawionych pochodnych. Niezależnie od tego czy grupa kwasowa jest przyłączona do „ubogiego w elektrony” atomu B_{3/6} czy też elektronodonorowego B_{9/12} B-podstawione kwasy są i tak silniejsze od kwasu benzoowego. Porównując kwasowość C- oraz B-merkaptokarboranów do kwasowości aromatycznych merkaptanów należy wziąć pod uwagę nie tylko efekt indukcyjny klastra, ale także potencjalne efekty mezomeryczne. Dla

aromatycznych merkaptanów efekty mezomeryczne powodują że są one znacznie silniejszymi kwasami od ich alifatycznych odpowiedników. Wartości pK_a dla izomerów karboranów niezależnie od tego przy którym atomie węgla lub boru klastera zaszło podstawienie grupą SH wskazują, że kwasowość merkaptokarboranów jest wyraźnie większa od kwasowości alifatycznych merkaptanów. Ta analogia może wskazywać na potencjalny efekt mezomeryczny pomiędzy atomem siarki, a karboranem [30].

Tabela 5. Literaturowe wartości pK_a karboksy-, hydroksy- i merkaptokarboranów wyznaczone metodą miareczkowania potencjometetrycznego [30].

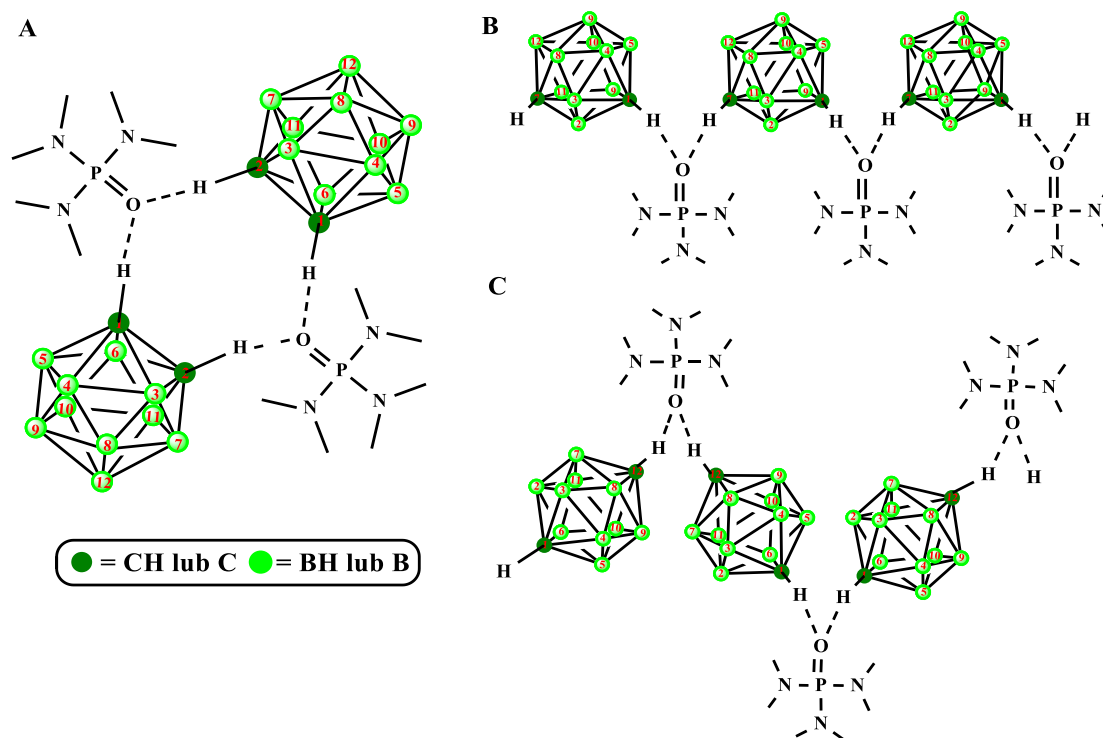
X-C ₂ B ₁₀ H ₁₁	X						
	COOH ^a	COOH ^b	OH ^a	OH ^c	OH ^d	SH ^a	SCH ₂ COOH ^a
1-o	2,61	5,5	5,25	-	-	3,30	3,71
1-m	3,34	6,6	-	-	-	5,30	-
1-p	3,64	7,15	-	-	-	5,85	4,25
3-o	5,38	-	8,70	22,6	21,0	-	-
2-m	5,11	-	9,63	24,3	23,5	-	-
4-o	-	-	11,51	25,6	26,7	-	-
4-m	6,28	-	11,67	28,4	28,0	7,38	-
2-p	-	-	-	27,7	27,3	7,75	4,65
5-m	-	-	-	27,8	27,3	-	-
8-o	-	-	11,50	24,7	31,8	9,32	-
9-m	5,26	-	12	29,6	30,4	9,45	5,00
9-o	5,30	-	-		32,3	10,08	5,13
Aromatyczne merkaptany							
C ₆ H ₅ -SH ^a						7,50	4,53
p-CH ₃ C ₆ H ₄ -SH ^a						7,60	4,63
C ₆ H ₅ CH ₂ -SH ^a						10,74	4,77
Kwas benzoesowy							
C ₆ H ₅ COOH ^a						5,76	

^a50% mieszanina etanolu i wody; ^bmetanol; ^cacetonitryl; ^deter dietylowy [30].

Obecność kwasowych atomów wodoru grup C-H w cząsteczce karboranu pozwala na tworzenie międzycząsteczkowych i/lub wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Kwasowe grupy C-H tworzą wiązania wodorowe C-H...X; gdzie X = O, N, S, F, I, jak również mogą uczestniczyć w oddziaływaniach typu „ π -stacking” [22]. Energie tych wiązań wynoszą

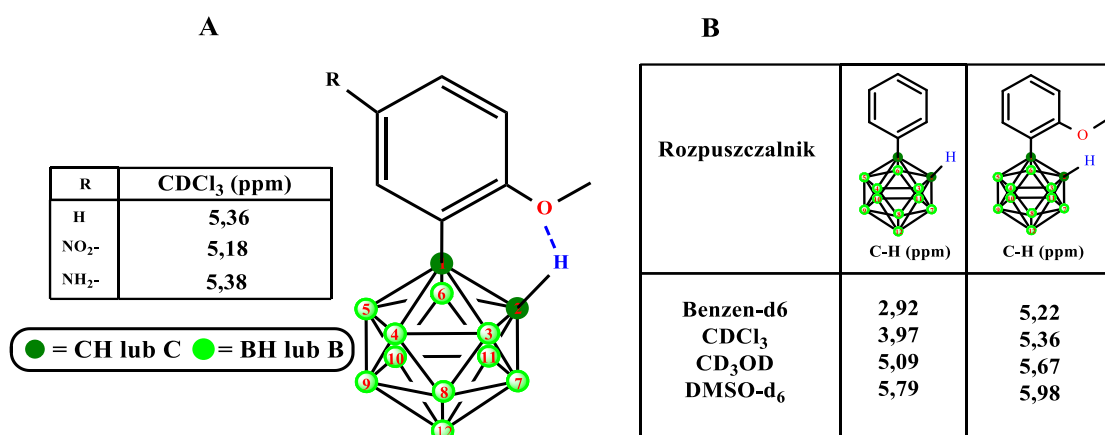
od 8 do 96 kJ/mol. Ta właściwość została wykorzystana w tworzeniu krystalicznych adduktów karboranów z różnymi związkami organicznymi. Analiza krystalograficzna adduktów pozwala na dokładne określenie różnic geometrii izomerów niepodstawionych karboranów, które same nie wykazują tendencji do tworzenia struktur uporządkowanych. Przykładem takiego krystalicznego adduktu może być 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboran połączony z triamidem heksametylofosforowym (HMPA) poprzez wiązania wodorowe C-H \cdots O=P (**Rysunek 5**). W zależności od izomeru *orto*-, *meta*-, *para*-, tworzą się trzy różne krystaliczne addukty. Izomer *orto*- tworzy addukt z HMPA w postaci oddzielnych dimerów. Każdy dimer zbudowany jest z dwóch cząsteczek karboranu i dwóch cząsteczek HMPA, połączonych ze sobą czterema wiązaniami wodorowymi, w których każda cząsteczka HMPA wiąże oba klastery. Długość wiązania pomiędzy atomami węgla w cząsteczce *orto*-karboranu tworzącego dimer wynosi 1,629 Å co jest wartością zbliżoną do wartości wyznaczonej w metodzie dyfrakcji elektronów w fazie gazowej (GDE). Izomery *meta*-, oraz *para*- tworzą polimerowe addukty. W obu przypadkach klastery połączone są mostkowymi cząsteczkami HMPA, jednakże w addukcie *meta*-karboranu wszystkie cząsteczki HMPA położone są po jednej stronie łańcucha zgodnie z konformacją *cis*-, natomiast dla adduktu *para*- karboranu występuje konformacja „zig-zag” *trans*- [32].

Podstawione karborany są zdolne do tworzenia struktur krystalicznych. Międzycząsteczkowe wiązania wodorowe pochodnych karboranowych pomiędzy kwasowymi atomami wodoru grupy C-H karboranu, a elektroujemnymi atomami podstawników przyłączonych do klastera zaobserwowano między innymi dla 9,12-bis-(4-acetylofenylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu, 9,12-bis-(4-fluorofenylo)- i 9,12-bis-(3,5 difluorofenylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu, 3-jodo-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboran [33, 34, 35]. Innym przykładem struktur krystalicznych pochodnych dikarba-*closo*-dodekaboranów mogą być opisane niedawno konjugaty 1,12-dikarba-*closo*-dodekaboranu i adenozyiny [36].



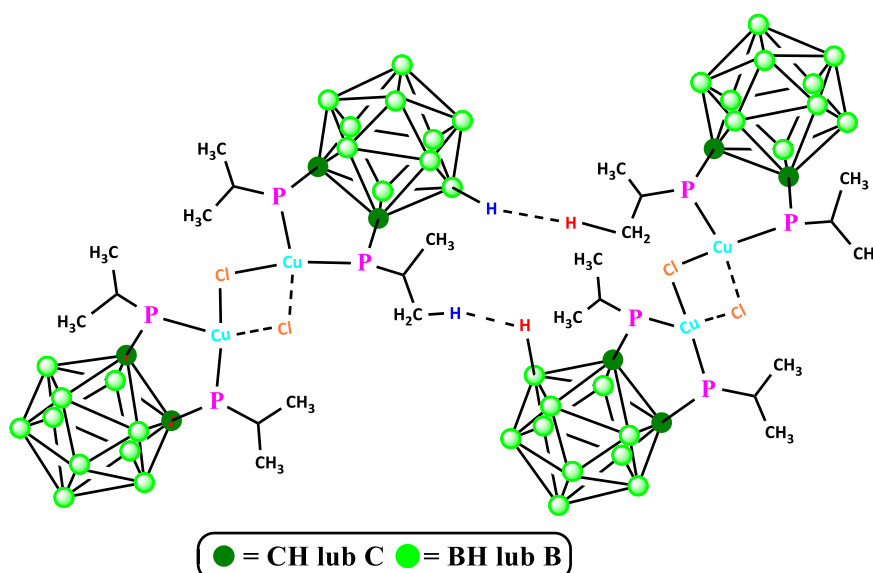
Rysunek 5. Addukty krystaliczne 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu z HMPA dla izomerów: *orto*- (A); *meta*- (B); *para*- (C) [32].

W *orto*-karboranie mogą także występować wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe pomiędzy kwasowym atomem wodoru C-H karboranu, a grupą elektronodonorową podstawnika przyłączonego do sąsiedniego atomu węgla w klastrze. Obecność wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w *orto*-karboranie została potwierdzona analizą $^1\text{H-NMR}$ 2-metoksyfenylo-*orto*-karboranu i jego nitro- i amino- pochodnych [37]. Wartość przesunięcia chemicznego dla protonu grupy C-H niepodstawionego 2-metoksyfenylo-*orto*-karboranu w deuterowanym chloroformie (CDCl_3) wynosiła 5,36 ppm. Wprowadzenie nitrowego podstawnika elektroakceptorowego w pozycji *para*- względem grupy metoksylowej pierścienia fenyloвого powoduje spadek przesunięcia chemicznego sygnału grupy C-H do 5,18 ppm, natomiast wprowadzenia elektronodonorowego aminowego podstawnika powoduje wzrost do 5,38 ppm (**Rysunek 6**). Zależności te są odwrotne do dobrze znanej teorii ekranowania jądra atomu przez chmurę elektronową, której gęstość jest uzależniona od otoczenia chemicznego [38]. Wprowadzenie do pierścienia fenyloвого grupy nitrowej spowodowało obniżenie gęstości elektronowej wokół atomu tlenu podstawnika metoksylowego co spowodowało osłabienie wiązania wodorowego C-H \cdots O, natomiast w przypadku wprowadzenia grupy aminowej wiązanie to jest silniejsze.



Rysunek 6. Wpływ podstawników: nitrowego i aminowego na przesunięcie chemiczne protonu C-H 2-metoksyfenylo-*ortho*-karboranu (A); wpływ deuterowanego rozpuszczalnika na przesunięcie chemiczne C-H 2-metoksyfenylo- i 1-fenylo-*ortho*-karboranu (B).

Ze względu na obecność w klastrze jednostek B-H o różnej gęstości ładunku ujemnego możliwe jest tworzenie się wiązań diwodorowych (4 – 28 kJ/mol) B-H...H-X (elektroujemność $X > H > B$) [39, 40]. Tego typu wiązania zostały zaobserwowane pomiędzy ligandami sąsiadujących kompleksów miedzi CuX (X = Cl, Br) i 1,2-bis(diizopropylfosfino)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu w ich strukturach krystalicznych (**Rysunek 7**). Wiązania diwodorowe występują pomiędzy donorowym atomem wodoru C-H grupy *izo*-propylowej jednego kompleksu, a akceptorowym atomem wodoru B₄-H klastra boru drugiego kompleksu [41].



Rysunek 7. Wiązania diwodorowe pomiędzy atomami wodoru C-H grupy *izo*-propylowej jednego liganda kompleksu miedzi CuCl i 1,2-bis(diizopropylfosfino)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu, a atomem wodoru B₄-H klastra boru liganda sąsiadującego kompleksu [41].

Wiązania diwodorowe mają istotne znaczenie w oddziaływaniach klastrów boru i ich pochodnych z biomolekułami. Przykładem mogą być: 1-metylenosulfonamido-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboran i 7-metylenosulfonamido-7,8-*nido*-dikarba-undekaboran oraz ich powinowactwo do ludzkiej anhidrazy węglanowej hCAII [42]. Pochodna *orto*-karboranu wiąże się słabymi wiązaniami diwodorowymi z fragmentem glicyny Gln92 oraz fenyloalaniny Phe131, (długości wiązań H \cdots H wynoszą odpowiednio 2,0 i 2,2 Å). Pochodna *nido*- ze względu na swój ładunek ujemny, czego konsekwencją jest wzrost wodorkowego charakteru atomów wodoru grup B-H, wiąże się z cząsteczką asparaginy Asn67 poprzez silne, pojedyncze wiązanie diwodorowe (długości wiązań B₄-H \cdots NH₂ wynosi 1,7 Å). Oddziaływania klastrów boru z biomolekułami zbadano także metodami obliczeniowymi. Stosując jako model klastra 1-karba-*closo*-dodekaboran (CB₁₁H₁₂)⁻, a jako model biomolekuły wybrane aminokwasy, wykazano że 1-karba-*closo*-dodekaboran wiąże się z aminokwasami wyłącznie poprzez wiązania diwodorowe [43]. Zbadano także oddziaływania *nido*-karboranów [C₂B₉H₁₁]²⁻, [C₂B₉H₁₂]⁻, [C₂B₉H₁₃] a także metalokarboranów zawierających żelazo, [FESAN]²⁻, [FESAN]; kobalt, [COSAN]⁻ i nikiel, [NISAN]⁻, [NISAN]⁰ oraz ich pochodnych podstawionych atomem fluoru, grupą hydroksylową lub aminową oraz heteroboranów SB₁₁H₁₁, NB₁₁H₁₁ z tetrapeptydem zbudowanym z trzech jednostek alaniny oraz jednego fragmentu glicyny Ala – Gly – Ala – Ala [44]. W kompleksach klastrów boru i tetrapeptydu wiązania diwodorowe występowały wyłącznie pomiędzy atomami wodoru grup NH₂ aminokwasu, a atomami wodoru grup B-H klastra. Tak jak w wyżej opisanych przypadkach wzrost ładunku ujemnego cząsteczki dla *nido*-karboranów oraz dla metalokarboranów powodował tworzenie się silniejszych wiązań diwodorowych [42, 43, 44]. Wykazano także, że wprowadzenie podstawników przyłączonych do atomów boru metalokarboranu może w zależności od rodzaju podstawnika powodować znacznie większe zmiany w geometrii kompleksu metalokarboran-tetrapeptyd niż wzrost ładunku ujemnego kompleksu [44].

Podsumowując, do najważniejszych właściwości klastrów boru mogących mieć znaczenie dla zastosowań w chemii medycznej zaliczyć należy: regularny, sferyczny lub elipsoidalny kształt; aromatyczność w trzech wymiarach; stabilność termiczną i chemiczną, a równocześnie podatność na funkcjonalizowanie; hydrofobowość; zdolność grup C-H do tworzenia wiązań wodorowych i grup B-H do tworzenia wiązań diwodorowych a także bioortogonalność.

1.4. Wpływ podstawników na reaktywność wiązania C-H w 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranie (6) i podstawienie przy atomie węgla klastera.

Jedną z najważniejszych właściwości karboranów jest możliwość przyłączania podstawników zarówno do atomów węgla jak i boru bez degradacji klastera. Przyłączenie podstawnika do atomu węgla i/lub boru powoduje zmiany gęstości elektronowej w całym klastrze wpływając na reaktywność pozostałych, niepodstawionych atomów. Takie zależności są analogiczne do skutków przyłączania podstawników w pierścieniach aromatycznych związków organicznych, z tą różnicą że zachodzą w trzech wymiarach [12, 27].

Niepodstawione karborany są słabymi kwasami Brønsteda, i działając na nie silną zasadą np. *n*-butylolitem (*n*-BuLi) można rozerwać wiązanie węgiel-wodór grup C-H w wyniku czego tworzy się klastr z ładunkiem ujemnym na atomie węgla karboranu. Wartości eksperymentalne pK_a niepodstawionych i nierozpuszczalnych w wodzie karboranów wyznaczone metodami polarograficznymi [45] oraz metodą Streitwiesera [45] wsparte obliczeniami energii deprotonacji wiązania C-H wskazują, że kwasowość protonów CH_{karboran} maleje zgodnie z kolejnością *orto*- > *meta*- > *para*- (**Tabela 6**) [22, 45].

Tabela 6. Wartości pK_a izomerów niepodstawionego dikarba-*closo*-dodekaboranu wyznaczone różnymi metodami eksperymentalnymi [45] wraz z obliczoną energią deprotonacji wiązania C-H metodami *Ab initio*. [22, 45]

Metoda	<i>o</i> -C ₂ B ₁₀ H ₁₂	<i>m</i> -C ₂ B ₁₀ H ₁₂	<i>p</i> -C ₂ B ₁₀ H ₁₂
	pK_a		
Streitwiesera	23,3	27,9	30,0
polarograficzna	19	24	26
$\Delta E_{\text{deprotonacji}}$ (kJ/mol)	1533	1584	1602

Wpływ podstawników przyłączonych do atomów boru 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu na kwasowość wodoru grupy C-H można określić metodą spektroskopii ¹H-NMR porównując ze sobą przesunięcia chemiczne sygnałów pochodzących od protonów grupy C-H w podstawionym na atomach boru karboranie względem niepodstawionego karboranu. Tak jak w przypadku omówionego wyżej wpływu międzycząsteczkowych i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych na kwasowość grupy C-H klastera, spadek gęstości elektronowej wokół badanego protonu a więc i wzrost jego kwasowości będzie związany ze wzrostem przesunięcia chemicznego, natomiast spadek wartości przesunięcia chemicznego będzie równoznaczny ze spadkiem kwasowości C-H [38, 46].

Przyłączanie grup funkcyjnych do atomów boru karboranu jest większym wyzwaniem niż przyłączanie ich do atomów węgla. Ze względu na mniejszą elektroujemność atomów boru, wiązania B-H są znacznie mniej spolaryzowane od wiązań C-H i z tego powodu są niereaktywne nawet względem związków litoorganicznych czy też odczynników Grignarda, ale za to są podatne na atak elektrofilowy [12]. Obecność 10 atomów boru usytuowanych w 4 różnych otoczeniach w klasterze 1,2-dikarba-*orto*-karboranylowym o malejącej gęstości elektronowej $B_{9/12} > B_{8/10} > B_{4/5/7/11} > B_{3/6}$, może powodować powstanie złożonych mieszanin regioizomerów podstawionych pochodnych *orto*-karboranu. Przykładem mogą być reakcje elektrofilowego halogenowania karboranu. W reakcji 1,2-dikarba-*cliso*-dodekaboranu z Cl_2 , Br_2 , I_2 , katalizowanych kwasami Lewisa takimi jak $AlCl_3$, $AlBr_3$, $FeCl_3$, bądź silnymi kwasami nieorganicznymi podstawienie zachodzi kolejno przy atomach boru B_9 , B_{12} , B_8 i B_{10} . Głównymi produktami są monopodstawione i dwupodstawione pochodne $B_{9/12}-X$ oraz $B_{9,12}-X_2$, ale w niektórych przypadkach tworzą się mieszaniny, w których obserwuje się produkty z trzema $B_{8/10,9,12}-X_3$, a nawet czterema podstawnikami $B_{8,10,9,12}-X_4$ ($X = F, Cl, Br, I$) [12]. Jednakże stosując odpowiednie warunki reakcji, oraz odpowiedni katalizator można przeprowadzić względnie selektywne reakcje halogenowania np. w reakcji *orto*-karboranu z jodem pierwiastkowym I_2 , wykorzystując jako rozpuszczalnik chlorek metylenu CH_2Cl_2 oraz chlorek glinu $AlCl_3$ jako katalizator można otrzymać monopodstawioną pochodną z wydajnością 93% [47].

Reakcje halogenowania są jednymi z najpowszechniejszych reakcji funkcjonalizacji *orto*-karboranu, prowadząc zazwyczaj do utworzenia mono- i dwupodstawionych pochodnych. W przypadku monopodstawionych pochodnych *orto*-karboranu należy wziąć pod uwagę to, że podstawnik występujący w pozycji $B_{9/12}$ znajduje się w pozycji *meta*- względem atomu węgla C_1 , a jednocześnie w pozycji *para*- względem C_2 . Wydawałoby się, że w analogii do organicznych związków aromatycznych wraz ze wzrostem elektroujemności wprowadzonego podstawnika kwasowość wiązania C-H będzie rosła. Sytuacja jest jednak odwrotna, kwasowość wiązań C-H rośnie zgodnie z kolejnością $F < Cl < Br < I$ (**Tabela 7**). Wprowadzenie atomu chloru w pozycji *meta*- względem atomu węgla C_1 nie ma znaczącego wpływu na kwasowość związanego z nim atomu wodoru, natomiast dla atomu wodoru związanego z atomem węgla C_2 znajdującego się w pozycji *para*- względem tego atomu chloru obserwowany jest spadek kwasowości. Atom fluoru w pozycji $B_{9/12}$ powoduje spadek kwasowości protonów C-H, a jod wzrost, co w obu przypadkach dotyczy zarówno podstawienia w pozycjach *meta*- jak i *para*- względem obu grup C-H [46]. Przyczyna tego zjawiska może być podobna jak w przypadku halogenków boru BX_3 dyskutowanych niżej.

Tabela 7. Przesunięcie chemiczne w widmach $^1\text{H-NMR}$ protonu dla sygnałów C-H w monopodstawionych pochodnych *orto*-karboranu 9-X-1,2-C₂B₁₀H₁₁ (X = H, F, Cl, Br, I) w CDCl₃ [46, 47].

9-X-1,2-C ₂ B ₁₀ H ₁₁	Elektroujemność	C ₂ (<i>para</i> -) δ ppm	C ₂ (<i>meta</i> -) δ ppm
H	2,1 ^[67]	3,56 ^[46]	
F	4,0 ^[67]	3,36 ^[46]	3,41 ^[46]
Cl	3,0 ^[67]	3,45 ^[46]	3,57 ^[46]
Br	2,8 ^[67]	3,61 ^[46]	3,61 ^[46]
I	2,5 ^[67]	3,70 ^[46]	3,91 ^[46]

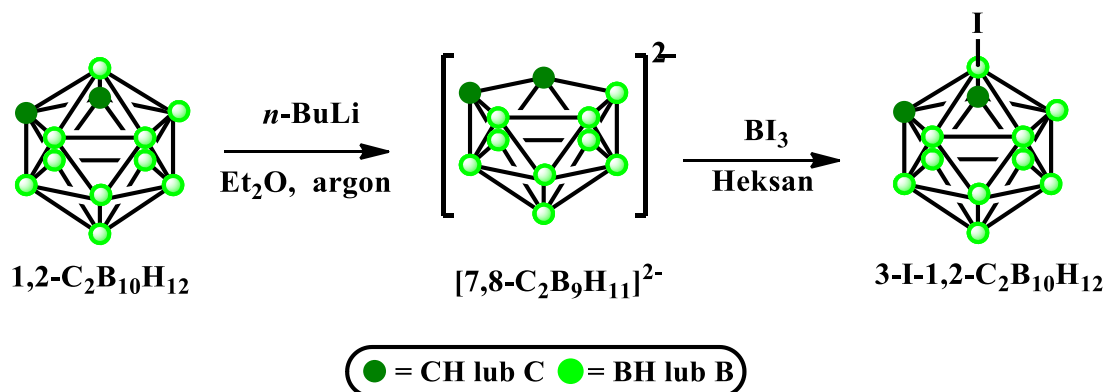
Dla dwupodstawionych atomami halogenów na atomach boru pochodnych *orto*-karboranu należy mieć na uwadze fakt, że na każdą z grup C-H klastra mają wpływ oba podstawniki. Każda grupa C-H znajduje się w pozycji *para*- względem jednego podstawnika i *meta*- względem drugiego. Dla dwupodstawionych pochodnych sytuacja jest analogiczna jak w przypadku monopodstawionych pochodnych karboranu. Wprowadzenie atomów chloru powoduje obniżenie kwasowości grup C-H, natomiast atomy bromu oraz jodu powodują jej wzrost (**Tabela 8**).

Tabela 8. Przesunięcia chemiczne w widmach $^1\text{H-NMR}$ dla protonów grup C-H w dwupodstawionych pochodnych *orto*-karboranu 9,12-X₂-1,2-C₂B₁₀H₁₀ w CDCl₃ [46]

9,12-X ₂ -1,2-C ₂ B ₁₀ H ₁₀	Przesunięcie chemiczne δ ppm	$\Delta\delta$ ppm
Me	3,34	-0,22
	3,38	-0,18
Cl	3,50	-0,06
	3,51	-0,05
H	3,56	-
Ph	3,69	+0,13
Br	3,70	+0,14
	3,71	+0,15
	3,72	+0,16
I	3,98	+0,42
	4,02	+0,46

Pochodne zawierające atom jodu przyłączony do atomu boru *orto*-karboranu mogą ulegać reakcjom sprzęgania katalizowanych metalami przejściowymi i ich związkami np. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ czy $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ z odczynnikami Grignarda dając odpowiednie alkilo- i arylo pochodne [49, 50, 51]. Reakcję tę z powodzeniem wykorzystywałem także w swoich badaniach opisanych w dalszej części niniejszej pracy.

Rozkład gęstości elektronowej w strukturze izomerów *orto*- oraz *meta*-karboranów powoduje, że ulegają one degradacji w środowisku zasadowym (trialkiloamina, hydrazyna, piperidyna, wodny roztwór amoniaku oraz wodorotlenku sodu) poprzez regioselektywne usunięcie najbardziej elektrofilowego atomu boru $\text{B}_{3/6}$ (izomer *orto*-) oraz $\text{B}_{2/3}$ (izomer *meta*-) wraz ze związanym z nim atomem wodoru (grupy B-H) z utworzeniem otwartej formy *nido*- (**Schemat 3**) [12, 52-56]. Karboran w formie *nido*- reaguje z odpowiednim kwasem borowym, bądź halogenkiem boru B-X (X = alkil, aryl, halogen) przyłączając brakujący wierzchołek boru wraz z pożądanym podstawnikiem (**Schemat 3**) [57, 58, 59]. Powtórzenie całej procedury pozwala na otrzymanie dwupodstawionych pochodnych z podstawnikami w pozycjach $\text{B}_{3,6}$ (izomer *orto*-) oraz $\text{B}_{2,3}$ (izomer *meta*-) [46]. Znane są również inne procedury otrzymywania pochodnych podstawionych w pozycjach $\text{B}_{3/6}$ i $\text{B}_{2/3}$ *orto*- i *meta*-karboranów [46].



Schemat 3. Synteza 3-jodo-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu poprzez degradację *orto*-karboranu do otwartej formy *nido*-, a następnie reakcję z trijodkiem boru [57].

Porównując ze sobą przesunięcia chemiczne w widmach $^1\text{H-NMR}$ sygnałów grup C-H pochodnych zawierających podstawnik w pozycji $\text{B}_{3/6}$ klastra można zauważyć, że wprowadzenie podstawnika metylowego obniża kwasowość grup C-H *orto*-karboranu, a wprowadzenie atomu halogenu znacząco ją podwyższa, przy czym wzrost ten jest w niewielkim stopniu zależny od elektroujemności halogenu [46]. Dodatkowo można zauważyć, że podstawniki w pozycjach $\text{B}_{3/6}$ o silnym charakterze elektronoakceptorowym takie jak podstawnik nitrowy czy trójfluorometylowy znacząco zwiększają kwasowość grupy C-H, jednakże jest ona niewiele większa od kwasowości C-H z podstawnikiem jodu przyłączonym

w tej samej pozycji klastra. Podstawniki: aminowy oraz metoksyowy w pozycji B_{3/6} nie mają znaczącego wpływu na kwasowość wiązania C-H (**Tabela 9**) [46].

Tabela 9. Przesunięcia chemiczne dla protonów w widmach ¹H-NMR grup C-H w monopodstawionej pochodnej *orto*-carboranu 3(6)-X-1,2-C₂B₁₀H₁₁ w CDCl₃ [46].

3-X-1,2-C ₂ B ₁₀ H ₁₁	Przesunięcie chemiczne δ ppm	Δδ ppm
Me	3,43	-0,13
H	3,56	-
MeO	3,56	0,00
EtO	3,56	0,00
H ₂ N	3,52	-0,04
	3,55	-0,01
	3,57	+0,01
Et ₂ N	3,58	+0,02
HO	3,63	+0,07
Ph	3,71	+0,15
F	3,76	+0,20
	3,77	+0,21
Cl	3,81	+0,25
Br	3,82	+0,26
	3,84	+0,28
	3,85	+0,29
I	3,84	+0,28
	3,87	+0,31
NO ₂	3,89	+0,33
CF ₃	3,91	+0,35

Wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, które występują w monopodstawionych pochodnych *orto*-karboranu mają znaczący wpływ na kwasowość wiązania C-H dlatego w badaniach kwasowości grup C-H w oparciu o pomiar przesunięcia chemicznego protonu związanego z atomem węgla klastra metodą spektroskopii ¹H-NMR należy wykluczyć pochodne zawierające podstawniki C(O)OR, C(O)NRR', 2-C₆H₄R (R = C(O)OEt, CN, OH, OMe) zdolne do tworzenia takich wiązań. ¹H-NMR dla 3,6-dwupodstawionych pochodnych

pokazuje te same tendencje jak w przypadku monopodstawionych pochodnych wzrostu/spadku C-H kwasowości *orto*-karboranu (**Tabela 10**) [46].

Tabela 10. Przesunięcia chemiczne w widmach $^1\text{H-NMR}$ dla protonów C-H w dwupodstawionej pochodnej *orto*-karboranu $3,6\text{-X}_2\text{-1,2-C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ w CDCl_3 [46].

$3,6\text{-X}_2\text{-1,2-C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$	Przesunięcie chemiczne δ ppm	$\Delta\delta$ ppm
Me	3,31	-0,25
H	3,56	-
NH ₂	3,58	+0,02
Ph	3,85	+0,29
F	3,99	+0,43
Cl	4,07	+0,51
Br	4,14	+0,58
I	4,13	+0,57

Analizując widma $^1\text{H-NMR}$ dla 9,10-dwupodstawionych pochodnych *meta*-karboranu korelacja pomiędzy wzrostem C-H kwasowości klastra a elektroujemnością podstawnika jest analogiczna jak dla pochodnych izomeru *orto*-, z tą różnicą że nawet wprowadzenie atomu chloru powoduje już wyraźny wzrost kwasowości grup C-H i zwiększenie przesunięcia chemicznego protonów tych grup. (**Tabela 11**) [46].

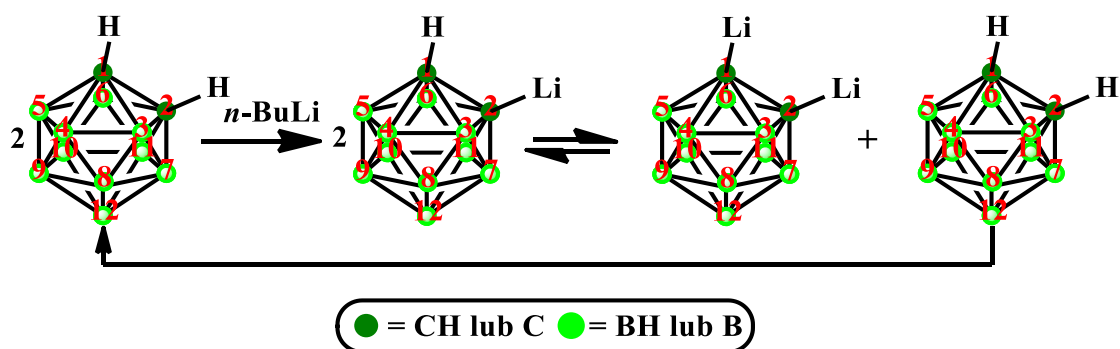
Tabela 11. Przesunięcia chemiczne w widmach $^1\text{H-NMR}$ dla protonów C-H w dwupodstawionej pochodnej *meta*-karboranu $9,10\text{-X}_2\text{-1,7-C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ w CDCl_3 [46].

$9,10\text{-X}_2\text{-1,7-C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$	Przesunięcie chemiczne δ ppm	$\Delta\delta$ ppm
H	3,52	-
Cl	3,76	+0,24
Br	3,88	+0,36
I	4,04	+0,52
	4,08	+0,56

Przyłączenie do atomu boru atomów halogenów o większej elektroujemności, powoduje, wbrew oczekiwaniom, spadek efektu elektronoakceptorowego względem C-H karboranu i spadek kwasowości grupy C-H [46]. Podobna zależność występuje w halogenkach boru BX_3 ($\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$), których kwasowość, jako kwasów Lewisa rośnie wraz z wielkością halogenu a nie jego elektroujemnością [60, 61]. Wydawałoby się, że przyczyną takiego

zjawiska może być hiperkoniugacja wolnej pary elektronowej atomu halogenu, np. fluoru z pustym orbitalem p atomu boru co powodowałoby wzrost bariery energetycznej jaką należałoby pokonać by cząsteczka BF_3 przyjęła parę elektronową jako kwas Lewisa [60]. Teoria ta została jednak zakwestionowana zgodnie z obliczeniami teoretycznymi, które wskazują, że hiperkoniugacja wolnej pary elektronowej halogenku z pustym orbitalem p boru jest tym silniejsza im większy jest atom halogenu [60]. Plumley i inni wykazali, że wraz ze wzrostem wielkości atomu halogenu można zaobserwować wyraźne zmiany w nakładaniu się orbitali boru oraz halogenów biorących udział w tworzeniu wiązań σ [60].

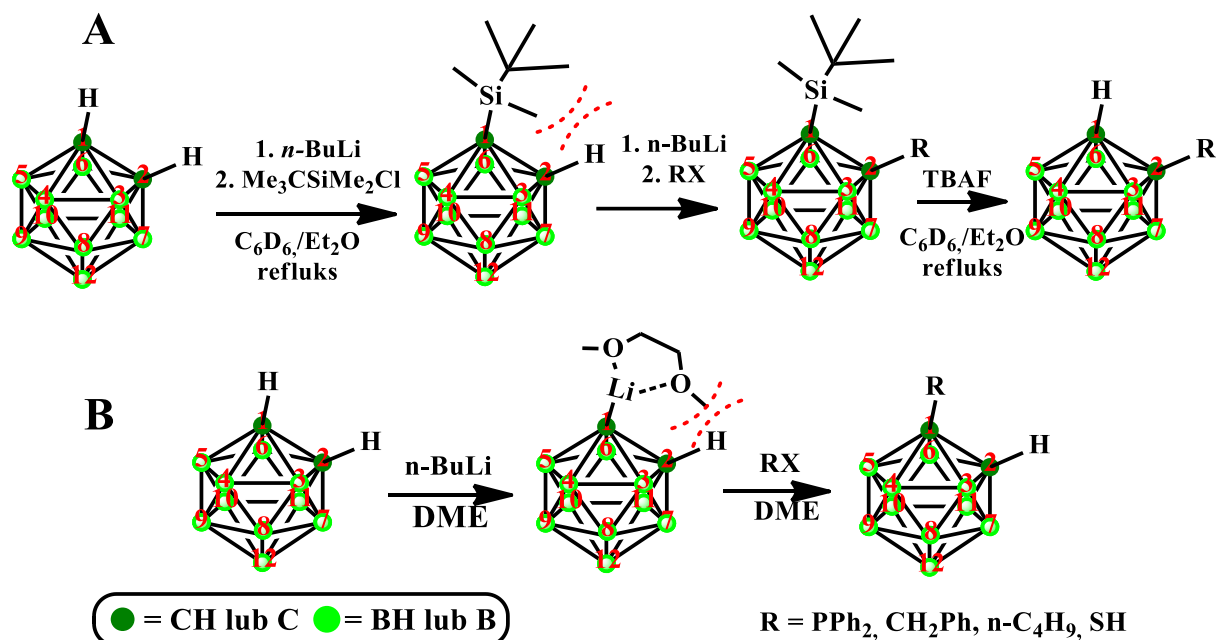
Działając na *orto*-karboran $n\text{-BuLi}$ wiązania C-H klastra ulegają rozerwaniu z oderwaniem protonu tworząc mono- i dwulitopochodne klastra. Dodatkowo, równowagowa dysproporcjonacja monolitopochodnej na dilitopochodną i wyjściowy *orto*-karboran (**Schemat 4**) działa na niekorzyść monopodstawienia, co powoduje, że reakcje litopochodnych *orto*-karboranu z różnymi elektrofilami (na przykład tlenkiem etylenu) nie są selektywne i prowadzą do mieszanin produktów mono- i dwupodstawionych. [12].



Schemat 4. Reakcja dysproporcjonacji monolitopochodnej *orto*-karboranu na dilitopochodną oraz wyjściowy *orto*-karboran.

Jedną z metod uniknięcia powstawania pochodnych dwupodstawionych w procesie alkilowania litopochodnych *orto*-karboranu jest wcześniejsze zablokowanie jednej z grup C-H grupą *tert*-butyldimetylosililową (TBDMS) w reakcji litopochodnych karboranu z chlorkiem *tert*-butyldimetylosililowym. Zawada steryczna wynikająca z dużej objętości grupy TBDMS powoduje powstanie tylko monopodstawionego produktu silylowania (**Schemat 5A**). Działając ponownie $n\text{-BuLi}$, a potem odpowiednim odczynnikiem alkilującym otrzymujemy odpowiednią pochodną monoalkilową. Usuwając grupę TBDMS przy użyciu np. fluorku tetrabutylamoniowego (TBAF) można otrzymać pochodną monopodstawioną [62]. Alternatywną, choć umiarkowanie skuteczną metodą jest zastosowanie w reakcji litowania *orto*-karboranu jako rozpuszczalnika eteru dimetoksyetylowego (DME) (**Schemat 5B**). Kation litu jest koordynowany przez cząsteczkę rozpuszczalnika, która utrudnia powstawanie

dilitopochodnej *orto*-karboranu dzięki czemu działając odpowiednim odczynnikiem alkilującym możliwe jest otrzymanie monopodstawionych na atomach węgla klastera alkilowych pochodnych [63].



Schemat 5. Przykłady metod otrzymywania mono-C-podstawionych pochodnych *orto*-karboranu [12].

Podsumowując i ograniczając się do reaktywności grupy C-H w najpopularniejszym izomerze dikarba-*closo*-dodekaboranów, *orto*-karboranie, można wymienić następujące czynniki, które mają wpływ na reaktywność atomu wodoru związanego z atomem węgla i w konsekwencji powstawanie pochodnych mono- i/lub dwupodstawionych [46]:

- 1) Siła zasad stosowanych do aktywacji grupy C-H. Podstawienie przy atomie węgla *orto*-karboranu boru podstawnikami elektronodonorowym takimi jak podstawnik alkilowy zmniejsza kwasowość drugiej grupy C-H prowadząc preferencyjnie do mono podstawienia w przypadku zastosowania słabszych zasad takich jak fluorek tetrabutylamonowy (TBAF), do aktywacji grup C-H. Jednakże podstawienie przy atomie węgla wobec bardzo silnych zasad takich jak *n*-BuLi niezależnie od efektu elektrodonorowego podstawnika powodującego zmniejszenie kwasowości drugiej grupy C-H, lub braku takiego efektu, prowadzi do powstania mieszaniny produktów mono- i dipodstawionych.
- 2) Rodzaj podstawnika przyłączonego do atomu boru (jego efekt indukcyjny, który wpływa na rozkład gęstości elektronowej w klasterze). Dla atomów halogenów

kwasowość wiązania C-H rośnie zgodnie ze wzrostem wielkości atomu w kolejności $F < Cl < Br < I$ (a nie zgodnie z elektroujemnością halogenu), przesuując tendencję do powstawania pochodnych dwupodstawionych na atomach węgla w tej samej kolejności. Podstawniki alkilowe wykazują charakter elektronodonorowy względem wiązania C-H zmniejszając jego kwasowość. Opisane w literaturze podstawniki takie jak: fenyłowy, trifluorometyłowy, nitrowy powodują wzrost kwasowości C-H.

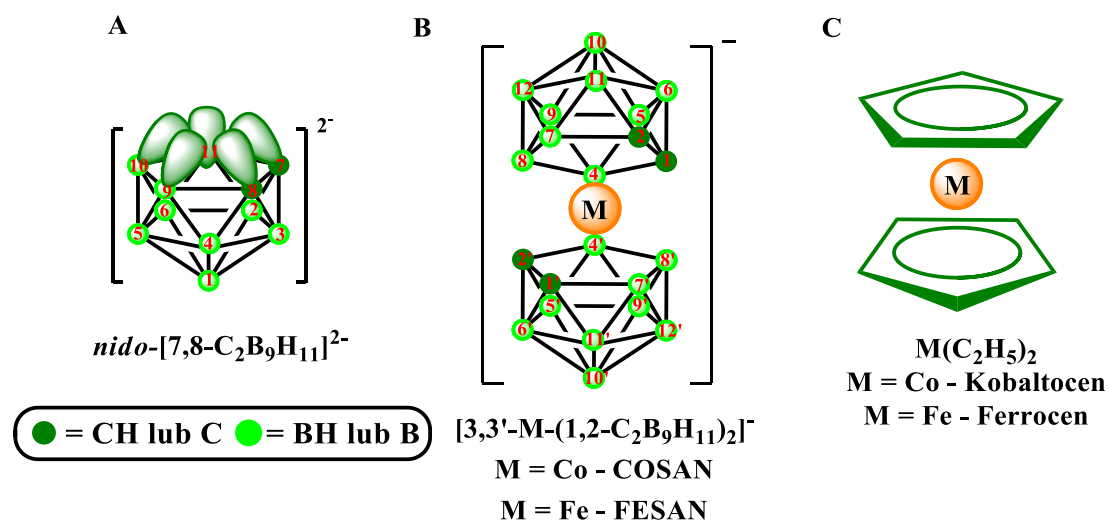
- 3) Odległość podstawnika przyłączonego do atomu boru od grupy C-H (pozycja podstawnika w klasterze): Efekt indukcyjny podstawnika elektronoakceptorowy czy elektronodonorowy jest tym większy im podstawnik znajduje się bliżej grupy C-H $B_{9/12} < B_{8/10} < B_{4/5/7/11} < B_{3/6} < C_{1/2}$.
- 4) Liczba podstawników (addytywność efektów indukcyjnych). Efekt indukcyjny wpływający na reaktywność grup C-H jaki wywołują podstawniki jest sumą efektów indukcyjnych wszystkich podstawników. [46, 64, 65]
- 5) Międzycząsteczkowe oraz wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe $C_{\text{karboran}}-H \cdots X$, które zależą nie tylko od rodzaju podstawnika w klasterze (jego efektu indukcyjnego, pozycji oraz liczby podstawników w klasterze), ale także od rozpuszczalnika i również będą determinować ilość wiązań wodorowych co również wpływa na kwasowość grupy C-H klastera i jej reaktywność.

Biorąc pod uwagę opisane wyżej czynniki wpływające na reaktywność grup C-H *orto*-karboranu oraz ich sumaryczny efekt, można stwierdzić, że w reakcjach przyłączenia podstawników do atomów węgla *orto*-karboranu faworyzowane jest tworzenie się produktu dwupodstawienia co często obserwowane jest w praktyce.

1.5. Budowa i wybrane właściwości metalokarboranów.

Wraz z rozwojem chemii klasterów boru oraz równolegle rozwijającej się dziedziny, chemii metalocenów, zauważono, że anion *nido*-karboranyłowy $[7,8-C_2B_9H_{11}]^{2-}$ z sześcioma zdelokalizowanymi elektronami rozmieszczonymi na orbitalach sp^3 pentagonalnej, otwartej powierzchni klastera utworzonej przez dwa atomy węgla i trzy atomy boru (**Rysunek 8A**) jest podobny do anionu pentadienu $\{[C_5H_5]^{-}, Cp^{-}\}$, który zawiera 6 zdelokalizowanych elektronów na π pentagonalnej, płaskiej powierzchni cząstki [66]. Orbitale π pentadienu nakładają się z orbitalami s, p i d centralnego jonu metalu tworząc trwały kompleks zwany metalocenem [67]. Ze względu na właściwości dianionu karbonyłowego takie jak: podwójny ładunek ujemny

oraz sposób ułożenia orbitali frontalnych, przewidywano że podobnie jak Cp^- będzie on również ligandem zdolnym do tworzenia kompleksów z metalami. W 1965 Hawthorne i współpracownicy potwierdzili to przypuszczenie syntezując pierwszy metalokarboran $[\text{Fe}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$ w reakcji $[\text{7,8-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}]^{2-}$ z FeCl_2 . Warunki reakcji jakie zastosowano były takie same jak w syntezie ferrocenu. Uzyskany produkt utleniono uzyskując kompleks zawierający jon Fe^{3+} [66].

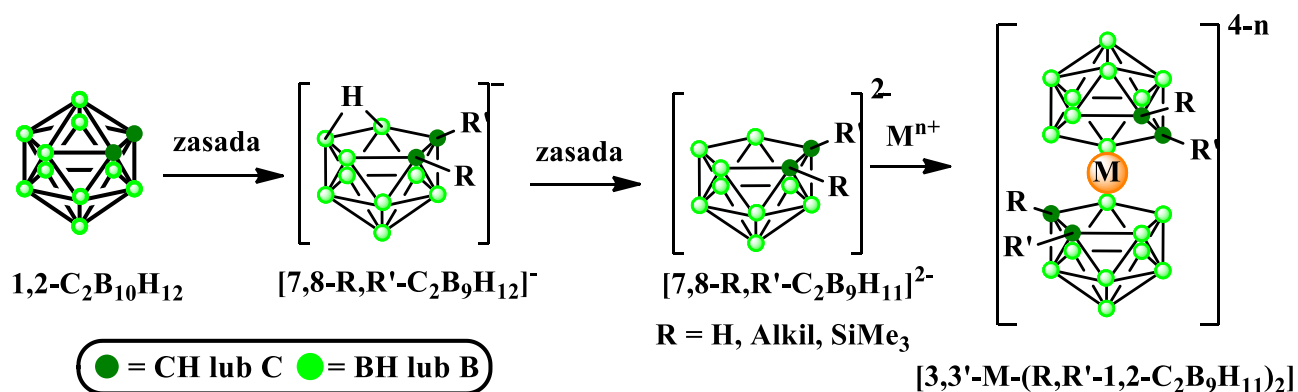


Rysunek 8. Anion *nido*-karboranylowy $[\text{7,8-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}]^{2-}$ z sześcioma zdelokalizowanymi elektronami rozmieszczonymi na orbitalach sp^3 (A), metalokarborany COSAN oraz FESAN (B), metaloceny kobaltocen oraz ferrocen (C).s

Metalokarborany to trwałe kompleksy jonów metali oraz różnego typu karboranów. Wśród nich, najbardziej znanymi są metalokarborany zbudowane z dwóch dianionowych, dikarbolidowych ligandów $[\text{7,8-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}]^{2-}$, pomiędzy którymi znajduje się kation metalu grup przejściowych np. Co^{3+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Ni^{3+} , Cu^{3+} , Au^{3+} [68]. Sumaryczny ładunek ujemny jest zdelokalizowany w całej strukturze kompleksu, który symbolicznie przedstawiany jest niekiedy za pomocą greckiej litery „theta” (θ). Metalokarborany θ to kompleksy typu „sandwich” (z ang. kanapka). Zwyczajowo, ze względu na skomplikowaną nomenklaturę formalną, np. bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)-*commo*-3,3'-kobaltan (III) dla kompleksu z jonem kobaltu, w uproszczeniu nazywa się je podając symbol pierwiastka atomu metalu oraz przyrostek SAN np. nazwa COSAN (Co SAN) odpowiada metalokarboranowi, który zawiera skoordynowany jon kobaltu [69, 70]. Nazewnictwo metalokarboranów opiera się na nazewnictwie karboranów. Pojęcie *commo*- stosuje się w kompleksach, w których jeden z wierzchołków klastra (atom metalu w tym przypadku) jest wspólny dla obu ligandów karbonylowych. Na przykład w bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)-*commo*-3,3'-kobaltanie (III) jon kobaltu stanowi wspólny wierzchołek dla dwóch *nido*-karboranów. W przypadku

dwóch różnych ligandów należy stosować rozwiniętą nazwę np. (1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)(8'-jodo-1',2'-dikarba-*closo*-dodekaborano)-3,3'-kobaltan dla kompleksu, którego jeden z ligandów posiada atom jodu przyłączony do atomu boru klastra. Dla uproszczenia często stosuje się także w literaturze rozwinięte wzory sumaryczne zamiast pełnych nazw metalokarboranów np. [(1-HO(CH₂)₃-1,2-C₂B₉H₁₀)(1',2'-C₂B₉H₁₁)-3,3'-Co(III)]⁻ dla mono-hydroksyalkilo pochodnej COSANU [76].

Najpowszechniejszą metodą otrzymywania **0** metalokarboranów jest metoda polegająca na utworzeniu kompleksu jonu metalu z ligandami dikarbolidowymi [7,8-C₂B₉H₁₁]²⁻. Odpowiednie ligandy dikarbolidowe otrzymuje się zazwyczaj z 1,2-dikarbra-*closo*-dodekaboranu (*orto*-karboranu) w dwuetapowym procesie. W pierwszym etapie zachodzi degradacja (deborowanie poprzez usunięcie jednego wierzchołka B-H) *orto*-karboranu (1,2-C₂B₁₀H₁₂) do monoanionu w formie *nido*- [7,8-C₂B₉H₁₂]¹⁻ a następnie, poprzez oderwanie mostkowego protonu, utworzenie dikarbolidowego dianionu [7,8-C₂B₉H₁₁]²⁻ z podwójnym ładunkiem ujemnym, który reaguje następnie z nieorganicznymi solami odpowiednich metali (**Schemat 6**). Dikarbolidowy dianion otrzymuje się zazwyczaj *in situ* stosując jako zasadę np. wodorotlenek sodu jeśli reakcje prowadzi się w roztworach wodnych, bądź wodorek sodu, *tert*-butanolan potasu czy *n*-BuLi prowadząc reakcje w warunkach bezwodnych, używając jako rozpuszczalników eterów takich jak THF lub DME [12, 68].



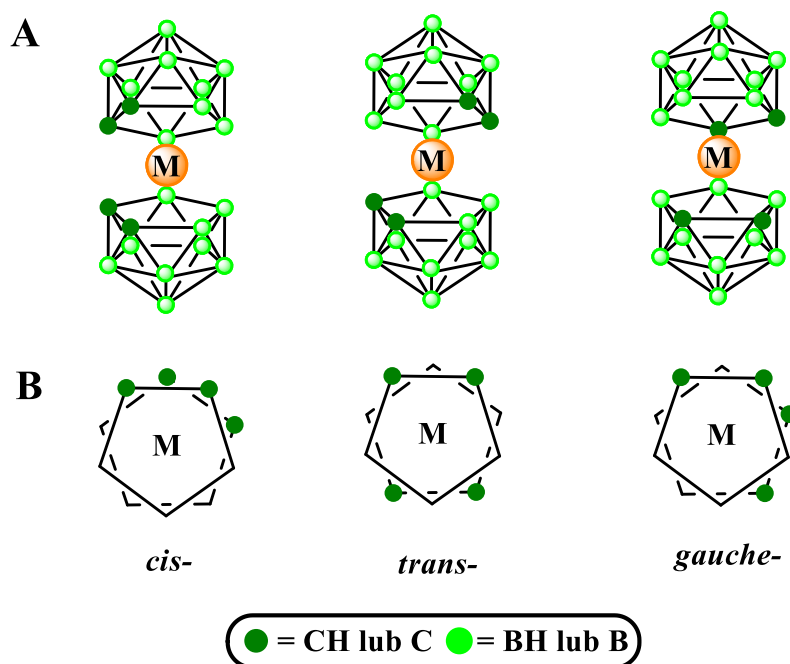
Schemat 6. Synteza metalokarboranów przy użyciu dianionu karboranylowego *nido*-karboranu [12].

Pełna analiza krystalograficzna COSANU została po raz pierwszy wykonana dla soli trójetyloamoniowej [(1,2-C₂B₉H₁₁)₂-3,3'-Co(III)] [Et₃NH]⁺ [71, 72]. Kąt dwuścienny pomiędzy płaszczyznami, utworzonymi przez 2 atomy węgla i 3 atomy boru otwartej części każdego z klastrów wynosi 3,7°, a zatem karboranylowe ligandy [C₂B₉H₁₁]²⁻ są rozmieszczone względem siebie prawie równolegle. Odległości pomiędzy jodem Co³⁺, a każdym z ligandów

wynoszą 1,466 i 1,476 Å. Jon kobaltu znajduje się w podobnej odległości od każdego z atomów otwartej części każdego ligandu (odległości Co-C wynoszą 2,046, a Co-B 2,097) [73].

COSAN, ze względu na możliwe różne położenie względem siebie atomów węgla w ligandach karboranowych, może występować w postaci trzech izomerów konformacyjnych *cisoid* (*cis*), *transoid* (*trans*) oraz *gauche* [68] (**Rysunek 9**). Zgodnie z krystalograficzną bazą danych małych cząsteczek organicznych i metaloorganicznych CSD (*The Cambridge Structural Database*) COSAN w ciele stałym występuje w postaci izomeru *cis*. Istotną rolę w preferowaniu którejs z konformacji odgrywają międzycząsteczkowe diwodorowe wiązania wodorowe C-H...H-B, które występują pomiędzy dwoma cząsteczkami metalokarboranu, i których obecność można zauważyć wyłącznie w konformerach *cis* [73]. Możemy wyróżnić następujące czynniki, które wpływają na konformacje w fazie stałej niepodstawionych metalokarboranów [73]:

- a) Odległość pomiędzy metalem, a płaszczyzną C₂B₃ liganda, która zależy od konfiguracji elektronowej metalu (dla konfiguracji d⁶ wynosi 1,54 Å, a dla d⁷ 1,46 Å) [73].
- b) Stopień utlenienia metalu. Zmiana stopnia utlenienia wpływa na rozkład gęstości elektronowej metalokarboranu co powoduje zmianę kwasowości grup C-H. Większa kwasowość pozwala na efektywniejsze tworzenie się międzycząsteczkowych wiązań diwodorowych C-H...H-B między atomem wodoru grupy C-H z cząstkowym ładunkiem dodatnim, a atomem wodoru z cząstkowym ładunkiem ujemnym grupy B-H, które występują w izomerach *cis* COSANU z trójodwartym jonem kobaltu. COSAN zawierający dwuodwartny jon Co²⁺ [3,3'-Co(1,2-C₂B₉H₁₁)₂]²⁻ i grupy C-H o mniejszej kwasowości (0,118 au) w porównaniu do metalokarboranu zawierającego trójodwartny jon Co³⁺ (0,125 au) występuje w postaci konformeru *trans* [73].
- c) Rodzaj przeciwjonu kompensującego ładunek ujemny metalokarboranu. Jeśli przeciwjon słabo oddziałuje z metalokarboranem to konformacja metalokarboranu będzie głównie zależna od oddziaływań międzycząsteczkowych metalokarboran-metalokarboran (anion-anion). Jeśli przeciwjon silniej oddziałuje z metalokarboranem, bądź posiada lepszy akceptor wiązania wodorowego niż wiążące ugrupowanie B-H względem C-H to również będzie miało to wpływ na konformacje metalokarboranu [73].



Rysunek 9. Wzajemne położenie względem siebie atomów węgla ligandów dikarbolidowych w izomerach konformacyjnych metalokarbaboranów. Widok z boku (**A**), widok z góry (**B**) [73].

Metalokarbaborany są krystalicznymi związkami występującymi w postaci soli z wieloma kationami zarówno nieorganicznymi θ^-/M^{n+} jak i organicznymi $\theta^-/[LH]^+$ (M = kation metalu; L = np. kation trójmetyloamoniowy, Me_3NH^+) [74]. W układzie jednorozpuszczalnikowym, w którym L jest jednocześnie rozpuszczalnikiem oraz stanowi zasadę przeciwjonu $[LH]^+$ ze względu na podobieństwo L i $[LH]^+$ rozpuszczalność soli $\theta^-/[LH]^+$ w L jest bardzo wysoka. Przykładem może być rozpuszczalność metalokarbaboranów w takich układach, gdzie L = woda, alkohol, eter, keton, ester, dimetylosulfotlenek, amina, amid. W układzie dwurozpuszczalnikowym L/L' (L' jest silniejszą zasadą od L) ustala się równowaga, według której metalokarbaboran występuje głównie w postaci soli $\theta^-/[L'H]^+$. Rozpuszczalność soli $\theta^-/[L'H]^+$ w układzie L/L' zależy wtedy od stosunku ilościowego L do L' oraz ich wzajemnej mieszalności [74]. W przypadku wysokiej mieszalności L z L' sole $\theta^-/[L'H]^+$ są dobrze rozpuszczalne w układzie np. woda-etanol. W układzie L (nitrobenzen)/ L' (woda) rozpuszczalność kwasu $\theta^-/[H_3O]^+$ jest wypadkową hydrofilowości kationu oraz hydrofobowości anionu θ^- . Taka zależność pokazuje dlaczego rozpuszczalny w wodzie kwas $\theta^-/[H_3O]^+$ może ulec ekstrakcji do nitrobenzenu co ma praktyczne znaczenie [74]. Właściwości te w połączeniu z wysoką stabilnością termiczną i chemiczną metalokarbaboranów (w tym odporność na stężone kwasy i zasady) powodują, że metalokarbaborany można z powodzeniem wykorzystywać do ekstrakcji kationów z roztworów wodnych [68]. Dodatkowo, odporność na promieniowanie jonizujące

pozwoili na wykorzystanie metalokarboranów i ich pochodnych do ekstrakcji nuklidów promieniotwórczych z wodnych odpadów nuklearnych [74].

W zależności od przeciwjonu zmienia się rozpuszczalność w wodzie oraz rozpuszczalnikach organicznych soli metalokarboranowych. Rozpuszczalność soli [COSAN]⁻ w wodzie, w temperaturze pokojowej dla kationów Na⁺, Li⁺, H⁺, K⁺, Cs⁺, [NMe₄]⁺ wynosi kolejno: 1509, 1175, 846, 747, 1,5, 0,019 mM [75]. Rozpuszczalność soli [COSAN]⁻ w rozpuszczalnikach organicznych takich jak chloroform bądź benzen będzie znacznie większa dla soli trimetylododecyloamoniowych niż np. tetrabutylamoniowych. W wodzie (L) wiele soli $\theta^-/[L'H]^+$ jest słabo rozpuszczalna, dzięki czemu kwas $\theta^-/[H_3O]^+$ jest często stosowany jako substrat do wytrącania metalokarboranów z roztworów wodnych w postaci soli $\theta^-/[L'H]^+$. Dodatek roztworu na przykład chlorowodoru trietyloaminy do $\theta^-/[H_3O]^+$ spowoduje wytrącenie soli $\theta^-/[Et_3NH]^+$. Jest to jedna z wielu metod wymiany przeciwjonów dla metalokarboranów [74] co ma istotne znaczenie w badaniach biologicznych ich pochodnych.

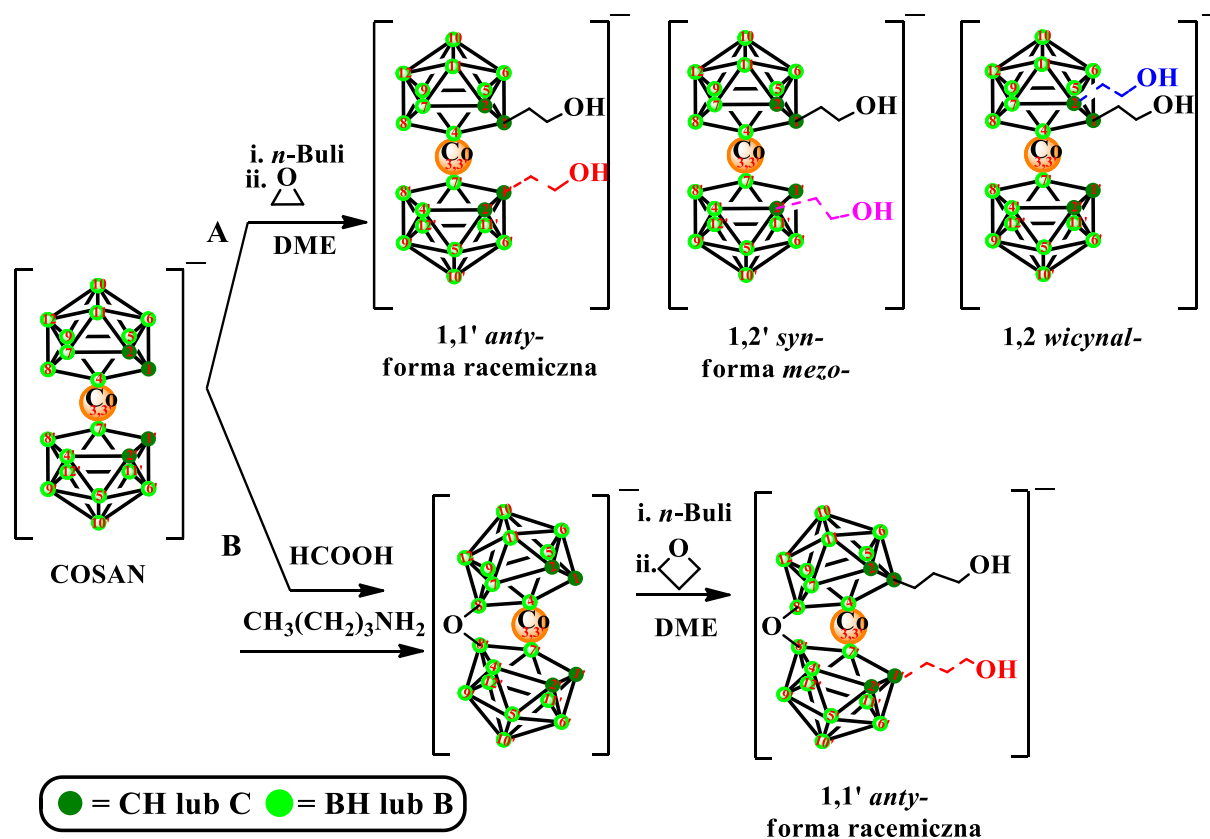
Dobór odpowiedniego przeciwjonu, ma ważne znaczenie dla chemika syntetyka zajmującego się chemią metalokarboranów. Sole metalokarboranów i ich pochodnych w zależności od przeciwjonu mogą wykazywać większe bądź mniejsze tendencje do tworzenia układów krystalicznych, których analiza krystalograficzna metodą dyfrakcji rentgenowskiej (X-ray) pozwala na określenie struktury otrzymanych pochodnych metalokarboranów. Ponadto, planując syntezę pochodnej metalokarboranu należy zastanowić się czy obecny w soli przeciwjon będzie reagował z odczynnikami, które chcemy użyć do reakcji. Przykładem może być synteza hydroksyalkilo pochodnych COSANU otrzymanych w reakcji litopochodnych COSANU z cyklicznymi eterami (tlenek etylenu, oksetan) [76]. W reakcji użyto sól trimetyloamoniową [COSAN]⁻[Me₃NH]⁺ oraz *n*-BuLi do aktywacji wiązania C-H metalokarboranu. W celu otrzymania monolitopochodnej metalokarboranu zastosowano dwukrotny równoważnik *n*-BuLi: jeden by związać proton kationu amoniowego [Me₃NH]⁺, a drugi do aktywacji COSANU. Alternatywnym podejściem jest wykorzystanie metalokarboranu w postaci soli cesowej [COSAN]⁻Cs⁺ dzięki czemu omija się etap związany z etapem usunięcia przeciwjonu [Me₃NH]⁺, a *n*-BuLi dodaje się wyłącznie w celu otrzymania litopochodnych metalokarboranu [76]. Podczas syntezy pochodnych metalokarboranów w reakcjach dochodzi do dynamicznych procesów wiązania się metalokarboranu z różnymi dodatnio naładowanymi przeciwjonami. Często odczynniki stosowane w reakcji jako zasady, mogące występować w formie uprotonowanej (trietyloamina, pirydyna) mogą wiązać się z metalokarboranem co w efekcie końcowym powoduje powstanie mieszanin soli metalokarboranowych z różnymi przeciwjonami.

1.6. Podstawienie przy atomach węgla lub boru w metalokarboranach na przykładzie bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)-*commo*-3,3'-kobaltanu (III) (13).

COSAN podobnie jak dikarba-*closo*-dodekaborany można modyfikować przyłączając podstawniki zarówno do atomów węgla jak i boru. Modyfikacje na atomach węgla można wprowadzać bezpośrednio w reakcjach COSANU stosując *n*-BuLi lub inną silną zasadę do aktywacji grup C-H klastra, a następnie dodając odpowiedni elektrofil [76], bądź też prowadząc syntezę *de novo*. W tym drugim przypadku otrzymuje się najpierw odpowiednio podstawione pochodne *orto*-karboranu 1,2-C₂B₁₀H₁₂, następnie przekształca je w monoanion, a potem w dianion [7,8-C₂B₉H₁₀]²⁻, aby w następnym etapie poddać reakcji z chlorkiem kobaltu (II) CoCl₂ w której ligandy karbolidowe łączą się wspólnym wierzchołkiem Co_{3,3'} tworząc metalokarboran [12].

Od kiedy sól cezowa bis(dikarbolido)kobaltanu (III) (COSAN) zaczęła być komercyjnie dostępna chemicy syntetycy zajmujący się chemią metalokarboranów zaczęli częściej przyłączać podstawniki do atomów węgla w wyniku bezpośrednich reakcji litopochodnych COSANU z różnymi elektrofilami [77]. Ze względu na obecność czterech grup C-H pochodzących od dwóch karboranylowych ligandów w reakcjach bezpośredniego przyłączania podstawników do atomów węgla COSANU tworzy się mieszanina, w której przeważają mono- oraz dwupodstawione produkty. Synteza monopodstawionych pochodnych COSANU jest jeszcze większym wyzwaniem niż synteza monopodstawionego 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu. W reakcjach przyłączania podstawników do atomów węgla COSANU mogą występować wszystkie opisane wcześniej dla 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu czynniki, które wpływają na reaktywność grup C-H klastra. COSAN jest kompleksem złożonym z dwóch karboranylowych ligandów, dlatego nawet zastosowanie odpowiednich odczynników i warunków reakcji sprzyjających monopodstawieniu każdego z ligandów powoduje i tak powstawanie dwupodstawionego COSANU. Zastosowanie wspomnianego wyżej eteru DME jako rozpuszczalnika utrudnia jednoczesne wprowadzenie dwóch podstawników do sąsiadujących ze sobą atomów węgla w każdym z dwóch karboranylowych ligandów jak opisano wcześniej dla *orto*-karboranu (**Schemat 5B**), ale hamuje to wyłącznie powstawanie produktów dwupodstawionych – *wicynalnych* (**Schemat 7**) oraz produktów trój- i czteropodstawionych. Nie hamuje natomiast powstawania produktów dwupodstawionych formy racemicznej oraz formy mezo (**Schemat 7A**). Tak samo jak w opisanej syntezie *de novo* podstawionych pochodnych COSANU poprzez wprowadzenie jonu kobaltu pomiędzy zmodyfikowane ligandy karboranylowe, dwupodstawione pochodne COSANU występują w

postaci mieszaniny formy racemicznej oraz formy *mezo*, przy czym forma racemiczna, w której podstawniki są od siebie najbardziej oddalone powstaje w największych ilościach [76, 77, 78]. Dla przypomnienia, forma racemiczna (racemat) produktów dwupostawienia na atomach węgla COSANU to produkty 1,1' *anty*- oraz 2,2' *anty*-, forma *mezo* to produkt 1,2' *syn*-. Forma wycynalna to forma w której podstawniki przyłączone są do sąsiadujących atomów węgla tego samego liganda karbolidowego 1,2 *wycynal*- (**Schemat 7A**). Zmiana rozpuszczalnika z DME na dietoksyetan (DEE) czego konsekwencją jest większa zdolność cząsteczek rozpuszczalnika do przesłaniania sąsiedniego atomu węgla COSANU w reakcjach podstawienia jeszcze bardziej zwiększa ilość formy racemicznej w mieszaninie reakcyjnej [76].



Schemat 7. Synteza hydroksyalkilo pochodnych COSANU w reakcjach litopochodnych COSANU z tlenkiem etylenu (**A**) [76]. Reakcja litopochodnej z mostkiem w postaci atomu tlenu, $8,8'\text{-O}<(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2\text{-}3,3'\text{-Co}>$ z oksetanem (**B**) [79, 80].

Reakcja oksetanu z litopochodą COSANU którego ligandy karboranylowe zostały połączone mostkiem w postaci atomu tlenu przyłączonego do atomów boru B_8 i $B_{8'}$ obu ligandów jest reakcją, w której również powstaje głównie forma racemiczna (**Schemat 7B**) [79, 80]. W tym przypadku wynika to z zahamowania rotacji ligandów wokół jonu kobaltu wymuszając przyjęcie konformacji *cis* przez kompleks, a tym samym powodując większe

przesłanianie zaktywowanych atomów węgla metalokarboranu przez cząsteczki rozpuszczalnika koordynujące kation litu Li^+ [79].

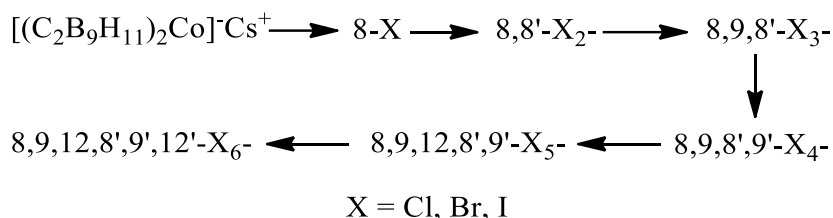
Reakcje przyłączania podstawników do atomów boru COSANU są znacznie lepiej rozpoznane niż reakcje przyłączania podstawników do atomów węgla. Przeważnie stosuje się bezpośrednie metody funkcjonalizacji takie jak np. reakcje halogenowania czy też hydroksylowania COSANU, które powodują zmiany w strukturze elektronowej ligandów karboranylowych analogiczne do zmian jakie zachodzą podczas stosowania tych metod w funkcjonalizacji *orto*-karobranu [12]. Podstawniki przyłączają się kolejno wraz z malejącą gęstością elektronową atomów boru ligandów karboranylowych (**Tabela 12**) [81, 82].

Tabela 12. Rozkład ładunku w COSANIE wyznaczony metodą NPA [82]

Atom	Ładunek [q]
Co	0,21
$\text{C}_{1/2}$	-0,52
$\text{B}_{4/7}$	-0,06
B_8	-0,23
$\text{B}_{5/11}$	-0,04
B_6	0,11
$\text{B}_{9/12}$	-0,19
B_{10}	-0,18

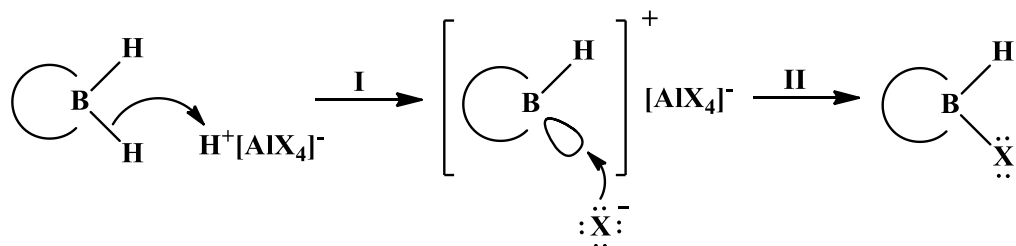
Pierwszy podstawnik przyłącza się do atomu boru o największej gęstości elektronowej, B_8 . Po wprowadzeniu pierwszego podstawnika, kolejnym atomem boru w COSANIE o największej gęstości elektronowej jest atom B_8 drugiego liganda karboranylowego. Wprowadzenie drugiego podstawnika jest reakcją wyraźnie wolniejszą co pokazuje, że efekt indukcyjny jaki wywołuje pierwszy podstawnik przyłączony do jednego karboranylowego liganda jest transmitowany przez jon kobaltu do drugiego liganda. Pozwala to na kontrole szybkości reakcji wprowadzania podstawników w reakcjach halogenowania COSANU. Stosując odpowiednie ilości molowe odczynnika halogenującego oraz odpowiednie warunki reakcji, halogenowanie COSANU prowadzące do mono- oraz dwupodstawionych pochodnych można przeprowadzić w sposób wysoce selektywny. Wprowadzenie kolejnych podstawników prowadzące do otrzymania tri-, tetra-, penta- i heksapodstawionych pochodnych powoduje powstawanie mieszanin tych związków. Kolejność wprowadzanych atomów halogenów do struktury COSANU przedstawia **Rysunek 10** [81]. Reakcje chlorowania można przeprowadzać stosując

gazowy chlor, podchloryn sodu, N-chlorosukcynoimid. Reakcje bromowania zachodzą przy użyciu bromu cząsteczkowego czy też N-bromosukcynoimidu. W reakcjach jodowania stosuje się jod cząsteczkowy oraz monochlorek jodu. W reakcjach COSANU z bis(tetrafluoroborano) 1-chlorometylo-4-fluoro-1,4-diazoniabicyklo[2.2.2]oktanem (F-TEDA) stosując jako rozpuszczalnik bezwodny aceton, powstaje 8,8'-difluoro pochodna [83].



Rysunek 10. Kolejność przyłączania podstawników do COSANU w reakcjach halogenowania [81].

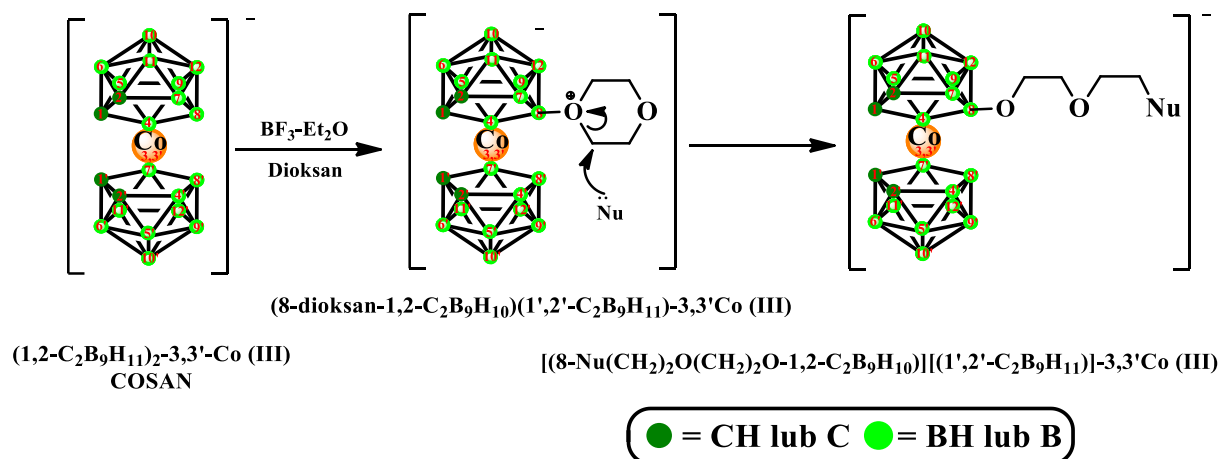
Reakcje podstawienia na atomach boru COSANU zachodzą według mechanizmu określanego jako substytucja nukleofilowa indukowana elektrofilem (EINS) (*ang. Electrophile Induced Nucleophilic Substitution*) [84] (**Rysunek 11**). Mechanizm obejmuje następujące etapy: 1) usunięcie anionu wodorkowego przyłączonego do atomu boru o największej gęstości elektronowej, 2) natychmiastowe wypełnienie powstałej luki przez najsilniejszy w środowisku nukleofil. Mechanizm ten został po raz pierwszy zbadany w reakcjach halogenowania 4,5-dikarba-*arachno*-nonaboranu 4,5-C₂B₇H₁₃ przy użyciu halogenowodorów w obecności katalizatorów takich jak AlX₃ (X = Cl, Br, I) [84].



Rysunek 11. Mechanizm substytucji nukleofilowej indukowanej elektrofilem (EINS) w reakcjach karboranów z halogenowodorami w obecności katalizatora AlX₃ (X = Cl, Br, I) [84].

Jedną z najbardziej powszechnych metod funkcjonalizacji metalokarboranów jest przyłączanie podstawników w reakcjach nukleofilowego otwarcia pierścienia dioksanu adduktu COSAN-dioksan (**Schemat 8**) [68, 83, 85]. Addukt można łatwo otrzymać w reakcji COSANU z dioksanem w obecności eteratu dietylowego trifluorku boru jako kwasu Lewisa [86]. Synteza adduktu zachodzi również na drodze mechanizmu EINS. Reakcja zachodzi

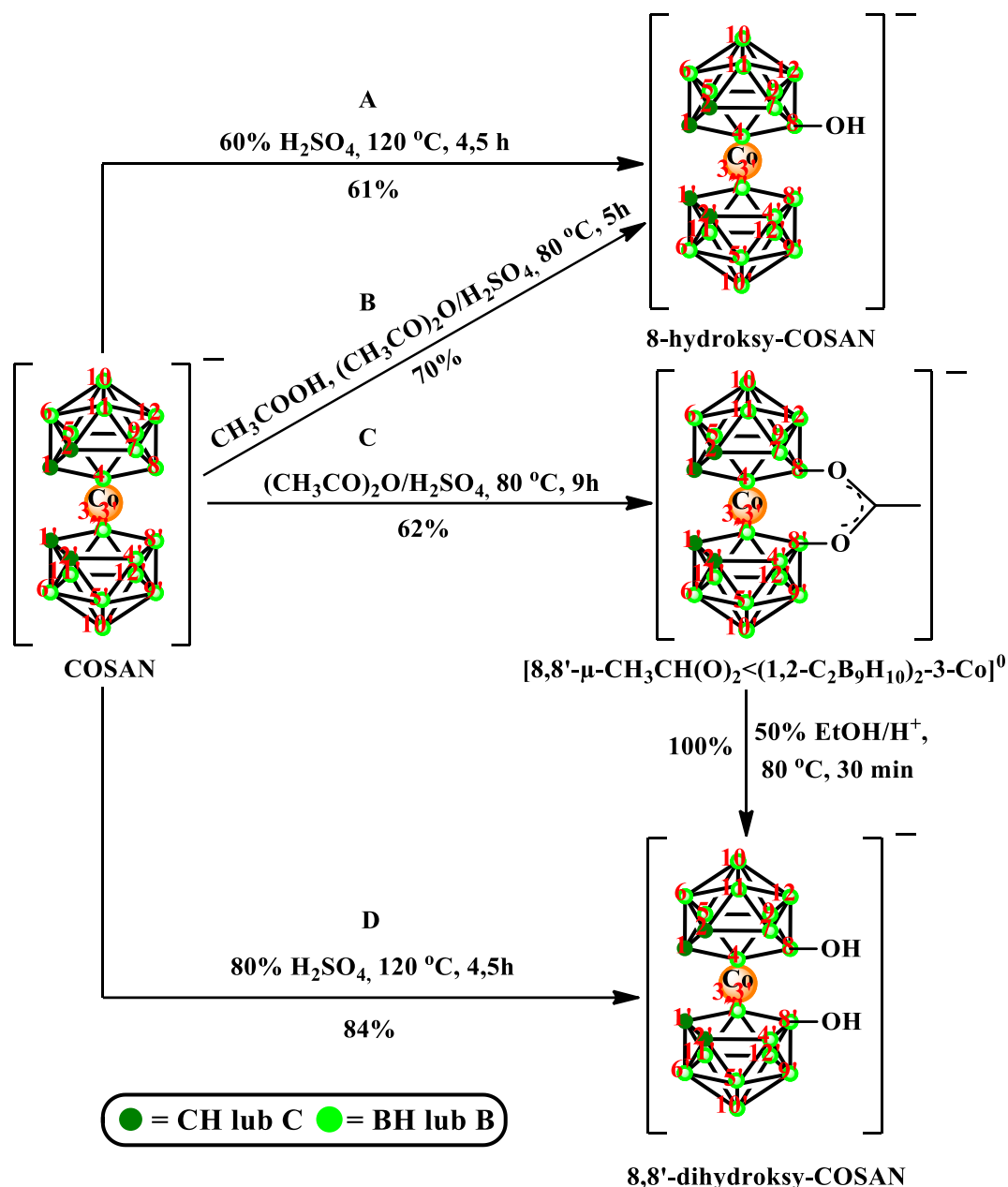
z wysoką wydajnością, a addukt, który występuje w postaci zwitterjonu łatwo oddzielić od nieprzereagowanego COSANU za pomocą chromatografii kolumnowej [86]. Addukt ulega reakcji otwarcia pierścienia dioksanu w wyniku ataku różnych nukleofilów [83]. Przykładem zastosowania tej metody funkcjonalizacji COSANU może być synteza nukleozydów modyfikowanych klasterami boru [87]



Schemat 8. Synteza adduktu COSANU i dioksanu oraz reakcja otwarcia pierścienia dioksanu w addukcie w wyniku ataku nukleofila [83].

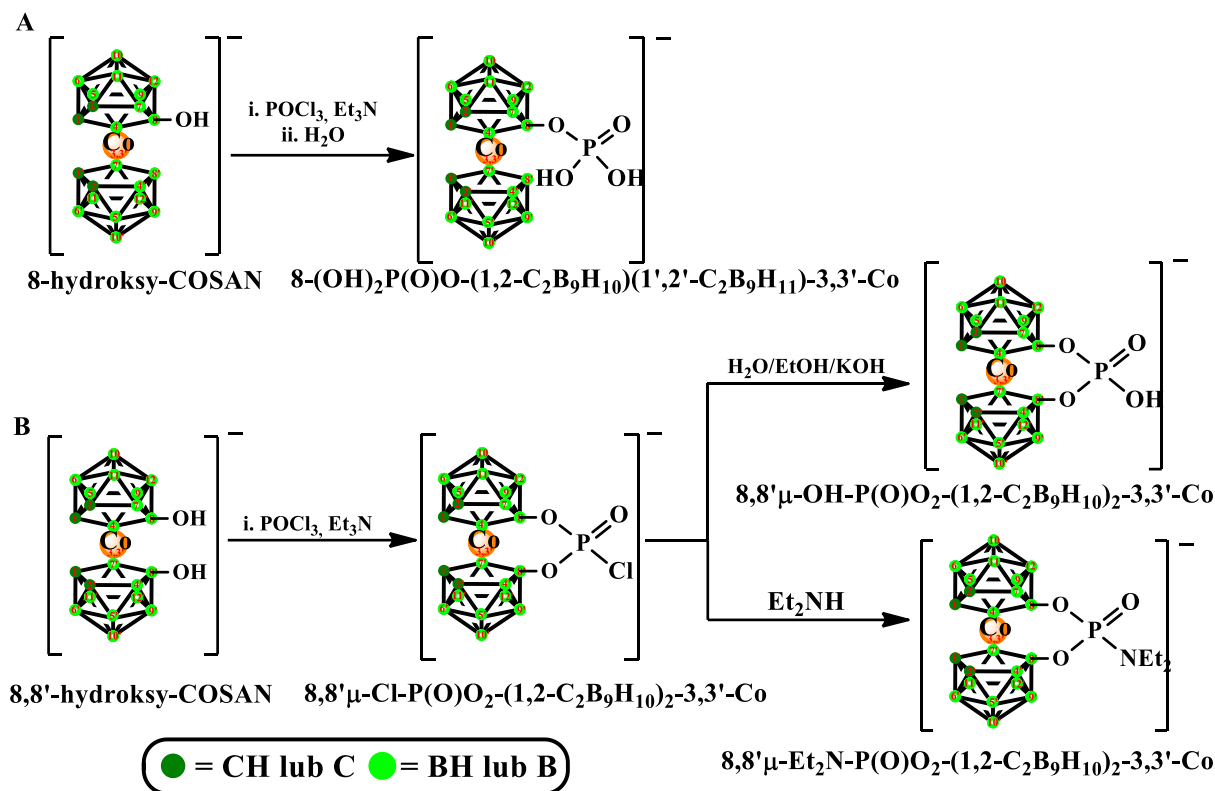
Zgodnie z mechanizmem EINS zachodzą także reakcje przyłączania grup hydroksylowych do atomów boru [88]. Grupy hydroksylowe można przyłączyć poprzez redukcyjne acetylowanie w środowisku kwaśnym bądź w reakcjach bezpośredniego hydroksylowania COSANU stosując wodne roztwory kwasu siarkowego (VI). W zależności od zastosowanych warunków reakcji grupy hydroksylowe przyłączają się do atomów B_8 bądź B_8 i B_8' tworząc odpowiednio mono- bądź dwupodstawione pochodne COSANU (**Schemat 9**) [88].

8-Hydroksy-, oraz 8,8'-dihydroksy-COSAN można przekształcić w reakcji z trichlorkiem fosforylu w obecności trietyloaminy w estry pochodnych hydroksylowych COSANU i kwasu chlorofosforowego (**Schemat 10**) [89]. W przypadku 8,8'-dihydroksy-COSANU otrzymuje się pochodne, w których reszta kwasu chlorofosforowego pełni funkcję mostka łączącego oba ligandy karboranylowe. Utworzone monopodstawione oraz dwupodstawione pochodne można poprzez hydrolizę przekształcić w estry kwasu fosforowego.



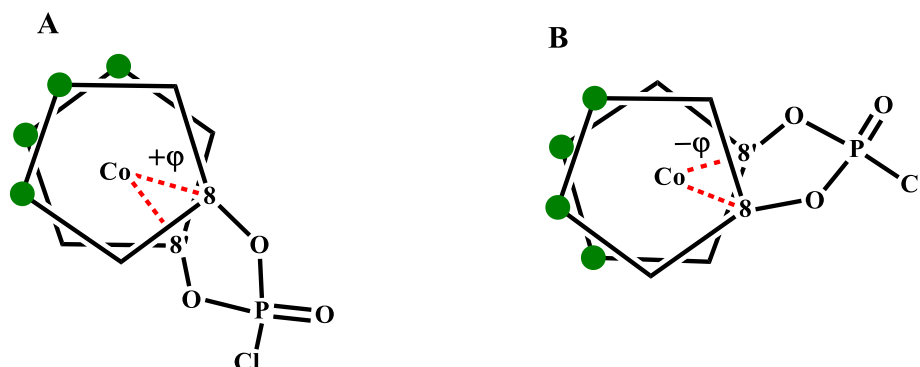
Schemat 9. Synteza 8-hydroksy- i 8,8'-dihydroksy-COSANU. Bezpośrednie hydroksylowanie przy użyciu 60% kwasu siarkowego (VI) (A), redukcyjne acetylowanie stosując mieszaninę kwasu octowego oraz bezwodnika kwasu octowego w obecności kwasu siarkowego (VI) (B), synteza zwitterjonu w reakcji COSAN z bezwodnikiem octowym w warunkach kwasowych (C), bezpośrednie hydroksylowanie przy użyciu 80% kwasu siarkowego (D) [88].

Ester kwasu chlorofosforowego i 8,8'-dihydroksy-COSANU można wykorzystać by przyłączyć różne podstawniki organiczne do metalokarboranu o zablokowanej rotacji ligandów wokół jonu kobaltu. Przykładem może być reakcja z dietyloaminą, w wyniku której otrzymuje się pochodną amidofosforanową. (Schemat 10B) [89].



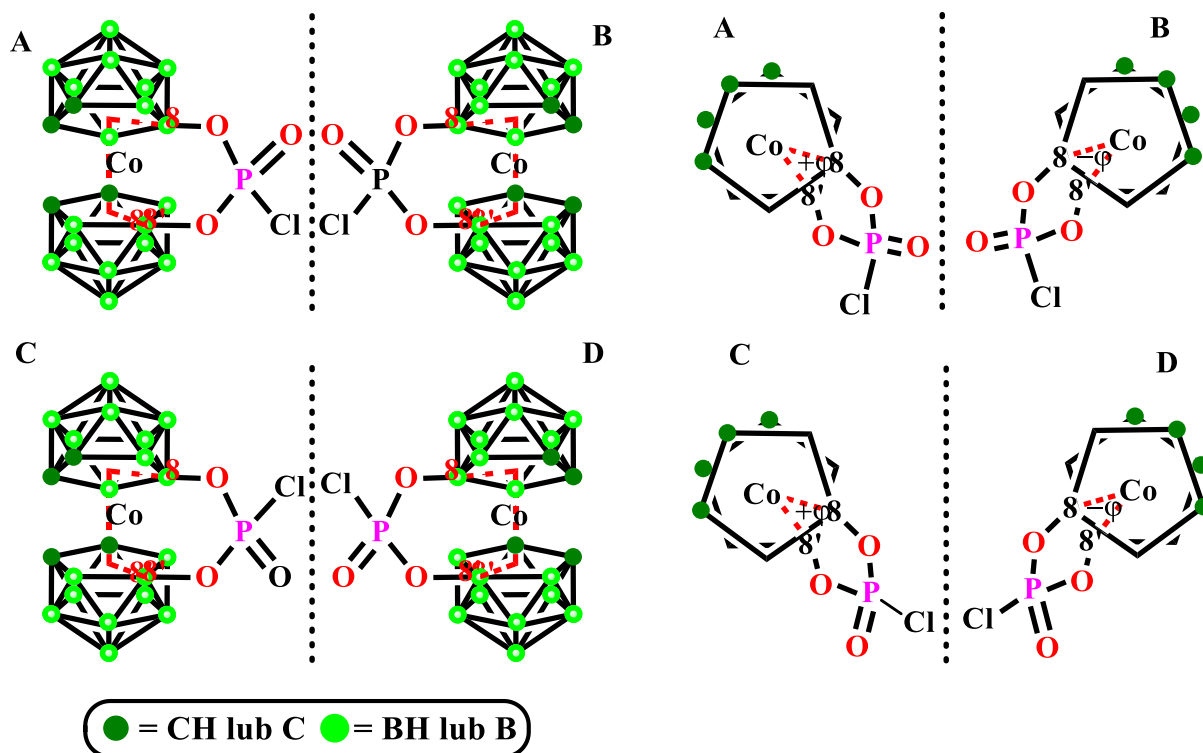
Schemat 10. Synteza estru 8-hydroksy-COSANU i kwasu fosforowego (**A**) oraz synteza estrów 8,8'-dihydroksy-COSANU i kwasu fosforowego i jego pochodnych (**B**) [89].

Obecność mostków fosforanowych lub ich pochodnych (chlorofosforanowych i amidofosforanowych) w 8,8'-dwupodstawionych pochodnych COSANU wymusza przyjęcie przez metalokarboran określonej konformacji, czego konsekwencją jest powstanie asymetrycznych, chiralnych struktur, w których wzajemne położenie ligandów można opisać kątem torsyjnym φ (**Rysunek 12**) [89].



Rysunek 12. Widok z góry pary enancjomerów mostkowych pochodnych cyklicznych estrów fosforowych 8,8'-dihydroksy-COSANU przedstawionych obok siebie. Źródłem chiralności jest wzajemne położenie ligandów dikarbolidowych opisane kątem torsyjnym φ . Dolny ligand obrócony o kąt $+\varphi$ względem górnego liganda zgodnie z ruchem wskazówek zegara (**A**). Dolny

ligand obrócony o kąt $-\phi$ względem górnego liganda przeciwnie do ruchu wskazówek zegara (**B**) [89].



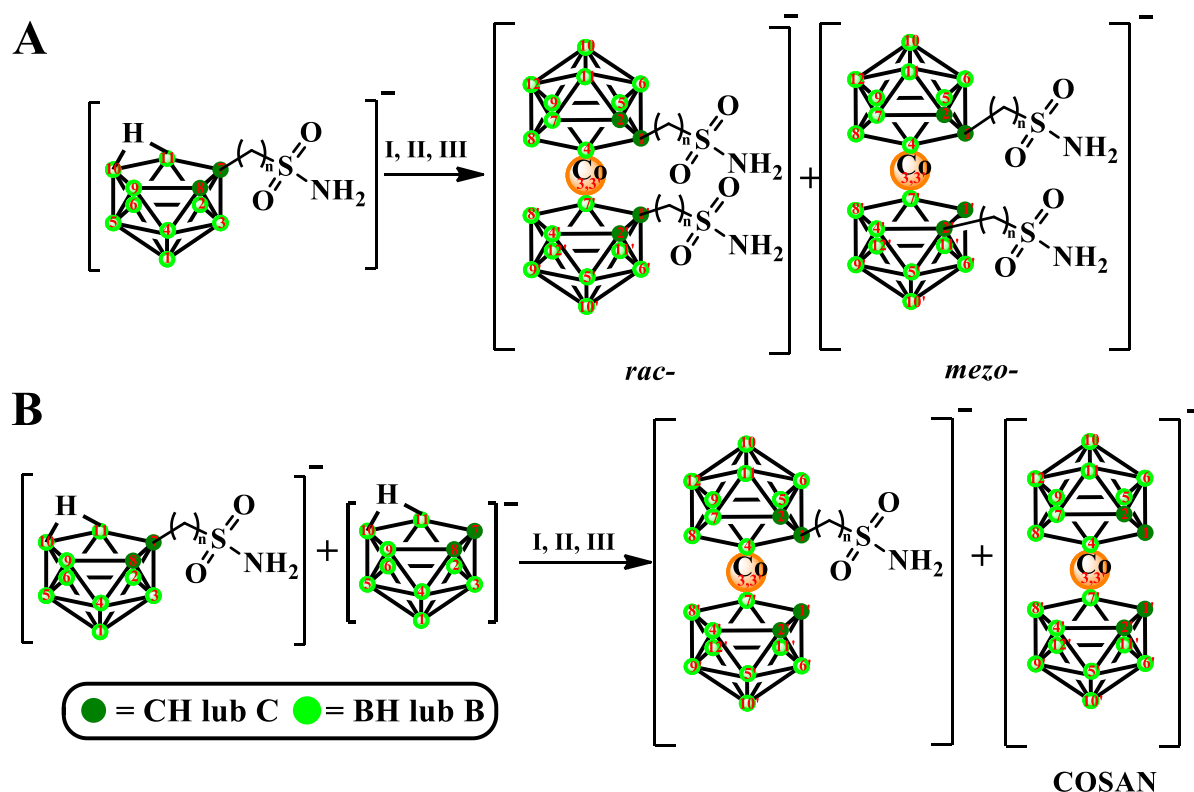
Rysunek 13. Pary enancjomerów mostkowych pochodnych cyklicznych estrów fosforowych 8,8'-dihydroksy-COSANU przedstawione jako wzajemne odbicia lustrzane **A**, **B** i **C**, **D** oraz enancjomerów wynikających z chiralności atomu fosforu **A**, **C** i **B**, **D**. Po lewej stronie widok z boku, po prawej widok z góry.

Co więcej nachylenie wiązania P=O w kierunku jednego liganda oraz wiązania P-X (X = Cl, OH, Et₂N) w kierunku drugiego może generować dodatkową parę enancjomerów wynikającą z różnic położenia wiązań P=O i P-X względem ligandów karboranowych i w rezultacie ich nierównocенności oraz wynikającej z tego chiralności atomu fosforu. (**Rysunek 13**) [89].

Pochodne 8,8'-dihydroksy-COSANU, którego ligandy związano resztą kwasu chlorosforowego i amidofosforowego badano metodami rentgenografii strukturalnej oraz elektroforezy kapilarnej, które potwierdziły występowanie tych związków w postaci par enancjomerów (**Rysunek 13**) [89]. Obecnie enancjomeryczne metalokarborany utworzone poprzez wprowadzenie mostka łączącego atomy boru B₈ i B₈' jak i inne asymetryczne klaster boru można wyodrębnić przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC stosując chiralne kolumny wypełnione złożem na bazie β-cyklodekstryny [90, 91, 92, 93].

Przykładem syntezy *de novo* podstawionych metalokarboranów na przykładzie pochodnych COSANU, poprzez kompleksowanie pochodnych 7,8-dikarba-*nido*-undekaboranu jonem kobaltu może być synteza pochodnych alkilosulfonamidowych będących wysoce

selektywnymi inhibitrami anhidrazy węglanowej [78] (**Schemat 11**). Koordynacja 7-sulfonamidoalkilo-7,8-dicarpa-*nido*-undekaboranów jonem kobaltu powoduje powstawanie głównie dwupodstawionych pochodnych COSANU występujących w postaci mieszaniny formy racemicznej, w której podstawniki alkilosulfonamidowe przyłączone zostały do pozycji C₁ i C_{1'} metalokarboranu oraz formy *mezo*, gdzie podstawniki występują w pozycjach C₁ i C₂ kompleksu (**Schemat 11A**). Metoda ta została również zastosowana w syntezie monopodstawionych pochodnych COSANU stosując mieszaninę modyfikowanego i niemodyfikowanego 7,8-dicarpa-*nido*-undekaboranu. Niestety, pomimo zastosowania alkilosulfonoamidowej pochodnej oraz 7,8-dicarpa-*nido*-undekaboranu w stosunku 2:1 reakcja nie jest selektywna i otrzymuje się mieszaninę monopodstawionych pochodnych COSANU z niemodyfikowanym metalokarboranem. Powstaje także mała ilość dwupodstawionej pochodnej COSANU [78].



Schemat 11. Synteza mono- i dwupodstawionych alkilosulfonoamidowych pochodnych COSANU. Synteza dwupodstawionej pochodnej z wykorzystaniem 7-sulfonamidoalkilo-7,8-dicarpa-*nido*-undekaboranu (**A**) oraz monopodstawionej pochodnej z wykorzystaniem modyfikowanego i niemodyfikowanego 7,8-dicarpa-*nido*-undekaboranu (**B**) [78]. i. NaH, DME, ii. CoCl₂, iii. Chromatografia RP-HPLC stosując jako eluent wodny roztwór etanolu albo metanolu.

Podsumowując, można stwierdzić że metalokarborany, podobnie jak omówione wyżej karborany charakteryzując się szeregiem właściwości niedostępnych dla związków

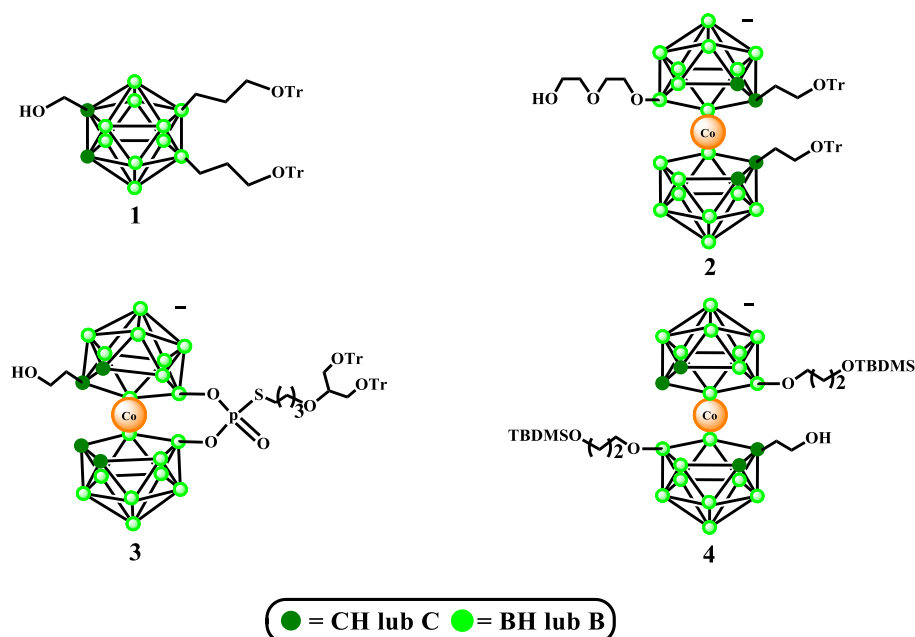
organicznych oferują wiele unikalnych zastosowań zarówno w dziedzinie chemii materiałów jak i w projektowaniu nowych związków biologicznie aktywnych. Kluczem do tych zastosowań, zarówno w przypadku karboranów jak i metalokarboranów, jest racjonalnie zaplanowana synteza ich pochodnych. Szczególnym wyzwaniem jest oligofunkcjonalizacja rozumiana jako przyłączenie do szkieletu klastra 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.

Większość chemików ogranicza się do syntezy mono- lub dwupodstawionych pochodnych metalokarboranów. W tego typu połączeniach problemy związane ze stereochemią są słabiej zaznaczone, dopiero przyłączanie do atomów boru i węgla większej liczby podstawników, jak w przypadku badanej przeze mnie oligofunkcjonalizacji uwidacznia się skomplikowane zagadnienia stereochemii metalokarboranów w pełniejszym świetle. Wynika to z powstawania mniej lub bardziej skomplikowanych mieszanin diastereomerów w procesie syntezy. Korzystanie z takich mieszanin może nie stanowić przeszkody w wielu zastosowaniach. Nie mniej, korzystanie z pochodnych metalokarboranów w postaci w miarę możliwości diastereomerycznie czystej wydaje się uzasadnione. Przykładem może być opisane przez nas w przygotowywanej do druku pracy dotyczącej wykorzystania oligofunkcjonalizowanego COSANU jako platformy dla antysensowych DNA-oligonukleotydów i konstrukcji biologicznie aktywnych nanocząsteczek [101]. Wyniki tych badań opisane są w końcowej części rozdziału Badania Własne niniejszej pracy.

2. OMÓWIENIE BADAŃ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ PRACY DOKTORSKIEJ.

W ramach pracy doktorskiej realizowanej w Pracowni Chemii Medycznej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem Profesora Zbigniewa Leśnikowskiego prowadziłem badania mające na celu opracowanie i optymalizację metod oligofunkcjonalizacji 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (*orto*-karboranu, C₂B₁₀H₁₂) (**6**) [9] oraz opracowanie metod oligofunkcjonalizacji metalokarboranów na przykładzie metalokarboranu zawierającego kobalt, bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)-*commo*-3,3'-kobaltanu (III) (COSAN) (**13**) [94]. Owocem tych prac było poszerzenie wiedzy w zakresie mało dotychczas rozpoznanej chemii oligofunkcjonalizacji klastrów boru i opracowanie szeregu użytecznych metod syntezy tych połączeń. Otrzymane oligofunkcjonalizowane klastery boru zostały następnie wykorzystane do syntezy kompozytów klastrów boru i antysensowych DNA-oligonukleotydów stanowiących bloki budulcowe nowego typu nanocząstek, nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych [9, 95, 101]. Przyłączanie DNA-oligomerów do klastrów boru zrealizowane zostało w ramach 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). W ramach projektu Symfonia 3 kierowanego przez Profesora Leśnikowskiego otrzymałem cztery nowe typy oligofunkcjonalizowanych klastrów boru **1**, **2**, **3** i **4** (**Rysunek 14**) z których dwa **1** i **2** zostały wykorzystane dotychczas do otrzymania generacji II (ze związku **1**) [9] i III (ze związku **2**) [101] nanocząstek (**Tabela 13**) nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych stanowiąc istotne rozwinięcie wcześniejszych badań prowadzonych w naszej Pracowni, zakończonych opracowaniem metody otrzymywania nanocząstek I generacji [95].

Pierwsza generacja nanocząstek została skonstruowana na bazie *orto*-karboranu, jako jednostki centralnej i posiada zdolność wyciszania ekspresji receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) [95], druga generacja powstała również na bazie *orto*-karboranu (**6**), jednak funkcjonalizowanego w inny sposób niż w pierwszym przypadku i posiada zdolność równoczesnego wyciszania dwóch onkogenów, EGFR i protoonkogenu komórkowego (c-MYC) [9]. Trzecia generacja posiada, jak w przypadku pierwszej generacji zdolność wyciszania jednego genu, EGFR, jednak zbudowana została na bazie metalokarboranu zawierającego kobalt, COSANU, jako jednostki centralnej.

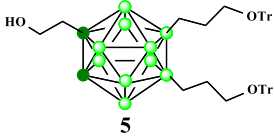
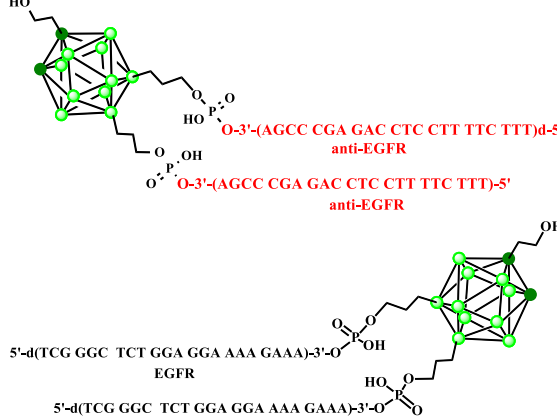
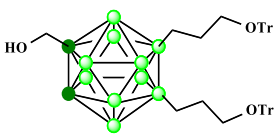
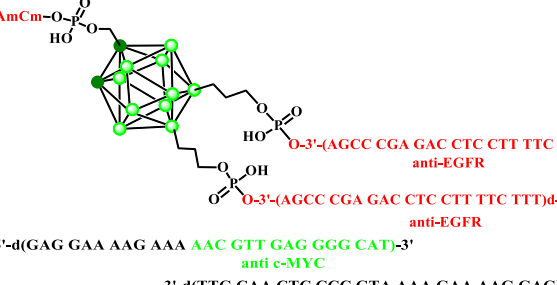
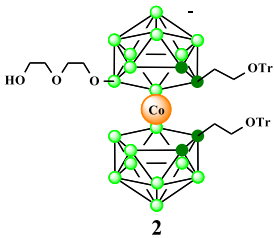
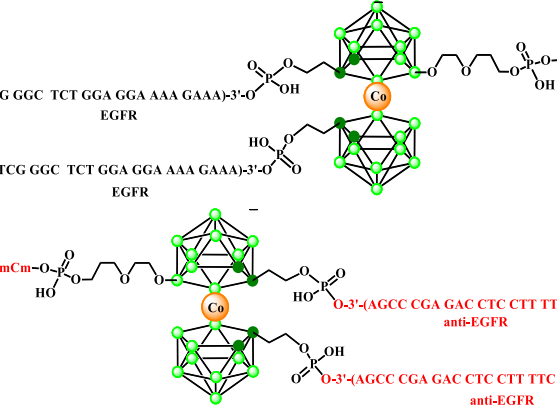


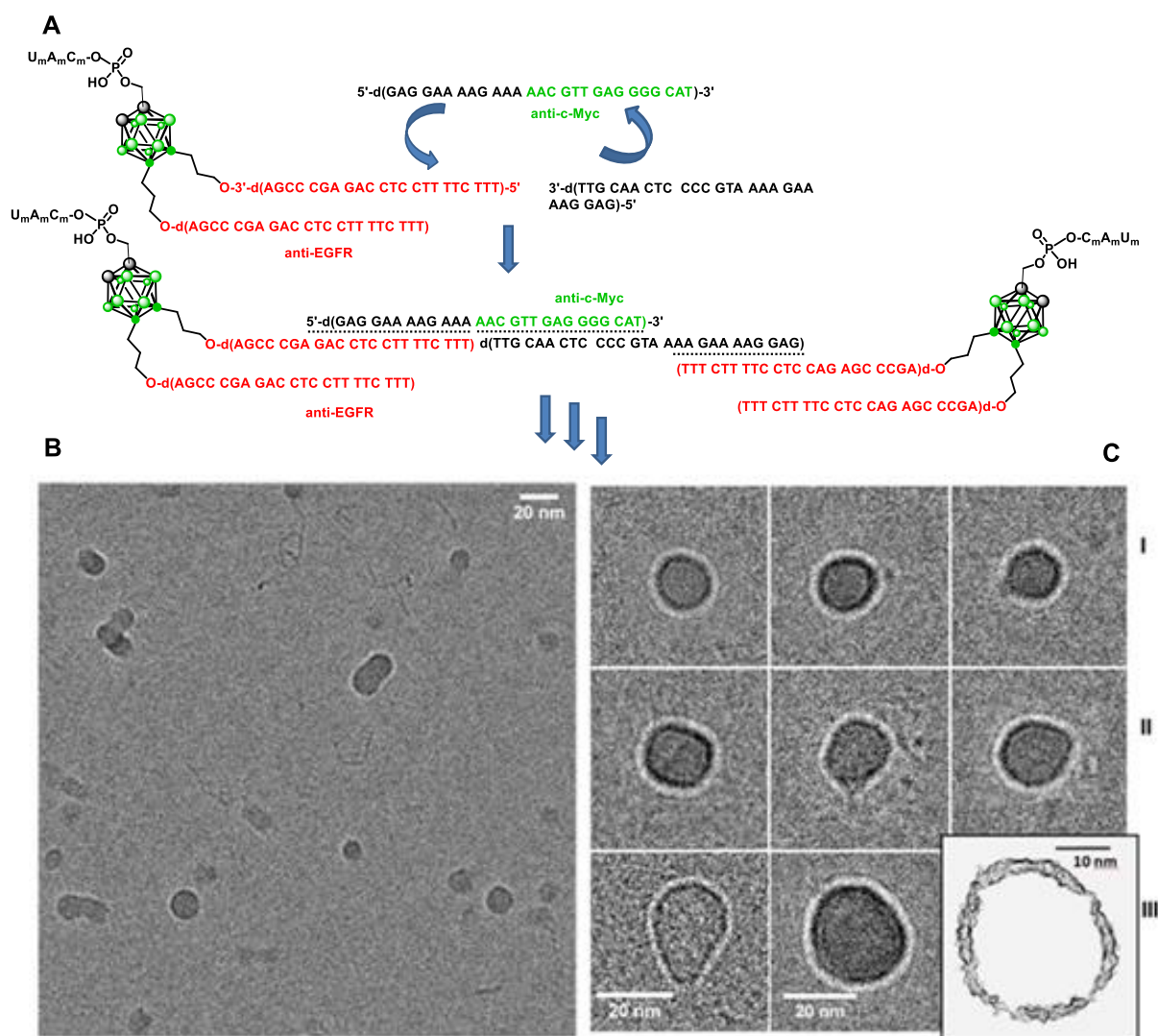
Rysunek 14. Oligofunkcjonalizowane klastery boru zaprojektowane i otrzymane jako platformy dla DNA-oligonukleotydów, bloków budulcowych nanocząstek. Wykorzystane dotychczas do syntezy nanocząstek, kompozytów klasterów boru i DNA-oligonukleotydów to związki: **1** (II generacja) oraz **2** (III generacja).

Proces otrzymywania funkcjonalnych nanocząstek, kompozytów DNA i klastera boru niezależnie od generacji można podzielić na 4 etapy:

- 1) Funkcjonalizacja klasterów boru jako platform dla DNA-oligomerów, np. takich jak antysensowne oligonukleotydy
- 2) Synteza bloków budulcowych nanocząstek, kompozytów klasterów boru i antysensownych DNA-oligonukleotydów poprzez przyłączenie DNA-oligomeru do funkcjonalizowanego klastera boru
- 3) Konstrukcja nanocząstek na drodze składania bloków budulcowych łączących się ze sobą dzięki komplementarności przyłączonych DNA-oligomerów zgodnie z zasadą powinowactwa zasad nukleinowych Watsona-Cricka
- 4) Badania właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej uzyskanych nanocząstek

Tabela 13. Oligofunkcjonalizowane klasterki boru i otrzymane z ich wykorzystaniem bloki budulcowe nanocząstek I, II i III generacji.

Oligofunkcjonalizowane klasterki boru	Bloki budulcowe nanocząstek	Generacja nanocząstek
 <p>5</p>	 <p>O-3'-(AGCC CGA GAC CTC CTT TTC TTT)d-5' anti-EGFR</p> <p>O-3'-(AGCC CGA GAC CTC CTT TTC TTT)-5' anti-EGFR</p> <p>5'-d(TCG GGC TCT GGA GGA AAA GAAA)-3'-O EGFR</p> <p>5'-d(TCG GGC TCT GGA GGA AAA GAAA)-3'-O EGFR</p>	I
 <p>1</p>	 <p>3'-UmAmCm-O-P(=O)(OH)-O-3'-(AGCC CGA GAC CTC CTT TTC TTT)d-5' anti-EGFR</p> <p>O-3'-(AGCC CGA GAC CTC CTT TTC TTT)d-5' anti-EGFR</p> <p>5'-d(GAG GAA AAG AAA AAC GTT GAG GGG CAT)-3' anti c-MYC</p> <p>3'-d(TTG CAA CTC CCC GTA AAA GAA AAG GAG)-5'</p>	II
 <p>2</p>	 <p>5'-d(TCG GGC TCT GGA GGA AAA GAAA)-3'-O EGFR</p> <p>5'-d(TCG GGC TCT GGA GGA AAA GAAA)-3'-O EGFR</p> <p>3'-UmAmCm-O-P(=O)(OH)-O-3'-(AGCC CGA GAC CTC CTT TTC TTT)d-5' anti-EGFR</p> <p>O-3'-(AGCC CGA GAC CTC CTT TTC TTT)d-5' anti-EGFR</p>	III



Rysunek 15. Schematyczne przedstawienie tworzenia się nanocząstek drugiej generacji (A), przedstawionych na zdjęciach z kriomikroskopii elektronicznej (cryo-TEM) (B i C). Nanocząstki powstają w wyniku tworzenia struktur dwuniciowych DNA między blokami budulcowymi, kompozytami klasterów boru i antysensownych DNA-oligonukleotydów i dwuniciowymi łącznikami utworzonymi z DNA-oligonukleotydów [9].

Moim zadaniem w ramach badań opisanych w niniejszej pracy doktorskiej było stworzenie podstaw chemicznych umożliwiających otrzymywanie, zaprojektowanych jako jeden z celów projektu Symfonia 3, nanocząstek, nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych. Cele te były również podstawą Indywidualnego Planu Badawczego w Szkole Doktorskiej BioMedChem. Zadanie to zostało zrealizowane w wyniku wieloletnich badań i umożliwiło opracowanie użytecznych w praktyce metod oligofunkcjonalizacji zarówno *orto*-karboranu (**6**) jak i jego kompleksu z metalem, metalokarboranu zawierającego kobalt (**13**).

Należy podkreślić, że 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) dzięki takim właściwościom jak:

- a) wysoka stabilność chemiczna klasterów boru, zarówno karboranów jak i metalokarboranów, a jednocześnie podatność na modyfikacje, w tym oligofunkcjonalizację
- b) możliwość funkcjonalizacji w trzech wymiarach, dzięki której przyłączając podstawniki w różnych pozycjach tego samego klastera karboranylowego, lub też wykorzystując różne izomery, *orto*-, *meta*- lub *para*- karboranów uzyskuje się dostęp do wielu możliwych aranżacji przestrzennych przyłączanych ligandów
- c) wysoka lipofilowość klasterów boru, co jest korzystne dla zwiększenia transportu przez błony komórkowe w przypadku zastosowań biologicznych
- d) w przypadku wykorzystania metalokarboranów jako jednostki centralnej do przyłączania DNA-oligomerów uzyskuje się nie tylko platformę o innej topologii niż w przypadku karboranów, ale także możliwość wprowadzania do nanocząstek właściwości związanych z właściwościami koordynowanego metalu, np. aktywności redoks, co może być pożądane w przypadku niektórych zastosowań

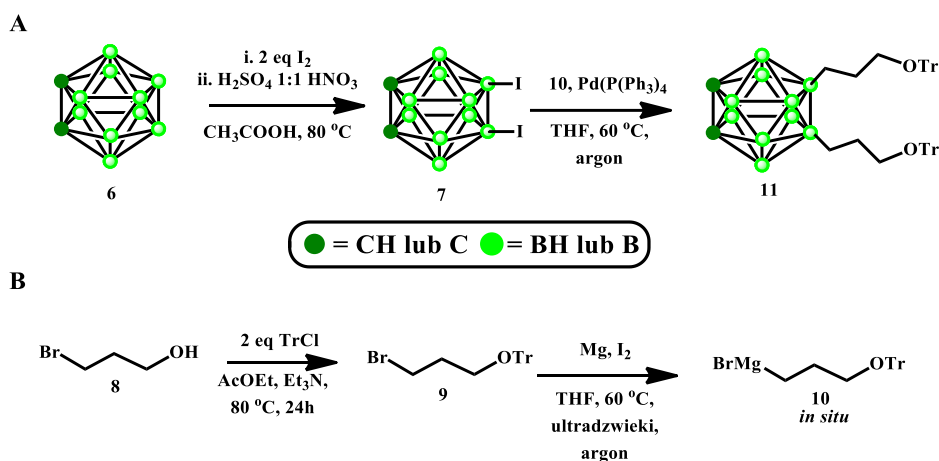
Prowadzone przez nas badania opisane w pracy doktorskiej i opublikowane dotychczas wyniki stanowią zaledwie początek tego fascynującego obszaru chemii [9, 94].

2.1. Oligofunkcjonalizacja 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (C₂B₁₀H₁₂) (6). Opracowanie metody syntezy syntonów do otrzymywania kompozytów DNA i klasterów boru jako bloków budulcowych nanocząstek drugiej generacji.

2.1.1. Funkcjonalizacja 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (6) na atomach boru B₉ i B₁₂ klastera. Synteza 9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (11).

W pierwszym etapie realizacji projektu przedstawionego w Indywidualnym Planie Badawczym była oligofunkcjonalizacja *orto*-karboranu (6). Celem zadania była synteza odpowiednio podstawionej karboranowej pochodnej umożliwiającej przyłączenie do klastera boru antysensowych DNA-oligonukleotydów i wykorzystanie otrzymanych w ten sposób bloków budulcowych do otrzymywania funkcjonalnych nanocząstek drugiej generacji (Tabela 13 i Rysunek 15) [9]. W celu otrzymania oligofunkcjonalizowanego *orto*-karboranu 1 zdecydowałem się na modyfikację metody stosowanej do otrzymywania karboranowej pochodnej 5 (Tabela 13) wykorzystanej do otrzymania pierwszej generacji nanokonstruktów

opracowanych w Pracowni Chemii Medycznej wcześniej [95, 96]. Zachowałem podstawnik 3-O-trytyloksypropylowy w pozycji B₉ i B₁₂ klastera optymalizując jednak metodę jego przyłączania do niepodstawionego *orto*-karboranu, natomiast na podstawie przeprowadzonych badań funkcjonalizacji *orto*-karboranu na atomach węgla grup C-H, podstawionego wcześniej na atomach boru B₉ i B₁₂ zmieniłem podstawnik hydroksyalkilowy przyłączony do atomu węgla C₁ lub C₂. Wykorzystując dane literaturowe na temat wpływu podstawników na reaktywność klasterów boru opisanych we wstępie literaturowym niniejszej pracy, znanych metod przyłączania podstawników hydroksyalkilowych do niepodstawionego *orto*-karboranu, oraz własne doświadczenia wybrałem podstawnik hydroksymetylowy otrzymując 1-hydroksymetylo-9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboran (**1**) (**Schemat 13**) jako platformę do przyłączania w następnych etapach DNA-oligonukleotydów. Zsyntezowana przeze mnie pochodna spełnia wymagane właściwości chemiczne i kryteria strukturalne takiej platformy i dzięki temu została z powodzeniem wykorzystana do otrzymania kompozytów klasterów boru i DNA-oligonukleotydów II generacji [9].



Schemat 12. Synteza 9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (**11**) (**A**) oraz odczynnika Grignarda, pochodnej 3-trytyloksy-1-bromopropanu (**10**) (**B**).

Badania rozpocząłem od otrzymania związków 9,12-dijodo-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (**7**) oraz 3-O-trytyloksy-1-bromopropanu (**9**) opisanych w literaturze [97, 98], wyjściowych komponentów do syntezy związku **11** (**Schemat 12**). Pierwszym etapem było przyłączenie do atomów boru B₉ i B₁₂ *orto*-karboranu atomów jodu. 9,12-Dijodo-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboran (**7**) otrzymałem w reakcji *orto*-karboranu (**6**) z jodem (I₂), w lodowatym kwasie octowym dodając mieszaninę stężonych kwasów siarkowego (VI) (H₂SO₄) oraz azotowego (V) (HNO₃) w temperaturze 80 °C [97]. Szerzej problemy związane z selektywnością podstawienia na atomach boru, w tym reakcją jodowania *orto*-karboranu

i tendencją do tworzenia się pochodnych wielopodstawionych opisane są w części literaturowej.

Reakcje blokowania grupy hydroksylowej dostępnego komercyjnie 3-bromopropan-1-olu (**8**) grupą trytylową przeprowadziłem jak opisano w literaturze [98]. Nieco szerszego omówienia wymaga kwestia zastosowania grupy trytylowej jako grupy ochronnej funkcji hydroksylowej związku **9** i w konsekwencji związku **11**. Ochronna grupa trytylowa usuwana jest w procesie przyłączania DNA-oligomerów do oligofunkcjonalizowanych klastrów boru w procesie automatycznej syntezy DNA na fazie stałej metodą amidofosforynową, w warunkach kwasowych [99]. W automatycznej syntezie oligonukleotydów jako grupy ochronnej grup hydroksylowych stosuje się standardowo znacznie bardziej kwasolabilną grupę dimetoksytrytylową (DMTr). Okazało się jednak, że grupa DMTr przyłączona do pochodnych klastra boru jest niestabilna ulegając usunięciu ze względu na właściwości klastrów boru jako kwasów Lewisa. Zastąpienie grupy DMTr grupą Tr rozwiązuje ten problem, równocześnie, jak się okazało, nie wymagając zmiany warunków i protokołu detrytylowania w procesie chemicznej syntezy oligonukleotydów.

Kolejnym etapem syntezy było przyłączenie podstawników trytyloksyalkilowych do atomów boru B₉ i B₁₂ poprzez utworzenie wiązania bor-węgiel w reakcji sprzęgania Kumady 9,12-dijodo-1,2-dikarba-*closo*-dodekarboranu (**7**) z odczynnikiem Grignarda, bromkiem 3-O-(trytyloksy)propylomagnezowym (**10**) [95]. Odczynnik Grignarda **10** został przygotowany *in situ* w reakcji związku **9** z magnezem stosując jako rozpuszczalnik bezwodny, nasycony argonem tetrahydrofuran (THF). Mimo iż reakcja Grignarda stosowana jest w chemii organicznej od prawie 150 lat, synteza odczynnika Grignarda nie zawsze jest łatwa, szczególnie w przypadku syntez prowadzonych na małą skalę i w dużym stopniu zależy od jakości magnezu, stosowanych rozpuszczalników i zachowania bezwzględnie bezwodnych warunków reakcji dlatego też wszystkie procedury przeprowadzałem w atmosferze argonu. Reakcję syntezy związku Grignarda **10** prowadziłem przez 4 h od momentu uzyskania ciemnowiśniowego koloru mieszaniny reakcyjnej (**Zdjęcie 1**), ta organoleptyczna cecha gwarantowała zazwyczaj powodzenie następnego etapu syntezy z udziałem pochodnej klastra boru **7**.

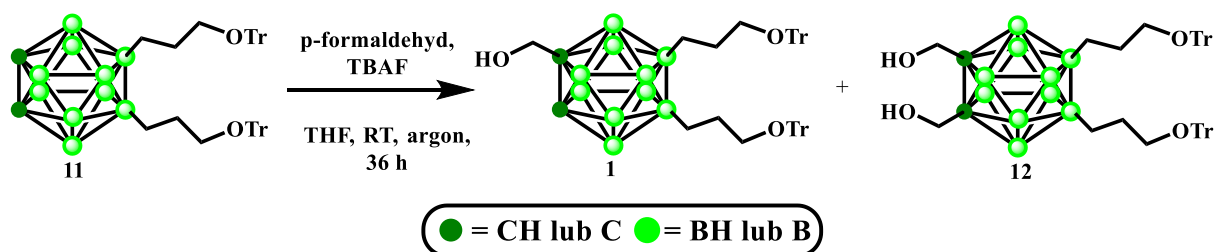
Reakcję sprzęgania Kumady związków **7** z **10** przeprowadziłem przy użyciu katalizatora, kompleksu tetrakis(trifenylfosfino)palladu(0) [P(Ph₃)₄Pd] stosując jako rozpuszczalnik bezwodny, nasycony argonem THF. Po standardowej obróbce mieszaniny reakcyjnej surowy produkt oczyściłem za pomocą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent gradient Et₂O w heksanie. Związek **11** otrzymałem z wydajnością 40 % po oczyszczeniu [3].



Zdjęcie 1. Synteza odczynnika Grignarda, pochodnej 3-trytyloksy-1-bromopropanu (**10**) (A). Sprzężanie Kumady, synteza 9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (**11**) (B).

2.1.2. Wprowadzenie podstawnika hydroksymetylowego w pozycje C₁ lub C₂ klastera, funkcjonalizowanego na atomach boru B₉ i B₁₂. Synteza 1-hydroksymetylo-9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (**1**).

Na potrzeby syntezy pierwszej generacji kompozytów klasterów boru i DNA-oligonukleotydów do związku **11** przyłączano podstawnik hydroksymetylowy stosując n-BuLi do aktywacji grupy C-H klastera oraz gazowy tlenek etylenu. Ze względu na ograniczoną dostępność handlową gazowego tlenu etylenu, zmienną jakość różnych partii odczynnika, koszt oraz jego trwałość zdecydowałem się na zmianę tlenu etylenu na łatwiejszy w użyciu paraformaldehyd pozwalający na przyłączenie do atomów węgla grup C-H podstawnika hydroksymetylowego (**Schemat 13**).



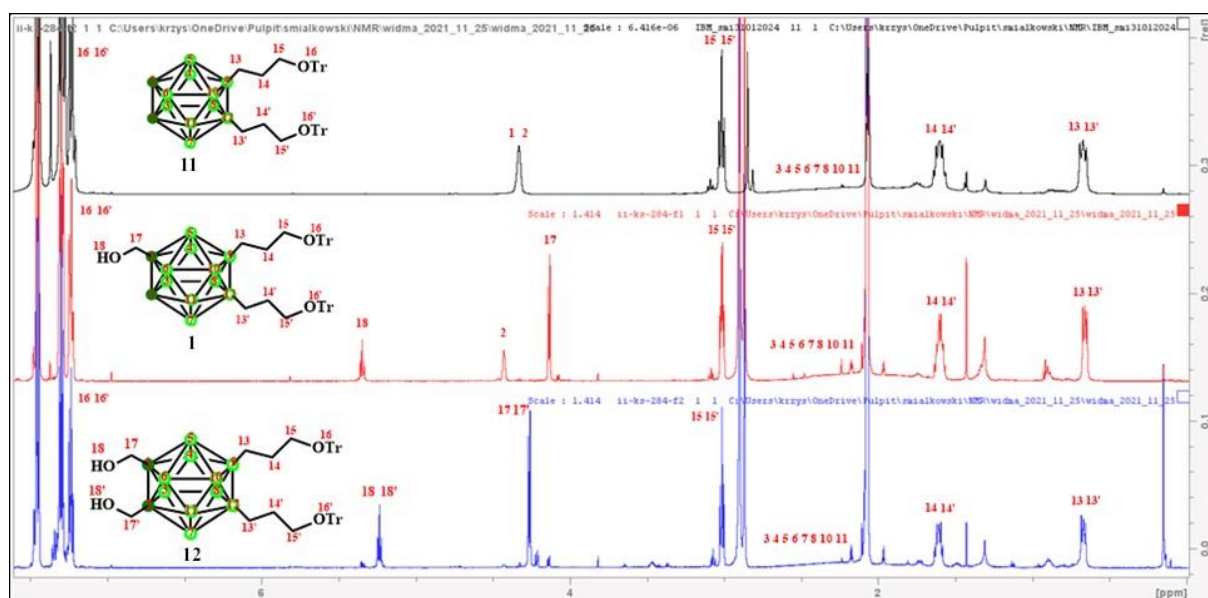
Schemat 13. Synteza 1-hydroksymetylo-9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (**1**) oraz 1,2-dihydroksymetylo-9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (**12**).

Zazwyczaj do aktywacji grup C-H klastera stosuje się silną zasadę *n*-BuLi, co zwiększa prawdopodobieństwo powstawania produktów podstawionych na obu atomach węgla C₁ i C₂. Ponieważ w tym przypadku pożądanym w dalszych etapach syntezy produktem oligofunkcjonalizacji jest produkt posiadający dwa podstawniki na atomach boru i jeden podstawnik na atomie węgla, zdecydowałem się zastosować słabszy odczynnik aktywujący zwiększający szansę na powstanie w przewodzie produktu monopodstawionego na atomie węgla. W tym celu zaadaptowałem metodę opisaną w literaturze dla reakcji paraformaldehydu z niepodstawionym *orto*-karboranem przy użyciu jako zasady aktywującej grupę C-H fluorek tetrabutylamonowy (TBAF) zamiast *n*-BuLi [100]. Obserwowałem powstawanie produktów mono- oraz dwupodstawionych w stosunku około 1 do 1, co jest charakterystyczne dla reakcji funkcyjalizacji atomów węgla *orto*-karboranu. Po standardowej obróbce mieszaniny reakcyjnej i oczyszczeniu produktu za pomocą chromatografii kolumnowej otrzymałem pochodną monopodstawioną **1** w niewielkim nadmiarze w stosunku do pochodnej dwupodstawionej **12** z wydajnościami odpowiednio: 38% i 31% co uznałem za wynik zadowalający.

2.1.3. Porównanie widm ¹H i ¹¹B{¹H}-NMR oligofunkcjonalizowanych pochodnych 1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (6**), związków **1**, **11**, **12**. Wpływ wprowadzonych podstawników na kwasowość grup C-H mierzony zmianą przesunięcia chemicznego.**

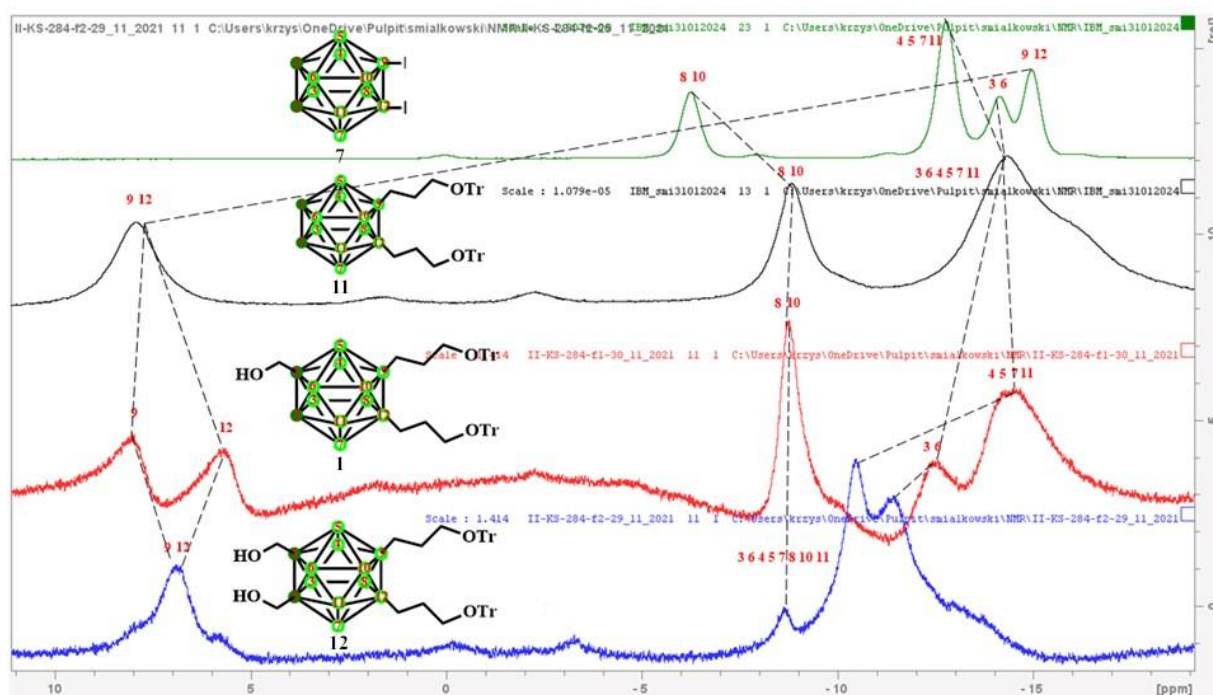
Poszczególne atomy wodoru w strukturach pochodnych **1**, **11**, **12** oznaczyłem numerami od 1 do 18. Sygnałom na widmach ¹H-NMR przypisałem odpowiedni numer odpowiadający numerowi atomu wodoru w strukturze związku (**Rysunek 17**). Sygnały 16 i 16' o przesunięciu chemicznym od 7,45 do 7,23 ppm występujące we wszystkich widmach, w zakresie wyższych częstotliwości pola magnetycznego odpowiadają protonom aromatycznych grup trytylowych. Na widmach związków **1** i **12** w wyniku przyłączenia grup hydroksymetylowych do atomów węgla klastera C₁ lub C₁ i C₂ pojawiają się tryplety 18 i 18' przy odpowiednio 5,35 ppm (dla związku **1**) i 5,24 ppm (dla związku **12**) pochodzące od atomów wodoru grup hydroksyloowych. Sygnały 1 i 2 w postaci szerokich singletów o przesunięciach chemicznych 4,33 ppm i 4,43 ppm występujące na widmach związków **1** i **11** odpowiadają atomom wodoru grup C-H klastera. Można zauważyć, że wprowadzenie jednego podstawnika hydroksymetylowego powoduje wzrost przesunięcia chemicznego atomu wodoru grupy C-H co związane jest z jego słabszym ekranowaniem i wzrostem kwasowości. Warto także podkreślić użyteczność sygnałów grup C-H jako sygnałów diagnostycznych pozwalających śledzić za pomocą ¹H-NMR stopień podstawienia na atomach węgla jak również stosunek produktów mono-

i dwupodstawienia w procesie oligofunkcjonalizacji karboranów co nie zawsze jest łatwo osiągalne za pomocą TLC. Dublety 17 i 17' przy odpowiednio 4,14 ppm i 4,27 ppm, należą do grup metylenowych podstawników hydroksymetylowych związków **1** i **12**. Tryplety 15 i 15' pojawiające się na wszystkich przedstawionych widmach przy około 3,01 ppm odpowiadają grupom metylenowym połączonym z grupami trytyloksylowymi. Pasma sygnałów w zakresie od 2,8 ppm do 1,8 ppm, oznaczone numerami 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 odpowiada atomom wodoru grup B-H klastra. Kwintety 14 i 14' obserwowane na wszystkich przedstawionych widmach przy 1,6 ppm odpowiadają grupom metylenowym B-CH₂-CH₂-CH₂-OTr. Tryplety 13 i 13' występujące na przedstawionych widmach przy 0,66 ppm odpowiadają grupom metylenowym przyłączonym do atomów B₉ i B₁₂ klastra.



Rysunek 17. Widma ¹H-NMR (600 MHz, aceton-d₆) związków **1**, **11**, **12**.

Interpretacji widm ¹¹B{¹H}-NMR dla związków **1**, **7**, **11**, **12** (**Rysunek 18**) dokonałem wykorzystując dane literaturowe dla pochodnych **7** i **11** [65] oraz analizując integracje sygnałów, co umożliwia określenie stosunku ilościowego atomów boru B_{9/12}, B_{8/10}, B_{4/5/7/11} B_{3/6} w klastrze względem siebie. Przyłączenie atomów jodu w pozycje B₉ i B₁₂ klastra powoduje występowanie sygnałów B₉ i B₁₂ przy -14,97 ppm. Dla porównania sygnały dla tych atomów boru w niepodstawionym *orto*-karboranie, w deuterowanym acetonie znajdują się przy około -1 ppm [65].



Rysunek 18. Widma $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ -NMR (193 MHz, aceton- d_6) związków **1**, **7**, **11**, **12**.

Zastąpienie atomów jodu podstawnikami trytyloksyalkilowymi spowodowało znaczącą zmianę przesunięcia chemicznego sygnałów B₉ i B₁₂ do 7,92 ppm co spowodowane jest efektem elektroakceptorowym podstawnika trytyloksypropylowego, a w konsekwencji zmianą gęstości elektronowej atomów boru B₉ i B₁₂. Zmianie uległy również przesunięcia sygnałów atomów boru B₈ i B₁₀, bezpośrednio sąsiadujących z grupami B-I z -6,25 do -8,84 ppm. Zmianie, choć w mniejszym stopniu uległy także przesunięcia sygnałów odpowiadających atomom boru B₄ i B₁₁, także sąsiadującym z grupami B-I, z -12,79 ppm do -14,15 ppm. Po wprowadzeniu podstawnika trytyloksyalkilowego w pozycje B₉ i B₁₂ sygnały odpowiadające atomom boru B₃ i B₆ oraz B₄, B₅, B₇, B₁₁ nakładają się na siebie. Warto zauważyć jest efekt wprowadzenia podstawnika hydroksymetylowego w pozycje C₁ (lub C₂) związku **11** co powoduje złamanie symetrii cząsteczki i rozszczepienie sygnałów atomów boru B₉ i B₁₂. Dodatkowo widzimy oddzielenie się sygnałów atomów boru B₃ i B₆ od B₄, B₅, B₇, B₁₁. Wprowadzenie kolejnego podstawnika na drugi atom węgla przywraca równocześnie atomów B₉ i B₁₂ tym samym powodując z powrotem obserwowany dla nich wcześniej jeden sygnał. Dla związku **12** sygnały od pozostałych atomów boru nakładają się.

Konkludując, widma ^{11}B -NMR oligofunkcjonalizowanych *ortho*-karboranów, nawet w większym stopniu niż widma ^1H -NMR ilustrują wielokrotnie podkreślaną w tej pracy złożoną zależność wpływu podstawienia na jednym z atomów klastra, zarówno boru jak i węgla na rozkład gęstości elektronowych na wszystkich pozostałych atomach klastra

i w związku z tym zmianę ich właściwości w stosunku do stanu przed podstawieniem. Co więcej podstawienia na kolejnych atomach w procesie oligofunkcjonalizacji klastera mają także istotny wpływ na stereochemię cząsteczki co dobrze ilustruje omówione wyżej porównanie w tym aspekcie związków **1**, **11** i **12**. Oba zjawiska mają z kolei wpływ zarówno na opracowywane metody oligofunkcjonalizacji jak i na właściwości oligofunkcjonalizowanych pochodnych klasterów i ich wykorzystanie w praktyce. Złożoność tych procesów i zależności jest nawet jeszcze większa w przypadku metalokarboranów. Wyniki moich badań będące przyczynkiem do ich poznania są przedmiotem opisu i analizy w następnym rozdziale niniejszej pracy.

2.2. Oligofunkcjonalizacja bis(1,2-dikarba-closo-dodekaborano)-commo-3,3'-kobaltanu (III) (13). Opracowanie metody syntezy syntonów do otrzymywania kompozytów DNA i klasterów boru jako bloków budulcowych nanocząstek trzeciej generacji.

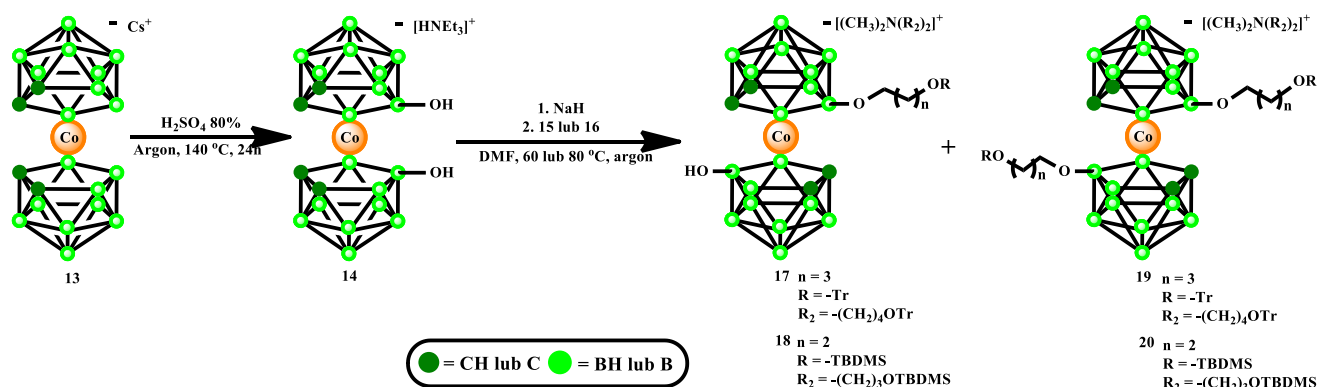
Kolejnym zadaniem realizowanego przeze mnie Indywidualnego Planu Badawczego była oligofunkcjonalizacja metalokarboranu w celu wykorzystania tego typu kompleksów, analogicznie do omówionego wcześniej *orto*-karboranu, jako platform do przyłączania DNA-oligonukleotydów. Różnice właściwości i kształtu, a co za tym idzie także stereochemii między karboranami (kształt kulisty) i metalokarboranami (kształt elipsoidalny) pozwoliły na otrzymanie kolejnej, trzeciej generacji nanocząstek zbudowanych z klasterów boru i DNA-oligomerów (**Tabela 13**) [101]. W badaniach prowadzonych na tym etapie wykorzystałem bis(1,2-dikarba-closo-dodekaborano)-commo-3,3'-kobaltan (III) [kobalt bis(1,2-dikarbolid), COSAN] (**13**), metalokarboran zawierający kobalt. Choć rodzina metalokarboranów typu metal-bis(1,2-dikarbolid) jest bardzo liczna i obejmuje między innymi kompleksy żelaza, chromu, niklu i wielu innych metali, to COSAN jest metalokarboranem najlepiej przebadanym, łatwo dostępnym i dlatego najczęściej wykorzystywanym w badaniach nad metalokarboranami [83]. Metody oligofunkcjonalizacji które zostały przeze mnie opracowane pozwalają na wprowadzenie trzech lub czterech podstawników w strukturę COSANU w dwóch wariantach:

- a) funkcjonalizacja poprzez przyłączenie dwóch podstawników trytyloksyalkilowych (**Schemat 14**, **Schemat 19**) lub *tert*-butylodimetylosililoksyalkilowych (**Schemat 14**) do atomów boru B₈ i B₈, a następnie przyłączenie podstawnika hydroksyalkilowego do jednego z atomów węgla COSANU o niezahamowanej (**Schemat 16**) lub zahamowanej (**Schemat 20**) rotacji ligandów karboranylowych wokół jonu kobaltu

- b) przyłączenie dwóch podstawników trytyloksyalkilowych do atomów węgla C₁ i C_{1'} i podstawnika hydroksyeterowego do atomu B₈ lub B_{8'}: COSAN (Schemat 21).

W odróżnieniu od oligofunkcjonalizacji *orto*-karboranu, wprowadzenie podstawników w różne pozycje każdego z ligandów karboranylowych COSANU sprawia, że podstawniki znajdują się w większej odległości od siebie, powodując równocześnie zwiększenie odległości pomiędzy przyłączanymi łańcuchami DNA oraz ich odległości od miejsca odpowiadającego za przyłączenie do stałego złoża LCA-CPG (*ang.: long chain alkylamine controlled pore glass*) stosowanego w automatycznej syntezie oligonukleotydów. Może to mieć wpływ na polepszenie parametrów automatycznej syntezy oligonukleotydów na klasterze boru w następnych etapach. Nieuchronnie prowadzi to również do powstawania bloków budulcowych nanocząstek, kompozytów metalokarboranu i DNA-oligonukleotydów o odmiennej stereochemii i właściwościach niż w przypadku bloków budulcowych tworzonych na bazie *orto*-karboranu. Dodatkowo rotacja ligandów wokół metalu metalokarboranu bądź jej brak również wpływa na swobodę układania się przyłączonych łańcuchów DNA w przestrzeni co może powodować zmiany w dynamice powstawania nanocząstek, zmiany topologii uzyskanych struktur i w konsekwencji ich właściwości.

2.2.1. Funkcjonalizacja na atomach boru B₈ i B_{8'} poprzez alkilowanie grup hydroksylowych w 8,8'-dihydroksy-bis(1,2-dikarbolido)-3-kobaltanie (III) (14).



Schemat 14. Alkilowanie 8,8'-dihydroksy-COSANU (14) odczynnikami alkilującymi zawierającymi grupę tosyłową lub brom jako grupę odchodzącą oraz grupę trytylową lub *tert*-butyloдимetylosililową jako grupy ochronne funkcji hydroksylowych: TsO(CH₂)₄OTr (15) lub Br(CH₂)₃OTBDMS (16).

Badania nad oligofunkcjonalizacją COSANU rozpocząłem od literaturowej metody syntezy 8,8'-dihydroksy-pochodnej COSANU (14) [88]. Związek 14 otrzymałem w reakcji soli ceszowej COSANU z 80% kwasem siarkowym (H₂SO₄). 8,8'-Dihydroksy-COSAN (14)

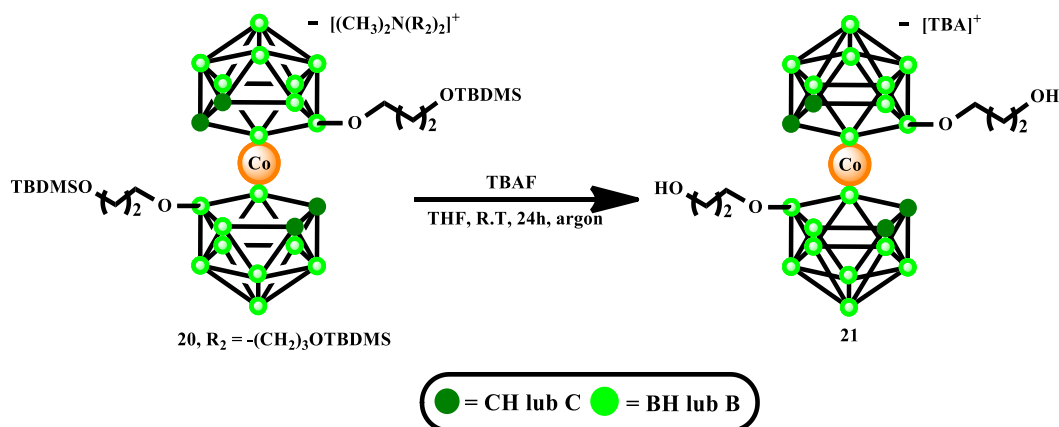
otrzymałem w postaci soli trietyloamoniowej $[\text{HNEt}_3]^+$ poprzez rozpuszczenie surowego produktu w jak najmniejszej ilości etanolu, dodając następnie chlorowodorek trietyloaminy rozpuszczony w 50% mieszaninie wody i etanolu. Wydajność związku **14** po oczyszczeniu metodą chromatografii kolumnowej wyniosła 85%.

Kolejnym etapem było alkirowanie 8,8'-dihydroksy-COSANU na atomach tlenu grup hydroksyloowych w reakcji z 4-O-(trytyloksybutylo)-p-toluenosulfonianem (**15**) bądź 3-O-(*tert*-butylodimetylosililoksy)-1-bromopropanem (**16**) różniącymi się grupą odchodzącą przy atomie węgla łańcucha alkirowego (grupa tosylowa lub brom) oraz grupą ochronną grupy hydroksylowej (grupa trytylowa bądź *tert*-butylodimetylosililowa, TBDMS). Do aktywacji grup hydroksyloowych 8,8'-di-hydroksy-COSANU zastosowałem wodorek sodu (NaH). Związek **14** rozpuściłem w niewielkiej ilości bezwodnego dimetoksyetanu (DME), po czym dodałem do równomolowej ilości NaH (60% dyspersja w parafinie). Mieszaninę pozostawiłem na 2 godziny. Po tym czasie rozpuszczalnik w sposób ostrożny, z mieszaniem odparowałem na linii próżniowej. Celem tej operacji było wykorzystanie NaH do związania protonu przeciw jonu $[\text{HNEt}_3]^+$, a następnie pozbycie się trietyloaminy poprzez jej odparowanie wraz z rozpuszczalnikiem. Wytrącony związek **14** w postaci soli sodowej rozpuściłem w bezwodnym dimetyloformamidzie (DMF), grupy hydroksyloowe aktywowałem za pomocą NaH po czym dodałem odczynnik alkirowy **15** lub **16** rozpuszczony w bezwodnym DMF. Niezależnie od rodzaju zastosowanego odczynnika alkirowego **15** bądź **16** i pomimo użytego nadmiaru aktywatora w postaci NaH, reakcja nie zachodzi do końca, tzn. nie kończy się powstaniem wyłącznie pożądanego produktu dwupodstawienia **19** lub **20** (Schemat 14). Po 24 h w reakcjach powstaje mieszanina monopodstawionych pochodnych **17** lub **18** i powstających w przewadze dwupodstawionych pochodnych **19** lub **20**. Ponadto, w przypadku produktów **17** i **19** otrzymywanych z wykorzystaniem związku **15** jako odczynnika alkirowego obserwowałem częściową detrytylację co prowadzi do skomplikowanej mieszaniny związków w surowym produkcie. Przyczyna tego zjawiska może być związana z kwasową labilnością grup trytylowych oraz z właściwościami klasterów boru jako kwasów Lewisa [102]. Związki **17** i **19** można wyodrębnić na drodze chromatografii kolumnowej stosując jako eluent gradient metanolu lub acetonitrylu w chlorku metylenu. Związek **19** otrzymuje się z wydajnością od 30 do 60% po oczyszczeniu za pomocą chromatografii kolumnowej.

Reakcja 8,8'-dihydroksy-COSANU (**14**) z 3-O-(*tert*-butylodimetylosililo)-1-bromopropanem (**16**) jest bardziej selektywna niż w przypadku alkirowania pochodną **15** i prowadzi głównie do otrzymania dwupodstawionej pochodnej **20** z wydajnością 80%. Produkt monopodstawienia powstaje w małych ilościach. W reakcji nie zaobserwowałem powstawania

produktów ubocznych utworzonych w wyniku ewentualnej labilności ochronnej grupy TBDMS tak jak w przypadku syntezy związku **19** z wykorzystaniem związku **15**.

Co ciekawe, analizując widma ^1H - oraz ^{13}C -NMR zsyntezowanych związków (widma: *S2*, *S3*, *S7*, *S8*, *S12*, *S13* załączone w materiałach uzupełniających publikacji [94]), nieoczekiwanie stwierdziłem, że produkty zarówno monopodstawione (**17**, **18**) jak i dwupodstawione (**19**, **20**) otrzymywałem w postaci soli tetraalkiloamoniowych $[(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{OR}_2)_2]^+$, gdzie R_2 oznacza resztę grupy trytylowej bądź *tert*-butyldimetylosililowej w zależności od użytego odczynnika alkilującego **15** lub **16**. Po szczegółowej analizie i badaniach literaturowych okazało się, że przyczyną tego zjawiska jest reakcja uboczna NaH z rozpuszczalnikiem, w tym przypadku DMF, w wyniku której powstaje dimetyloamina, która następnie reaguje z odczynnikami alkilującymi **15** i **16** [103]. Reakcje uboczne prowadzące do powstawania czwartorzędowych kationów amoniowych $[(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{OR}_2)_2]^+$ są zapewne w znacznym stopniu odpowiedzialne także za niepełne alkilowanie obu grup hydroksylowych 8,8'-dihydroksy-COSANU i prowadzą do powstawania produktów monopodstawionych **17** lub **18**.



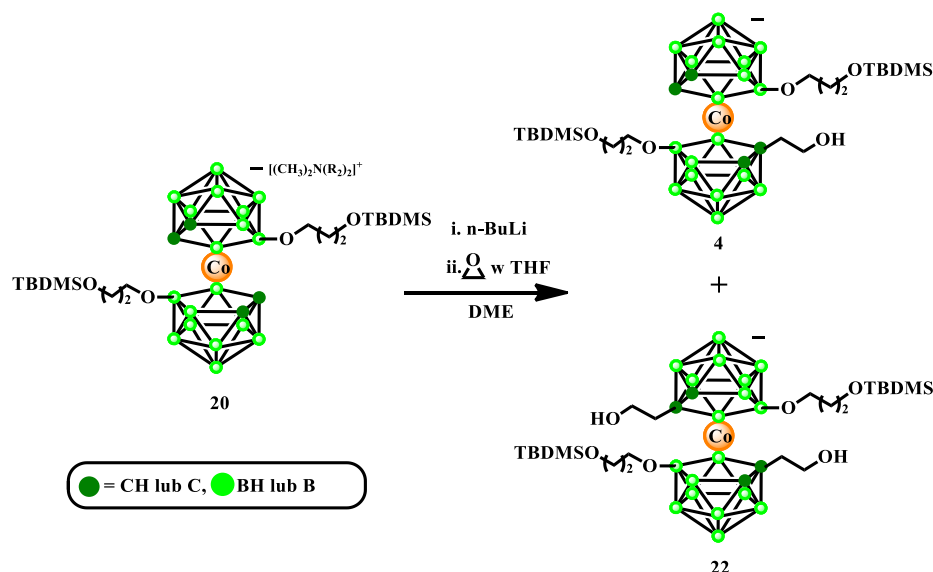
Schemat 15. Synteza 8,8'-di(3-hydroksypropylo)-bis(1,2-dikarbollido)-3,3'-kobaltanu (III) (**21**), usuwanie grup ochronnych TBDMS.

Alternatywną drogą syntezy związku **19** może być uzyskanie pochodnej **21** (**Schemat 15**) w wyniku usunięcia grup ochronnych TBDMS ze związku **20**, a następnie reakcja pochodnej **21** z chlorkiem trytylu w celu odtworzenia pochodnej COSANU **19**, zawierającej trytylowe grupy ochronne, których obecność jest wymagana w syntezie koniugatów DNA-oligonukleotydów i klasterów boru z wykorzystaniem metody amidofosforynowej automatycznej, chemicznej syntezy DNA. Pochodną **21** otrzymałem w reakcji związku **20** z fluorkiem tetrabutylamoniowym (TBAF) w THF. Ze względu na konieczność w wariancie alternatywnym syntezy związku **19** wydłużenia procedury o dwa etapy zdecydowałem się nie

kontynuować badań w tym kierunku, a w zamian podjąć próbę opracowania nowych metod oligofunkcjonalizacji COSANU, w celu otrzymania pochodnych umożliwiających syntezę bloków budulcowych nanocząstek, spełniających wymóg: dwa podstawniki zablokowane grupą trytylową, jeden podstawnik z wolną grupą hydroksylową (**Rysunek 14, Tabela 13**). Badania te opisane są w części 2.2.3. do 2.2.6 niżej. Wcześniej jednak postanowiłem wykorzystać otrzymywaną z dobrymi wydajnościami pochodną COSANU, dwupodstawioną na atomach boru B₈ i B_{8'} podstawnikami hydroksyalkilowymi zablokowanymi grupą TBDMS **20** do rozpoznania warunków wprowadzania dodatkowych podstawników na atomach węgla C₁ i C₂ (**Schemat 16**). Badania te opisane są niżej w części 2.2.2.

2.2.2. Funkcjonalizacja na atomach węgla pochodnej 8,8'-dialkoksy-[bis(1,2-dikarbacyclo-dodekaborano)]-*commo*-3,3'-kobaltanu (III) (**20**) funkcjonalizowanej na atomach boru B₈ i B_{8'} w reakcji z tlenkiem etylenu.

Ze względu na niską wydajność otrzymywania związku **19** zawierającego grupy trytyloksyalkilowe, związkiem modelowym w badaniach mających na celu rozpoznanie możliwości przyłączania podstawników do atomów węgla pochodnych COSANU funkcjonalizowanych wcześniej na atomach boru i otrzymywania pochodnych trój- i czteropodstawionych metalokarboranu był związek **20**. Jako rozpuszczalnik w reakcjach alkilowania grup C-H zastosowałem DME starając się zwiększyć selektywność reakcji w kierunku monopodstawienia względem dwupodstawienia (modulujący wpływ rozpuszczalnika na tę reakcję został poruszony w części literaturowej pracy).



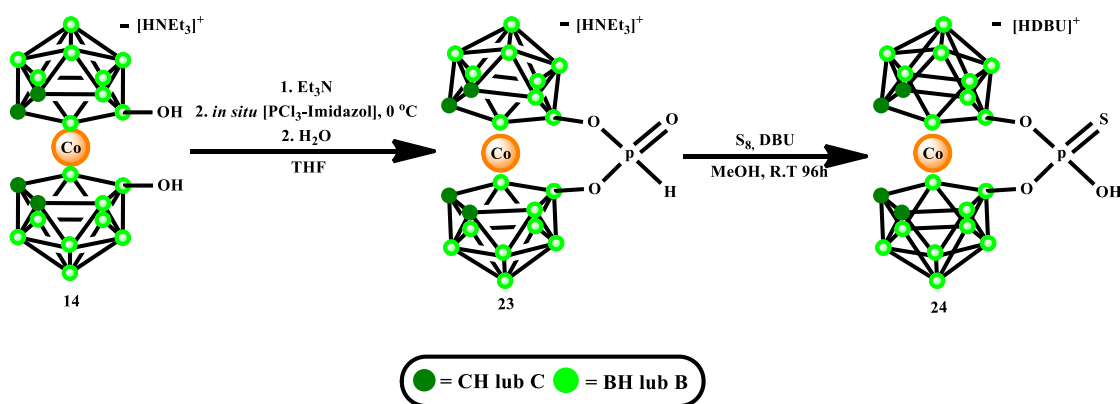
Schemat 16. Funkcjonalizacja na atomach węgla C₁ i C₂ 8,8'-alkoksy pochodnej COSANU (**20**) podstawionej na atomach boru B₈ i B_{8'}.

Do aktywacji wiązania C-H metalokarboranu zastosowałem *n*-BuLi. Dodanie 1,5 równoważnika molowego *n*-BuLi do roztworu związku **20** w DME spowodowało zmianę koloru mieszaniny reakcyjnej z koloru pomarańczowego charakterystycznego dla COSANU na ciemno-fioletowy, co wskazuje na utworzenie barwnego solwatu monolitopochodnej o ładunku $[\text{Co}(\text{LiC}_2\text{B}_9\text{H}_{10})(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})]^{2-}$ z cząsteczkami DME [104]. Po 30 min. dodałem kolejną porcję 1,5 równoważnika *n*-BuLi co spowodował zmianę koloru mieszaniny reakcyjnej na ciemnoniebieski co wskazuje na utworzenie barwnego solwatu dilitopochodnej $[\text{Co}(\text{Li}_2\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2]^{3-}$ z DME [104]. Po 15 minutach, do mieszaniny reakcyjnej wkropliłem roztwór tlenku etylenu w THF w ilości 4,5 równoważnika molowego. Reakcję pozostawiłem w łaźni chłodzącej przez noc, po czym po standardowej obróbce mieszaniny reakcyjnej wyodrębniłem produkty. Opracowaną procedurę funkcjonalizacji na atomach węgla zastosowałem również do otrzymania pochodnych **3** i **32** opisanych niżej. Wydajności produktów monopodstawienia i dwupodstawienia **3**, **4**, **22**, **32** nie są co prawda wysokie jednak opracowana metoda pozwoliła na otrzymanie po raz pierwszy pochodnych metalokarboranu oligofunkcjonalizowanych równocześnie na atomach boru i węgla [12]. Reakcja funkcjonalizacji COSANU podstawionego wcześniej przy atomach boru, na atomach węgla z wykorzystaniem aktywacji grup C-H silnymi zasadami jest bardzo wrażliwa na stosunki molowe użytych reagentów. Sumarycznie w reakcji stosuję 3 równoważniki *n*-BuLi. Jeden równoważnik po to by oderwać proton związany z przeciwjonem (jeśli jest to np. kation trójetyloamoniowy) i dwa ekwiwalenty do aktywacji grup C-H metalokarboranu. W przypadku zastosowania jako substratu związku **20**, który występuje w postaci soli tetraalkiloamoniowej *n*-BuLi w ilościach 3 ekwiwalentów jest użyty w znacznym nadmiarze, ponieważ w środowisku reakcji nie ma protonu pochodzącego od przeciwjonu, który należałoby związać. Mimo to i tak zastosowałem nadmiar *n*-BuLi aby ułatwić aktywację grupy C-H i zwiększyć konwersję substratu do produktu. We wcześniejszych eksperymentach stosowałem gazowy tlenek etylenu. Niestety ze względu na brak precyzyjnej kontroli nad ilością użytego tlenku etylenu w reakcji otrzymywałem produkty wyłącznie dwupodstawione (np. **22**). Roztwór tlenku etylenu w THF zacząłem stosować wraz z dostępnością handlową odczynnika. Związki **4** i **22** otrzymałem z wydajnościami 9% i 27% po wyodrębnieniu produktów za pomocą chromatografii kolumnowej stosując gradient metanolu w chlorku metylenu. Niska wydajność otrzymanych związków wynika ze słabej konwersji substratu, której przyczyną może być kombinacja dwóch czynników takich jak: obecność dwóch, dużych grup ochronnych TBDMS dla grup hydroksylowych przyłączonych poprzez alkilowe linkery w pozycjach B₈ oraz B_{8'} oraz rotacja karboranylowych ligandów wokół kobaltu mogąca powodować dodatkową zawadę przestrzenną i przesłanianie

zaktywowanych atomów węgla metalokarboranu przez duże objętościowo grupy TBDMS i utrudniać dostęp elektrofila. Pomimo zastosowania DME jako rozpuszczalnika mogącego teoretycznie promować powstawanie produktu monopodstawienia (część literaturowa, rozdział 1.4), w reakcji powstaje głównie dwupodstawiony produkt. Analizując widma $^{11}\text{B-NMR}$ produktów **4** i **22** można zaobserwować pojawienie się 5 sygnałów o przesunięciach chemicznych w zakresie od 29,66 do 21,98 ppm, odpowiadającym przesunięciom chemicznym dla atomów boru B_8 oraz B_8' , co świadczy o tym, że każdy z produktów, monopodstawienia **4** oraz dwupodstawienia **22** powstaje w postaci mieszaniny diastereoizomerów. Zgodnie z danymi literaturowymi niepodstawiony COSAN w reakcjach z odczynnikami hydroksyalkilującymi takimi jak tlenek etylenu, oksetan czy też paraformaldehyd nie generuje diastereoizomerycznych monopodstawionych produktów [76]. Być może obecność grup TBDMS przyłączonych do atomów boru B_8 i B_8' ze względu na duże objętości grup ochronnych wymusza przyjęcie przez metalokarboran określonej konformacji co może powodować powstawanie do 4 diastereoizomerów dla monopodstawionych produktów w zależności od tego, do którego z atomów węgla metalokarboranu przyłączy się podstawnik (**Rysunek 9**). W przypadku produktów dwupodstawionych, zgodnie z danymi literaturowymi możemy spodziewać się przynajmniej 3 diastereoizomerów utworzonych w wyniku przyłączenia podstawników do atomów węgla metalokarboranu w pozycjach: 1,1'-anti, 1,2'-syn, 1,2-wicynalnej (część literaturowa, **Schemat 7**, rozdział 1.6) [76]. Za pomocą chromatografii kolumnowej łatwo oddzielić substrat od produktów mono- i dwupodstawienia na atomach węgla w metalokarboranie kontrolując wyciek z kolumny za pomocą TLC bądź HPLC. Na podstawie danych literaturowych można przypuszczać, że głównym produktem będą produkty formy racemicznej (1,2'-anti oraz 2,2'-anti), co najprawdopodobniej wynika z przesłaniania sąsiednich atomów węgla przez cząsteczki rozpuszczalnika koordynujące kationy litu. Choć w standardowych warunkach chromatografii kolumnowej stosowanych przez mnie wyodrębnienie poszczególnych diastereoizomerów nie było możliwe, ich rozdział byłby prawdopodobnie osiągalny stosując kombinacje technik chromatograficznych wraz z zastosowaniem odwróconego układu faz oraz krystalizacji frakcyjnej [76, 105].

2.2.3. Funkcjonalizacja na atomach boru B₈ i B_{8'}. Synteza estru kwasu tiofosforowego 8,8'-dihydroksy-[bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)]-*commo*-3,3'-kobaltanu (III) (24), pochodnej metalokarboranu o zahamowanej rotacji.

Ze względu na niskie wydajności syntezy pochodnych **4** i **22** oraz ich powstawanie w postaci mieszaniny diastereomerów co może w późniejszych etapach przyłączania do klastra łańcuchów DNA-oligonukleotydów prowadzić do powstawania mieszaniny diastereoizomerycznych bloków budulcowych nanocząstek, zdecydowałem się na przeprowadzenie badań mających na celu opracowanie alternatywnych metod oligofunkcjonalizacji COSANU. Celem było otrzymanie pochodnej COSANU o zablockowanej rotacji ligandów karboranylowych (**Schemat 17**) co potencjalnie mogło by 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 B₈ i B_{8'}. W tym celu wykorzystałem opisaną wcześniej koncepcję syntezy cyklicznych estrów kwasu fosforowego i 8,8'-dihydroksy-COSANU [89] z tą różnicą, że reszta kwasu fosforowego została zastąpiona resztą kwasu tiofosforowego, różne też były metody otrzymania obu typów połączeń.



Schemat 17. Synteza estrów kwasu H-fosfonowego (**23**) oraz tiofosforowego (**24**) 8,8'-dihydroksy-bis(1,2-dikarbolido)-3-kobaltanu (8,8'-dihydroksy-COSANU).

Należy w tym miejscu podkreślić istotną różnicę między pochodnymi COSANU obu typów. Co prawda w obu przypadkach, zarówno cyklicznego estru kwasu fosforowego jak i tiofosforowego 8,8'-dihydroksy-COSANU zachodzi oczekiwane zahamowanie rotacji ligandów karboranylowych metalokarboranu, to jednak w przypadku estru kwasu fosforowego, wydaje się, że ze względu na „efekt metalokarboranowy” [106] dalsza funkcjonalizacja na atomie fosforu jest w praktyce bardzo utrudniona, natomiast cykliczny ester kwasu tiofosforowego otwiera prawie nieograniczone możliwości dalszej funkcjonalizacji poprzez

wykorzystanie nukleofilowych właściwości atomu siarki i jej alkilowanie. Przykład takiego rozwiązania jest omówiony niżej.

W celu otrzymania cyklicznego 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 (**Schemat 17**) [107].

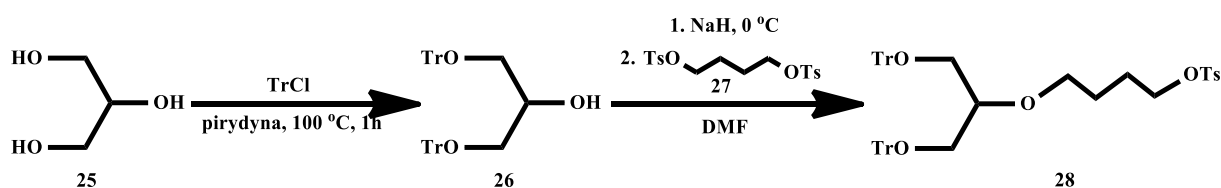
Cykliczny H-fosfonian 8,8'-dihydroksy-COSANU (**23**) otrzymałem w prostej, dwuetapowej syntezie prowadzonej bez wyodrębniania produktu pośredniego (**Schemat 17**). W pierwszym etapie 8,8'-dihydroksy-COSAN (**14**) został przekształcony w imidazolid cyklicznego estru kwasu fosfonowego w reakcji otrzymanego *in situ* z imidazolu i trichloru fosforu (PCl_3), triimidazolidu kwasu fosfonowego [$\text{P}(\text{Im})_3$]. W drugim etapie, powstały cykliczny imidazolid został zhydrolizowany do pożądanego cyklicznego H-fosfonianu **23** [108]. Zastosowałem trzykrotny nadmiar $\text{P}(\text{Im})_3$ względem substratu **14** w celu uniknięcia tworzenia się niepożądanych produktów ubocznych w postaci dimerów powstałych w wyniku przyłączenia dwóch cząsteczek 8,8'-dihydroksy-COSANU do jednej cząsteczki $\text{P}(\text{Im})_3$. Cykliczny H-fosfonian **23** został wyizolowany z wydajnością 91%. Analiza widm ^1H - i ^{13}C -NMR (widma S28 i S29 w [94]) potwierdziła, że związek **23** otrzymałem w postaci soli trietyloamoniowej. Pojawienie się sygnału przy -3,01 ppm na widmie ^{31}P -NMR (widma S32 i S33 w [94]) co odpowiada zakresowi przesunięcia chemicznego dla diestrów kwasu H-fosfonowego [108, 109] wskazuje na obecność mostka w postaci reszty kwasu H-fosfonowego. Co ciekawe w widmach ^{11}B -NMR (S30, S31 w materiałach dodatkowych Publikacji 1 stanowiącej podstawę pracy doktorskiej, pozycja 94 Bibliografii) związku **23** atomy boru $\text{B}_{4,7}$ oraz $\text{B}_{4,7'}$ charakteryzują się różnymi wartościami przesunięć chemicznych co sugeruje, że znajdują się w różnym otoczeniu chemicznym. Przyczyną tego może być fakt, że wiązanie $\text{P}=\text{O}$ jest przechylone w kierunku jednego z ligandów karboranylowych, a wiązanie $\text{P}-\text{H}$ w kierunku drugiego liganda oraz, że atom fosforu stał się centrum chiralności. Przyczyną nierównocенności ligandów karboranylowych COSANU związanych z atomem fosforu reszty H-fosfonianowej w **23** może być zgięcie (*ang. bending*) struktury COSANU po utworzenia cyklicznego H-fosfonianu [93] jak również częściowe zrotowanie ligandów karboranylowych względem siebie o kąt φ (**Rysunek 12 i 13** i dyskusja w części literaturowej, rozdział 1.6).

Cykliczny ester tiofosforanowy 8,8'-dihydroksy-COSANU (**24**) otrzymałem w reakcji usiarczania związku **23** siarką elementarną (S_8) wobec silnej zasady organicznej 1,8-diazabicyklo(5.4.0)undek-7-enu (DBU) w bezwodnym metanolu stosując metodę opisaną wcześniej dla dinukleozydowych diestrów kwasu H-fosfonowego [110]. Związek **24**

otrzymałem z wydajnością 70%. Analiza widm ^1H - i ^{13}C -NMR (S37, S38 w [94]) wykazała, że produkt **24** otrzymałem w postaci soli kationu 1,8-diazabicyklo(5.4.0)undek-7-enu, który wyparł kation trietyloamoniowy z roli przeciwjonu. Zmiana przesunięcia chemicznego dla atomu fosforu w widmie ^{31}P -NMR (S41, S42 w [94]) z -3,01 ppm do 48,63 ppm potwierdza przekształcenie estru kwasu H-fosfonowego w ester kwasu tiofosforowego [108, 111]. Na widmach ^{11}B -NMR cyklicznego trifosforanu **24** dla atomów boru $\text{B}_{4,7}$ oraz $\text{B}_{4',7'}$ obserwowany jest tylko jeden sygnał w przeciwieństwie do cyklicznego H-fosfonianu **23** w którego widmach ^{11}B -NMR obserwowane są oddzielne sygnały dla tych atomów boru.

2.2.4. Alkilowanie na atomie siarki cyklicznego estru kwasu tiofosforowego 8,8'-dihydroksi-[bis(1,2-dikarba-closo-dodekaborano)]-commo-3,3'-kobaltanu (III) (**24**).

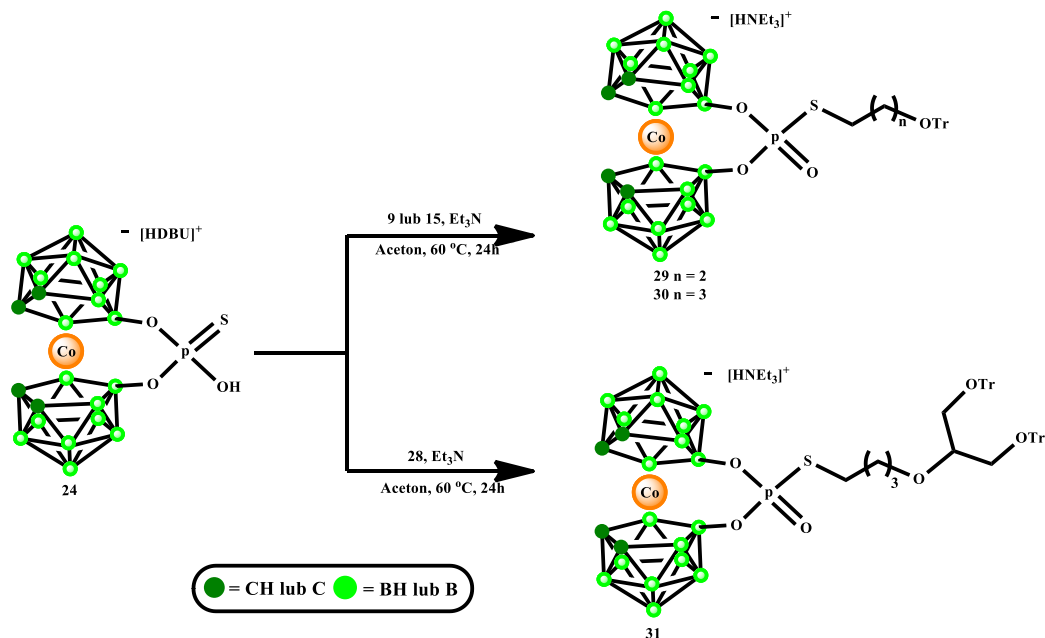
Reakcja alkilowania na atomie siarki pochodnych kwasu tiofosforowego jest metodą stosowaną powszechnie w chemii fosforoorganicznej [112]. Na drodze S-alkilowania grupy tiofosforanowej przyłączyłem zarówno liniowe jak i rozgałęzione podstawniki trytyloksyalkilowe (**Schemat 19**). Jako liniowe odczynniki alkilujące wykorzystałem 3-O-trytyloksy-1-bromopropan (**9**) oraz 4-(trytyloksy)butylo-*p*-toluenosulfonian (**15**) otrzymany wcześniej na potrzeby alkilowania 8,8'-dihydroksi COSANU (**14**) opisanego wyżej w części 2.2.1. 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 (**Tabela 13**).



Schemat 18. Synteza rozgałęzionego odczynnika alkilującego 4-(1,3-bis(trityloksy)propan-2-yloksy)butylo-*p*-toluenosulfonianu (**28**).

Rozgałęziony odczynnik tego typu, 4-(1,3-bis(trityloksy)propan-2-yloksy)butylo-*p*-toluenosulfonian (**28**) umożliwiający spełnienie tych wymogów otrzymałem na drodze dogodnej, dwuetapowej syntezy (**Schemat 18**). Jako substrat do syntezy odczynnika alkilującego zawierającego dwie grupy trytylowe wykorzystałem glicerol. W pierwszym etapie, w reakcji glicerolu z chlorkiem trytylu, stosując pirydynę jako rozpuszczalnik i jednocześnie zasadę otrzymałem opisany w literaturze 1,3-bis(trityloksy)propan-2-ol (**26**) [113]. W drugim

etapie do roztworu związku **26** w DMF dodałem wodorek sodu w celu aktywacji wolnej grupy hydroksylowej w **26** a następnie potraktowałem odczynnikami alkilującymi, 1,4-bis(tosyloksy)butanem (**27**) zsyntezowanym na podstawie metody opisanej w literaturze [114]. Związek **28**, po oczyszczeniu chromatograficznym otrzymałem z wydajnością 27%.



Schemat 19. Reakcje S-alkilowania cyklicznego tiofosforanu 8,8'-dihydroksy COSANU (**24**) liniowymi odczynnikami alkilującymi **9** i **15** oraz rozgałęzionym odczynnikiem alkilującym **28**.

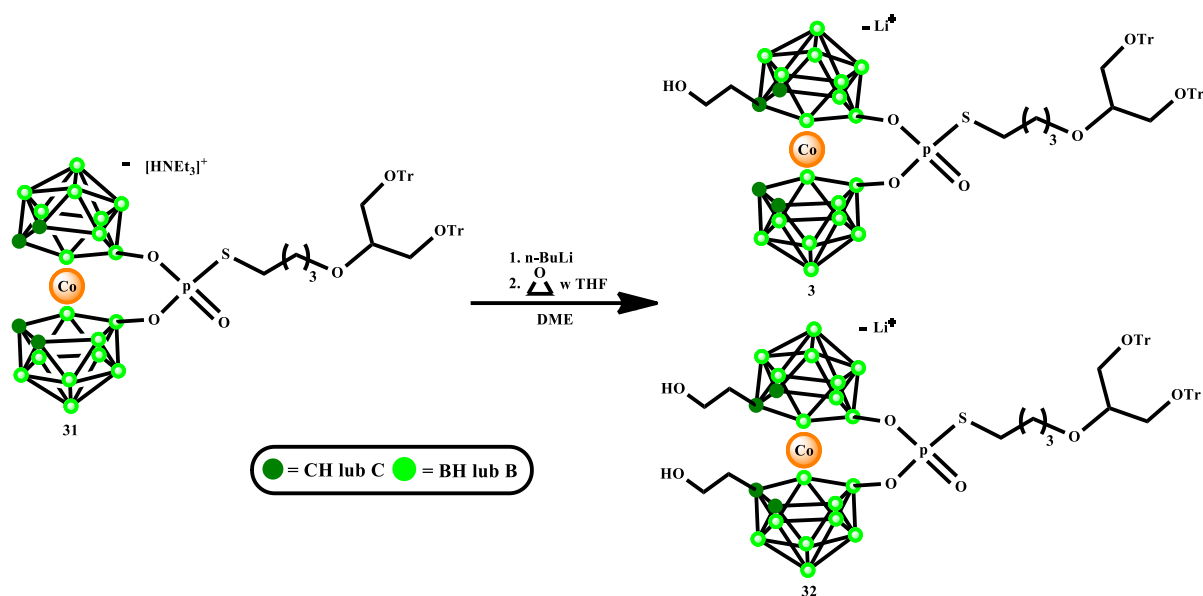
Reakcje S-alkilowania cyklicznego tiofosforanu COSANU **24** przeprowadziłem w takich samych warunkach dla wszystkich odczynników alkilujących **9**, **15**, **28** (**Schemat 19**). Reakcje alkilowania związku **24** prowadziłem w acetonie, wobec trójetyloaminy, w podwyższonej temperaturze, przez 24 h, kontrolując przebieg reakcji za pomocą TLC. Produkty alkilowania **29**, **30**, **31** otrzymałem z wydajnością odpowiednio 80%, 95% i 64% w postaci soli trietyloamoniowych co potwierdziłem analizą widm ¹H- oraz ¹³C-NMR (S46, S47, S55, S56, S69, S70 w [94]). Na uwagę zasługuje znacznie wyższa wydajność alkilowania atomu siarki w związku **24** liniowymi odczynnikami alkilującymi **9** i **15** niż rozgałęzionym odczynnikiem alkilującym **28** mimo, iż tosyłowa grupa odchodząca oddzielona jest od reszty glicerolu zablokowanego dużymi objętościowo grupami trytylowymi łącznikiem butylowym co powinno zredukować możliwość potencjalnej zawady przestrzennej.

W widmach ¹¹B-NMR (S48, S49, S57, S58, S71, S72 w [94]) związków **24**, **29**, **30**, **31** obserwować można jeden sygnał zarówno dla atomów boru B_{4,7} oraz B_{4',7'} w przeciwieństwie do widm cyklicznego H-fosfonianu **23**, w którym atomy boru charakteryzowały się różnymi przesunięciami chemicznymi. Może to wynikać z większych różnic między atomem tlenu

i wodoru przyłączonych do atomu fosforu w **23** w kontekście przesłaniania atomu boru niż różnic między atomami tlenu i siarki w związkach **24**, **29**, **30**, **31** co z kolei powoduje ich mniejszy, różnicujący wpływ na otoczenie elektronowe atomów boru $B_{4,7}$ oraz $B_{4,7'}$, nie wystarczający do zróżnicowania ich przesunięć chemicznych. W widmach ^{31}P -NMR związków **29**, **30**, **31** można zauważyć sprzężenie przez trzy wiązania protonów grupy CH_2 połączonej z atomem siarki z jądrem atomu fosforu cyklicznego trójestru kwasu tiofosforowego. W rezultacie sygnał atomu fosforu w widmach ^{31}P -NMR z nieodsprzęgniętymi jądrami wodoru występuję w postaci trypletu, po ich odsprzęgnięciu w widmach $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR obserwuje się ten sam sygnał w postaci singletu (*S50*, *S51*, *S59*, *S60*, *S73*, *S74* w [94]). Tylko w przypadku związku **30** na widmach ^{31}P -NMR obserwujemy dwa sygnały co wyraźnie wskazuje na powstanie diastereoizomerów.

2.2.5. Funkcjonalizacja na atomach węgla S-alkilowanej pochodnej **31** cyklicznego estru kwasu tiofosforowego 8,8'-dihydroksy-[bis(1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano)]-*commo*-3,3'-kobaltanu (III) (**24**) w reakcji z tlenkiem etylenu.

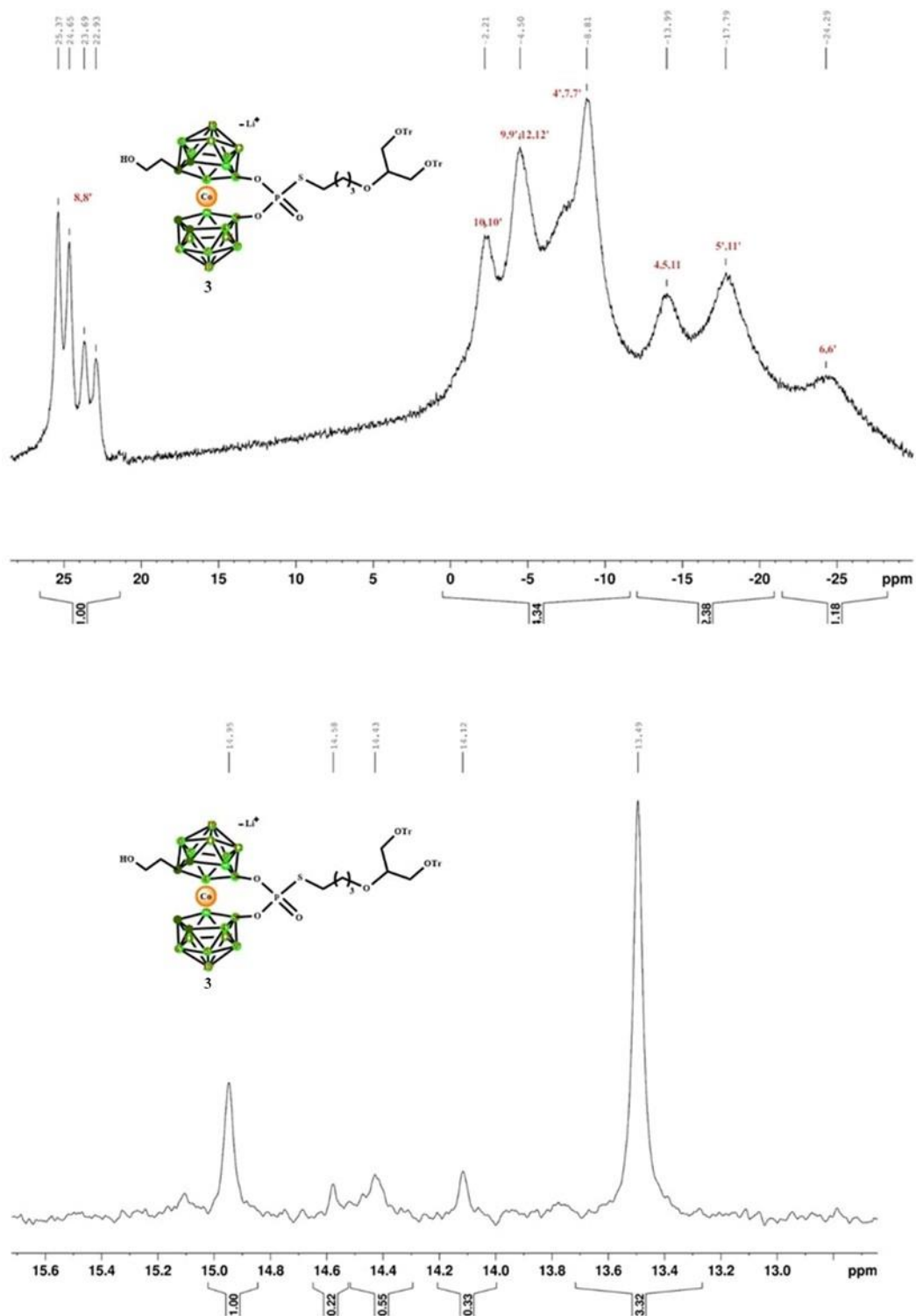
Przyłączenie grup hydroksyalkilowych do atomów węgla C_1 lub C_2 i $C_{1'}$ lub $C_{2'}$ S-alkilowanych pochodnych cyklicznego tiofosforanu 8,8'-dihydroksy COSANU (**31**) przeprowadziłem stosując metodę, którą opracowałem w celu funkcjonalizacji 8,8'-alkoksy-pochodnych **4**, **22**, w których grupa hydroksylova podstawników przyłączonych do atomów boru zablokowana została grupą TBDMS.



Schemat 20. Funkcjonalizacja na atomach węgla S-alkilowanej pochodnej cyklicznego estru kwasu tiofosforowego 8,8'-dihydroksy COSANU **31** w reakcji z tlenkiem etylenu.

Metoda ta oparta jest na aktywacji grup C-H ligandów karboranowych metalokarboranu poprzez oderwanie protonu od atomu węgla za pomocą *n*-BuLi, a następnie otwarciu pierścienia tlenku etylenu w wyniku ataku wygenerowanego w reakcji centrum nukleofilowego na atomach węgla metalokarboranu. Pomimo obecności reszty kwasu tiofosforanowego tworzącego mostek łączący ligandy karboranowe metalokarboranu zapobiegającego ich rotacji wokół jonu kobaltu, co powinno zwiększać dostępność grup C-H metalokarboranu w procesie C-alkilowania, poprzez ograniczenie zawady przestrzennej podstawników przyłączonych do atomów boru oraz zastosowania DME jako rozpuszczalnika kompleksującego jon litu produkty podstawienia na atomach węgla powstają w postaci mieszaniny produktów mono- i dwupodstawionych **3** i **32** ze stosunkowo niskimi wydajnościami odpowiednio 10% i 12%. Związki **3** i **32**, podobnie jak w przypadku związków **4** i **22**, powstają w postaci skomplikowanej mieszaniny diastereoizomerów co dobrze ilustrują widma ¹¹B- oraz ³¹P-NMR obu połączeń. Złożona stereochemia związków **3** i **32** wynika z jednej strony z faktu, że mostek tiofosforanowy wymusza przyjęcie określonej konformacji oraz lekko zgiętej struktury przez metalokarboran co zakłóca jego symetrię jak również przez fakt, że w przypadku monopodstawienia grupa hydroksyetylowa może znajdować w przy węglu C₁, C_{1'}, C₂ lub C_{2'} które to położenia nie są równocenne przy zablokowanej rotacji metalokarboranu. W przypadku dwupodstawienia możliwe są kombinacje C₁ i C_{1'}, C₁ i C_{2'}, C_{1'} i C₂, C₂ i C_{2'} oraz najmniej prawdopodobne podstawienie wicynalne C₁ i C₂ lub C_{1'} i C_{2'}. Różne kombinacje lokalizacji podstawników w strukturze metalokarboranu mają różny wpływ na sąsiadujące atomy boru i atom fosforu mostka tiofosforanowego. Analizując widma ¹¹B-NMR produktu monopodstawionego **3** (S79, S80 w [94]) możemy zauważyć 4 diagnostyczne sygnały o przesunięciach chemicznych odpowiadających absorpcji atomom boru B₈ i B_{8'}. Na widmach ¹¹B-NMR produktu dwupodstawionego **32** (S86, S87 w [94]) obserwowane jest 5 sygnałów dla atomów boru B₈ i B_{8'}.

Dodatkowych informacji na temat powstawania diastereoizomerów dostarcza ³¹P-NMR, gdzie dla związku **3** monopodstawionego na atomach węgla i na skutek tego mniej symetrycznego niż pochodna dwupodstawiona (S81, S82 w [94]) obserwujemy aż 7 sygnałów, a dla związku dwupodstawionego **32** 5 sygnałów (S88, S89 w [94]) (**Rysunek 19**). Wielość obserwowanych sygnałów w widmach ¹¹B- i ³¹P-NMR ilustruje skomplikowaną stereochemię otrzymanych przez mnie oligofunkcjonalizowanych pochodnych COSANU, jednak na obecnym etapie badań nie pozwala na przypisanie poszczególnych sygnałów do poszczególnych diastereoizomerów o zdefiniowanej lokalizacji podstawników w jego strukturze.



Rysunek 19. Widma $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ -NMR oraz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR związku **3**.

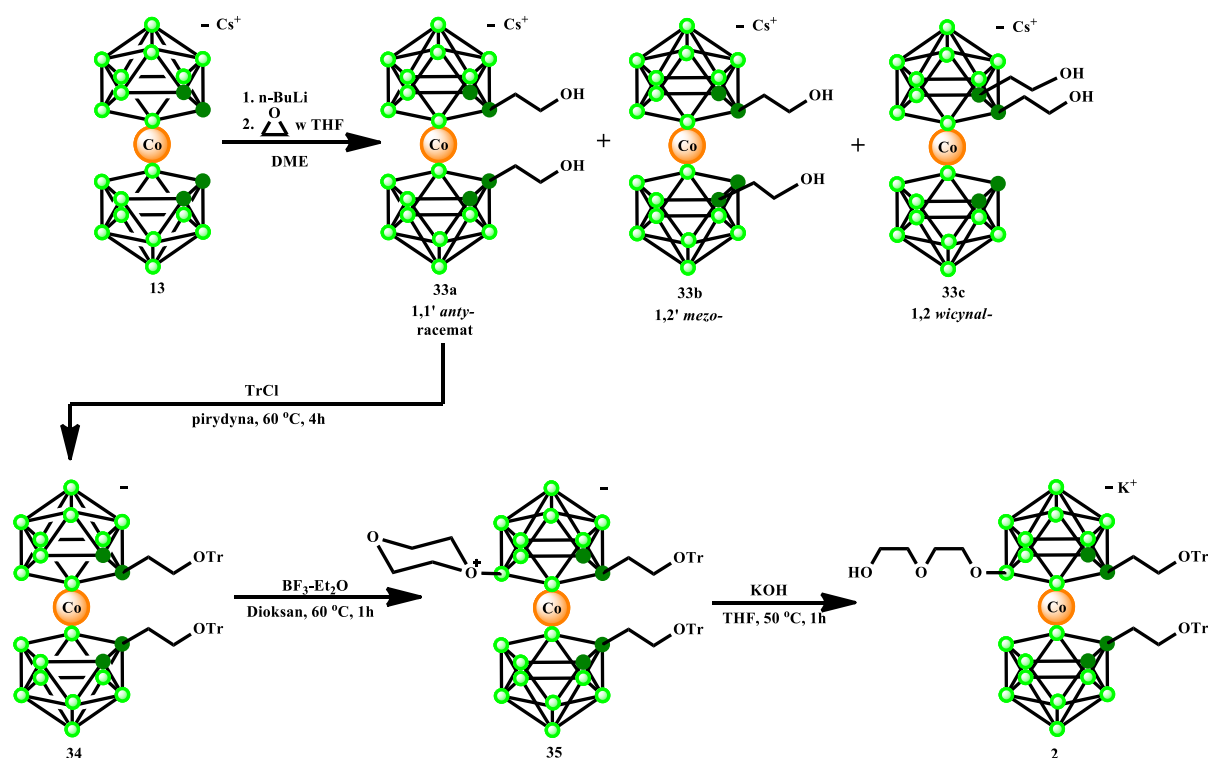
Rozwiązanie tego niezwykle interesującego z punktu poznawczego zagadnienia wymagałoby rozdzielenia mieszaniny diastereomerów na poszczególne indywidua stosując kombinację metod chromatograficznych i krystalizacji frakcyjnej, pogłębionych badań ^{11}B -i ^{31}P -NMR oraz analizy rentgenostrukturalnej połączeń które udało by się wykrystalizować.

Standardowa chromatografia kolumnowa stosowana przeze mnie pozwala jedynie na rozdział pochodnych mono- i dwupodstawionych choć i to nie jest łatwe. Warto jednak dodać, że w ostatnim czasie czynione są znaczne postępy w rozdziale diastereomerycznych i enancjomerycznych pochodnych klasterów boru (choć znacznie prostszych niż otrzymane przeze mnie) za pomocą preparatywnej HPLC i chiralnych złożeń chromatograficznych [90, 91].

Mimo tych niedogodności i stosunkowo niskich wydajności produktów końcowych otrzymana pochodna **3** spełnia zdefiniowane wcześniej wymogi platformy do przyłączania DNA-oligomerów w celu otrzymania bloków budulcowych do konstrukcji funkcjonalnych nanocząstek, kompozytów DNA i klasterów boru (**Rysunek 14, Tabela 13**) i czeka na dalsze wykorzystanie. W międzyczasie, poszukując innych niż opisane wyżej, i potencjalnie bardziej dogodnych metod oligofunkcjonalizacji metalokarboranów na przykładzie COSANU, opracowałem metodę, jak się wydaje pozbawioną wspomnianych wyżej wad, opisaną niżej w części 2.2.6.

2.2.6. Metoda syntezy 8-(5-hydroksy-3-oksa-pentoksy)-[1,1'-di(2-O-trytyloksyetylo)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu (2), syntonu do otrzymywania kompozytów DNA i klasterów boru trzeciej generacji.

Metodę syntezy 8-(5-hydroksy-3-oksa-pentoksy)-[1,1'-di(2-O-trytyloksyetylo)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu (**2**) przedstawioną na **Schemacie 21** opracowałem podczas stażu naukowego w Instytucie Chemii Nieorganicznej Czeskiej Akademii Nauk w Husinec-Řež w pobliżu Pragi w zespole kierowanym przez prof. Bohumira Grűnera, w ramach wieloletniej współpracy między Pracowniami prof. Grűnera i Pracownią Chemii Medycznej kierowaną przez prof. Leűnikowskiego. W celu otrzymania funkcjonalizowanych pochodnych COSANU **3** i **4** opisanych wyżej syntezę rozpoczynałem od przyłączenia podstawników do atomów boru B₈ i B_{8'}, a kończyłem przyłączając podstawniki do atomów węgla, co powodowało powstawanie skomplikowanej mieszaniny diastereoizomerów monopodstawionych pochodnych **3** i **4** oraz dwupodstawionych pochodnych **22** i **32** na końcowych etapach syntezy. Niezależnie od zastosowania metalokarboranu o niezahamowanej jak w przypadku związku **20** czy też zahamowanej jak w przypadku związku **31** rotacji karboranylowych ligandów wokół jonu kobaltu pochodne COSANU **3** i **4** otrzymywałem z niskimi wydajnościami i o niskiej czystości diastereoizomerycznej.



Schemat 21. Synteza 8-(5-hydroksyy-3-oksa-pentoksy)-[1,1'-di(2-O-trytyloksyetylo)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu (**2**).

W metodzie opisanej niżej zdecydowałem się na odwrotną kolejność przyłączania podstawników rozpoczynając procedurę syntezy oligofunkcjonalizowanego COSANU od przyłączenia podstawników hydroksyalkilowych do atomów węgla metalokarbtoranu a dopiero w następnej kolejności do atomów boru otrzymując w pierwszym etapie opisany w literaturze 1,1'-di(2-hydroksyetylo)-COSAN (**33a**) [76]. W odróżnieniu od syntez związków **3** (Schemat 20) i **4** (Schemat 16), tym razem zależało mi na otrzymaniu produktu nie C-mono- lecz C-dwupodstawienia. Wykorzystałem przy tym fakt, że w reakcji COSANU aktywowanego *n*-BuLi z tlenkiem etylenu, niezależnie od użytego nadmiaru *n*-BuLi oraz tlenku etylenu wyższe homologi, produkty trój- i czteropodstawione powstają w bardzo małych ilościach [76]. Z tego względu, kontrolując przebieg reakcji za pomocą TLC reakcję prowadziłem dodając na zmianę *n*-BuLi oraz tlenek etylenu do momentu, w którym zauważyłem brak dalszej konwersji COSANU. Reakcję prowadziłem analogicznie do wcześniej opisanych syntez związków **3**, **4**, **22**, **32** (rozdziały 2.2.2 oraz 2.2.5). Pożądany produkt dwupodstawiony w postaci mieszaniny diastereomerów C₁ i C₁'-anty, C₁ i C₂'-syn oraz powstającego w niewielkich ilościach izomeru wicynalnego C₁ i C₂, oddzieliłem od nieprzereagowanego COSANU, a także produktów mono, trój oraz czteropodstawionych za pomocą chromatografii kolumnowej. Kluczowym etapem jest rozdział diastereoizomerycznych produktów dwupodstawienia co pozwala na użycie w

kolejnych etapach oligofunkcjonalizacji jednej, stereochemicznie zdefiniowanej pochodnej COSANU. Korzystając z metody opisanej wcześniej [105] wyodrębniłem poprzez krystalizację frakcyjną kontrolując czystość diastereoizomeryczną kolejnych frakcji za pomocą HPLC izomer **33a** C₁ i C_{1'}-anti.

Trytylowanie grup hydroksylowych związku **33a** przeprowadziłem w reakcji z chlorkiem trytylu przy użyciu pirydyny jako rozpuszczalnika i zasady, analogicznie do reakcji trytylowania glicerolu w syntezie rozgałęzionego odczynnika S-alkilującego (**Schemat 18**) [113]. Reakcję prowadziłem w temperaturze 60 °C kontrolując jej przebieg przez 4 h za pomocą TLC. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowałem na wyparce próżniowej, a produkt oczyściłem za pomocą chromatografii kolumnową stosując jako eluent gradient acetonitrylu w chlorku metylenu. 1,1'-Di(2-trytyloksyetylo)-COSAN **34** otrzymałem z wydajnością 91%.

Kolejnym etapem była synteza adduktu metalokarboranu z dioksanem **35**. Związek **34** rozpuściłem w dioksanie, po czym wkropliłem dwukrotny równoważnik molowy eteratu trifluorku boru (BF₃·Et₂O) względem substratu. Reakcję prowadziłem w warunkach bezwodnych w atmosferze argonu, w temperaturze 60 °C przez 1 h kontrolując jej przebieg za pomocą TLC. W reakcji powstają dwa produkty uboczne będące wynikiem częściowej utraty jednej bądź obu kwasolabilnych grup trytylowych na skutek właściwości BF₃ jako kwasu Lewisa. Po tym czasie reakcję umieściłem w łaźni lodowej, a pH mieszaniny zneutralizowałem dodając 10% roztwór węglańca sodu Na₂CO₃. Mieszaninę ekstrahowałem chlorkiem metylenu. Rozpuszczalnik odparowałem na wyparce próżniowej. Związek **35** oddzieliłem od produktów ubocznych za pomocą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent chlorku metylenu. Surowy produkt oczyściłem za pomocą kolejnej chromatografii kolumnowej stosując jako eluent gradient benzenu w heksanie. Związek **35** otrzymałem z wydajnością 30%.

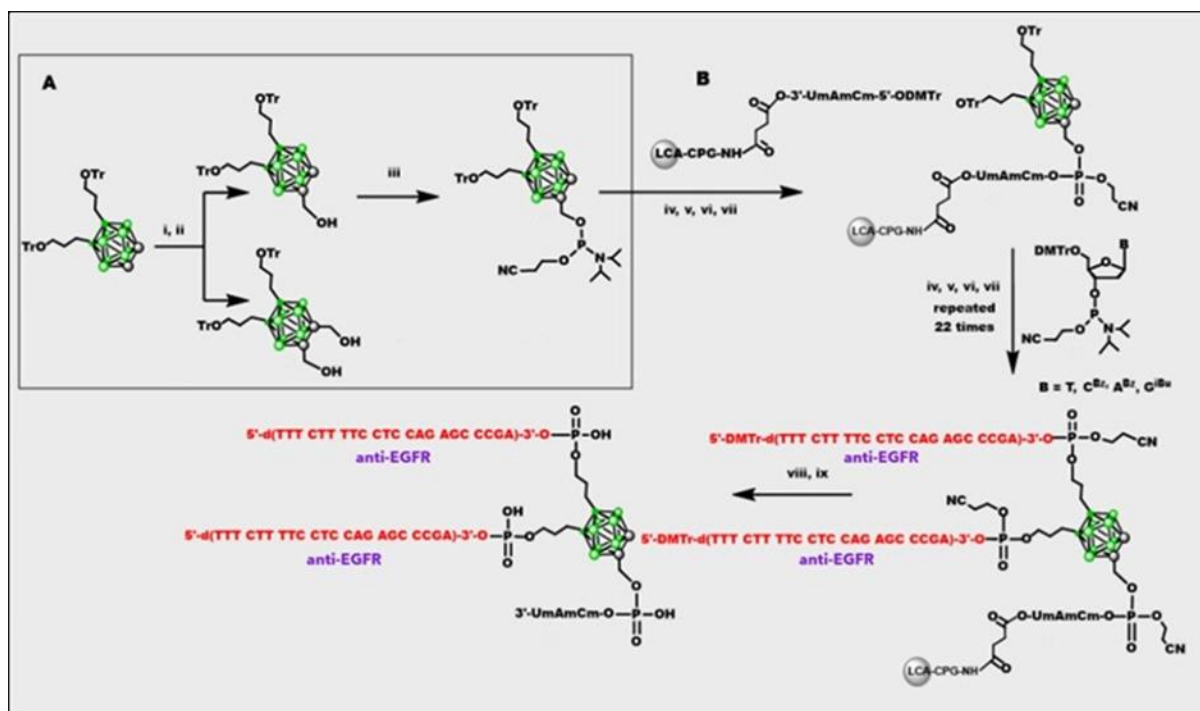
Ostatnim etapem syntezy było otwarcie pierścienia dioksanowego w addukcie **35** po dodaniu 1M wodnego roztworu wodorotlenku potasu do roztworu **35** rozpuszczonego w THF. [115] Reakcję prowadziłem przez 1 h w temperaturze 50 °C. Po tym czasie odparowałem rozpuszczalnik, a produkt końcowy **2** oczyściłem za pomocą chromatografii kolumnowej stosując jako eluent gradient metanolu w chlorku metylenu. Związek **2** otrzymałem z wydajnością 81%. Oligofunkcjonalizowany COSAN **2** został już wykorzystany do syntezy bloków budulcowych do konstrukcji funkcjonalnych nanocząstek kompozytów metalokarboranu i antysensowych oligonukleotydów. Zarówno synteza oligofunkcjonalizowanego COSANU **2**, kompozytów **2** i DNA-oligomerów jak również zdolność otrzymanych nanocząstek do wyciszania genu EGFR zostały opisane w pracy przygotowywanej do druku, pozycja [101] Bibliografii.

3. Otrzymywanie nanocząstek drugiej generacji posiadających zdolność równoczesnego wyciszania dwóch onkogenów: EGFR oraz c-MYC.

3.1. Synteza bloków budulcowych do konstrukcji nanocząstek drugiej generacji.

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). Charakterystyka biologiczna i badania zdolności do wyciszania docelowych genów otrzymanych nanocząstek, nośników terapeutycznych kwasów nukleinowych zostały wykonane w Pracowni Chemii Medycznej przez dr Katarzynę Bednarską-Szczepaniak i dr Gabriele Gajek (stypendystkę w projekcie Symfonia 3) [9].

Nanocząstki o właściwościach równoczesnego wyciszania dwóch onkogenów, EGFR oraz c-MYC (nanocząstki drugiej generacji, **Tabela 13**) zbudowane zostały z dwóch bloków budulcowych. Jednym z bloków budulcowych jest oligofunkcjonalizowana pochodna *orto*-karboranu posiadająca w pozycjach B₉ i B₁₂ klastera dwa 22-merowe łańcuchy oligonukleotydowe o sekwencji 5'-d(TTT CTT TTC CTC CAG AGC CCGA)-3' [95, 116, 117] komplementarnej (antysensowej) do fragmentu sekwencji mRNA EGFR pomiędzy 51 a 74 nukleotydem począwszy od kodonu startowego AUG [118] oraz w pozycji C₁ klastera 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 (**Tabela 13**), który zbudowany jest z dwóch komplementarnych DNA-oligomerów, jeden z nich jest antysensowy do fragmentu genu c-MYC i zawiera sekwencje nukleotydów 5'-d(AAC GTT GAG GGG CAT)-3' komplementarną do pierwszych pięciu kodonów sekwencji mRNA c-MYC [119] oraz „lepkie” końce komplementarne do sekwencji końca 5' bloku budulcowego będącego kompozytem klastera boru i antysensowego oligonukleotydu anty-EGFR oraz oligonukleotydu do niego komplementarnego.

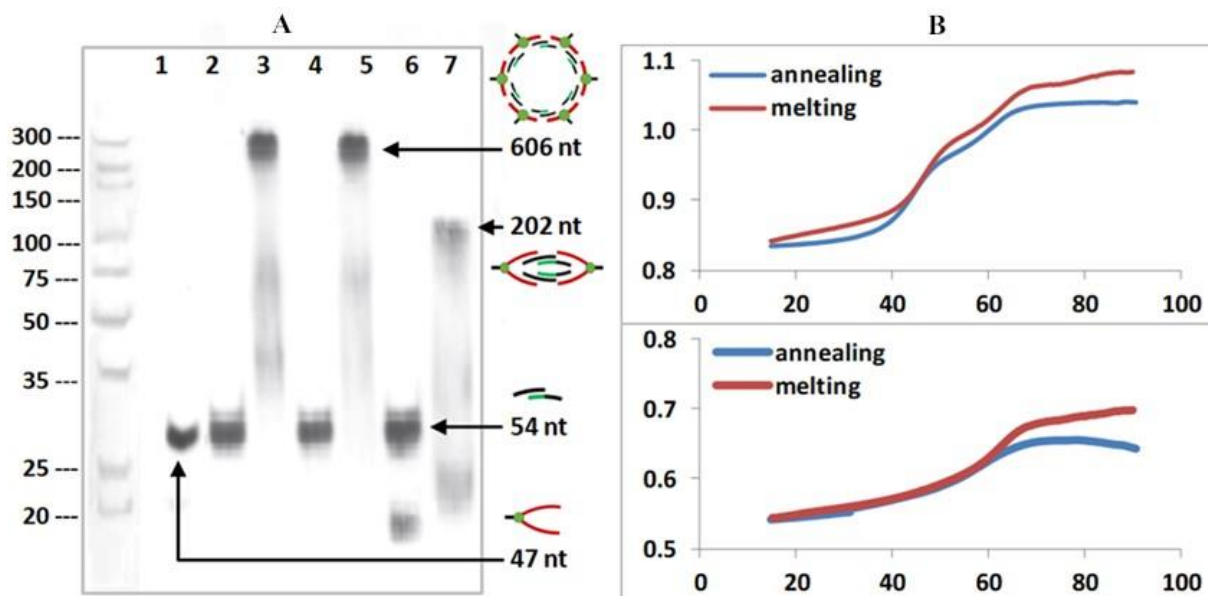


Rysunek 20. Synteza 1-hydroksymetylo-9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-yl)-1,2-dikarbocloso-dodekaboranu (**1**) (A). Synteza kompozytu klastru boru (**1**) i DNA-oligomerów o sekwencji anti-EGFR (B): i. p-formaldehyd, TBAF, THF; ii. H₂O; iii. fosfitylacja; iv. detrytylacja; v. sprzężanie; vi. utlenianie; vii. „capping”; viii. odłączenie od złoza i deprotekcja zasad nukleinowych.

W odróżnieniu od bloków budulcowych wykorzystanych do konstrukcji nanocząstek pierwszej generacji (Tabela 13) [95], do otrzymania bloków budulcowych drugiej generacji zastosowano pochodną klastru boru **1**, która posiada przyłączony do atomu węgla klastru podstawnik hydroksymetylowy zamiast podstawnika hydroksyetylowego do którego przyłączono wspomniany wyżej krótki łańcuch 3'-UmAmCm-5'. Ta zmiana związana jest z zastosowaniem innej metody syntezy bloków budulcowych nanocząstek drugiej generacji w porównaniu do pierwszej generacji. Dzięki nowej metodzie syntezy bloków budulcowych nanocząstek omija się długotrwały proces związany z bezpośrednim przyłączeniem klastru do złoza LCA-CPG. Ponadto każdy etap przyłączania DNA-oligomerów do oligofunkcjonalizowanego klastru boru opiera się na amidofosforynowej metodzie syntezy oligonukleotydów, która jest dobrze opisana w literaturze co pozwala na łatwe przeprowadzenie syntezy koniugatów klastrów boru i DNA-oligomerów nawet w laboratoriach, które nie są wysoce wyspecjalizowane w chemicznej syntezie DNA [99].

3.2. Składanie otrzymanych bloków budulcowych w nanocząstki drugiej generacji, badania fizykochemiczne i biologiczne.

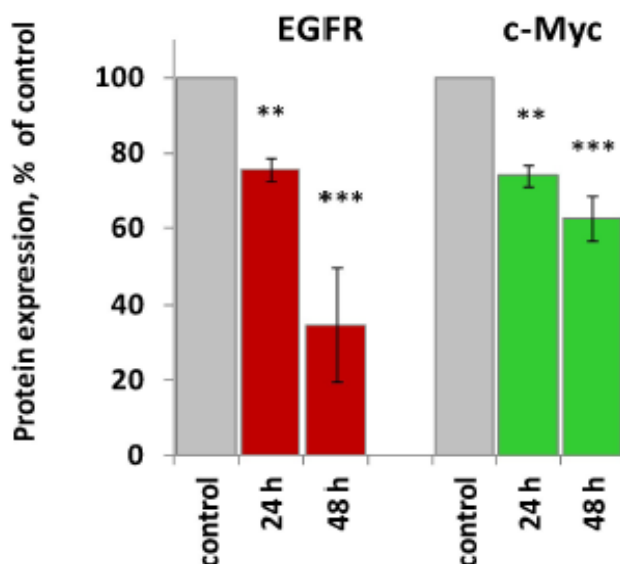
Szczegółowe procedury zarówno syntezy komponentów nanocząstek drugiej generacji, jak ich badań fizykochemicznych oraz badań biologicznych wyciszenia genów EGFR i c-MYC są opisane w Publikacji 2 stanowiącej podstawę niniejszej dysertacji, opublikowanej w *Chemistry – A European Journal* [9].



Rysunek 21. Analiza elektroforetyczna (PAGE) w warunkach natywnych otrzymanych nanocząstek oraz ich poszczególnych bloków budulcowych. Od lewej: 1) oligofunkcjonalizowana pochodna *orto*-karboranu posiadająca w pozycjach B₉ i B₁₂ klastra dwa 22-merowe łańcuchy oligonukleotydowe o sekwencji anty-EGFR, 2) dwuniciowy łącznik zawierający w sobie sekwencje anty-c-MYC, 3) utworzone nanocząstki anty-EGFR i anty-c-MYC, 4-7) Analogiczne bloki budulcowe zawierające w strukturze oligonukleotydów internukleotydowe wiązania tiofosforanowe (A). Krzywe mięknięcia utworzonych nanocząstek (wyżej) i dwuniciowego łącznika (niżej) (B) [9].

Nanocząstki drugiej generacji zostały otrzymane poprzez zmieszanie ze sobą w odpowiednich warunkach wymienionych wyżej bloków budulcowych w stosunku molowym 1:1:1. Proces składania śledzony był za pomocą elektroforezy w niedenaturującym żelu poliakrylamidowym (PAGE). Głównym produktem składania bloków budulcowych są nanocząstki zbudowane z około 300 par zasad (600 jednostek nukleotydów) DNA co odpowiada cyklicznym nanocząstkom, heksamerom zbudowanych z 6 kompozytów oligofunkcjonalizowanego *orto*-kraboranu i antysensowych anty-EGFR DNA-oligomerów oraz dwuniciowych łączników zawierających w jednej z nici sekwencje antysensowego oligonukleotydu skierowanego przeciw c-MYC (Rysunek 21A). Warto zwrócić uwagę na dwufazowy przebieg mięknięcia nanocząstek ilustrowany przez dwa punkty przegięcia

(Rysunek 21B, wyżej) zgodny z budowa nanocząstek składających się z dwu głównych dwuniciowych komponentów o różnych właściwościach.



Rysunek 22. Pomiar wyciszanie genów EGFR i c-MYC metodą wybarwienia wewnątrzkomórkowego docelowych białek, EGFR i c-MYC po 24 i 48 h przy stężeniu nanocząstek 100 μ M [9]

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 % (Rysunek 22). 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.

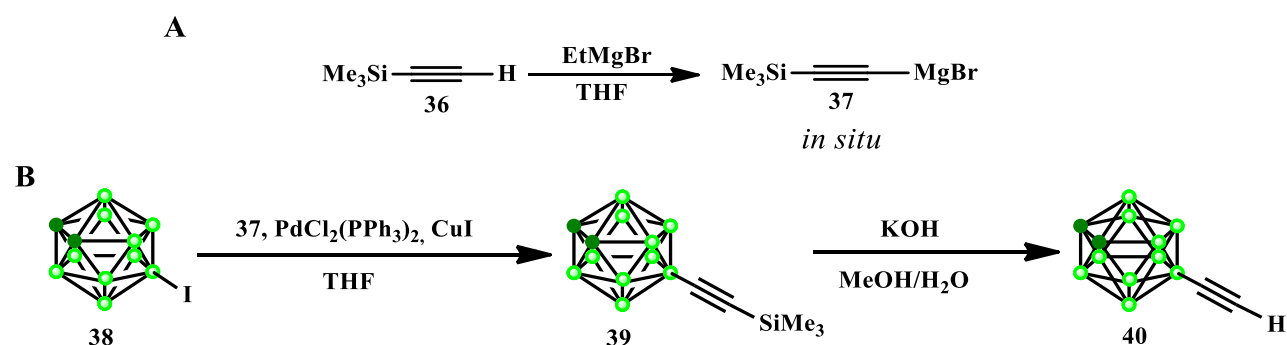
Na koniec chciałbym zwrócić uwagę, iż pomimo, że obecnie w praktyce klinicznej znajduje się już szesnaście leków oligonukleotydowych to wszystkie stosowane są w formie monoterapii, jeden cel biologiczny – jeden terapeutyczny kwas nukleinowy. W przypadku leków niskocząsteczkowych terapie wielolekowe ze względu na swoją skuteczność i zalety

takie jak lepsza kontrola lekooporności czy też możliwość stosowania poszczególnych terapeutyków w mniejszych dawkach i ograniczanie w ten sposób skutków ubocznych są od dawna z powodzeniem wykorzystywane. Badania nad możliwością terapii wielolekowych z wykorzystaniem terapeutycznych kwasów nukleinowych są również prowadzone, jednak zaproponowane przez nas rozwiązanie jest pierwszym w którym zastosowano pojedynczy czynnik, nanocząstkę, o podwójnym działaniu, zdolną do wyciszenia dwóch różnych genów co można określić jako przykład terapii wielolekowej (w tym przypadku dwulekowej) choć dotychczas *in vitro*.

4. Synteza i wstępne badania biologiczne analogów genisteiny zawierających w swojej strukturze klaster boru.

Prowadząc badania nad oligofunkcjonalizacją karboranów oraz metalokarboranów jako platform dla antysensowych DNA-oligonukleotydów zajmowałem się także 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) [3, 120, 121], oraz znajomość właściwości genisteiny jako selektywnego modulatora receptora estrogenowego ER_β [122] zainspirowały mnie do opracowania 5-etapowej syntezy analogów genisteiny, która w pozycji 3- układu izoflawonu posiada podstawnik 1,2-dikarba-*closo*-dodekarboran-9-etynylowy.

4.1. Synteza 9-etynyl-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu.



Schemat 22. Synteza odczynnika Grignarda, bromku trimetylosililoacetylenomagnezowego (40) (A) i synteza 9-etynyl-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (40) (B).

Badania rozpocząłem od otrzymania związków 9-jodo-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (**38**) oraz bromku trimetylosililoacetylenomagnezowego (**37**) opisanych w literaturze (**Schemat 22**) [123-125]. Pierwszym etapem syntezy było przyłączenie do atomu boru B₉ *orto*-karboranu atomu jodu. 9-Jodo-1,2-dikarba-*closo*-dodekarboran (**38**) otrzymałem wykorzystując tą samą metodę co w przypadku syntezy 9,12-dijodo-pochodnych *orto*-karboranu opisanych wyżej, z tą różnicą że zastosowałem pół równoważnika molowego jodu względem substratu [123].

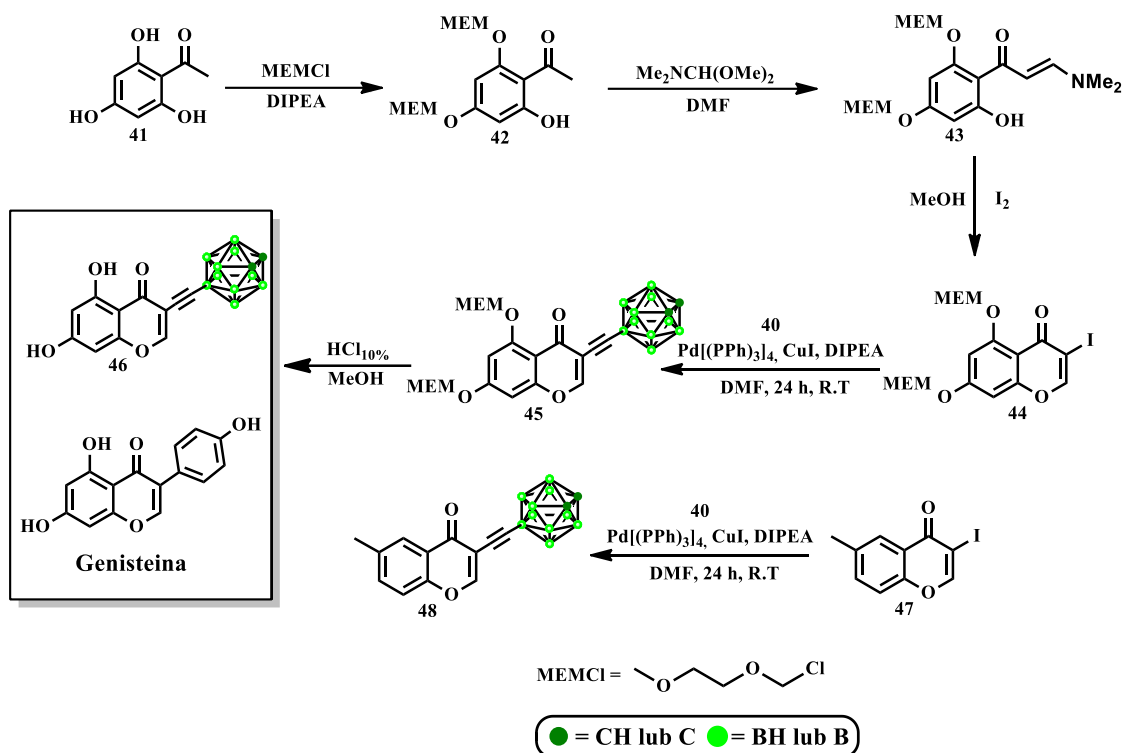
Syntezę bromku trimetylosililoacetylenomagnezowego (**37**) przeprowadziłem w reakcji trimetylosililoacetyleny z bromkiem etylomagnezowym stosując jako rozpuszczalnik THF na podstawie metody opisanej w literaturze (**Schemat 22A**) [124].

Reakcję sprzęgania Kumady związków **37** z **38** przeprowadziłem przy użyciu chlorku bis(trifenylfosfino)palladu (II) jako katalizatora palladowego oraz jodku miedzi (CuI) stosując jako rozpuszczalnik bezwodny, nasycony argonem THF wykorzystując kombinację metody opisanej w literaturze wraz z metodą syntezy 9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (**11**) opisaną w rozdziale 2.1.1. (**Schemat 22B**) [125]

9-Etynylo-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboran (**40**) otrzymałem na podstawie metody opisanej w literaturze w reakcji 9-((trimetylosililo)-etynylo)-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranu (**39**) z wodorotlenkiem potasu stosując 80% roztwór metanolu (v/v) (**Schemat 22B**) [125].

4.2. Synteza 3-(1,2-dikarba-*closo*-dodekaboran-9-etynylo)-5,7-dihydroksy-4H-chromen-4-onu (**46**).

Syntezę związku (**46**) będącego karboranylowym analogiem genisteiny przeprowadziłem analogicznie do chemicznej syntezy genisteiny opisanej w literaturze [126]. 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 (**44**) z otrzymanym 9-etynylo-1,2-dikarba-*closo*-dodekaboranem (**40**) zamiast sprzęgania Suzuki-Miyaury z kwasem 4-hydroksyfenyloborowym, które prowadzi do otrzymania genisteiny [126].



Schemat 23. Synteza analogów genisteiny modyfikowanych klasterem boru: 3-(1,2-dikarba-*closo*-dodekarboran-9-etynilo)-5,7-dihydroksy-4H-chromen-4-onu (**46**) i 6-metylo-3-(1,2-dikarba-*closo*-dodekarboran-9-etynilo)-4H-chromen-4-onu (**48**).

Wprowadzenie dwóch grup ochronnych 2-metoksyetoksymetylowych grup hydroksylowych w pozycjach 2- i 4- 2,4,6-trihydroksyacetofenonu (**41**) przeprowadziłem w reakcji z chlorkiem 2-metoksyetoksymetylu (MEMCl) stosując jako zasadę diizopropylaminy (DIPEA) (**Schemat 23**). Związek **41** rozpuściłem w bezwodnym chlorku metylenu, Mieszaninę umieściłem w łaźni lodowej i wkropliłem dwuipółkrotny równoważnik molowy DIPEA względem substratu. Po 20 minutach dodałem chlorku 2-metoksyetoksymetylu MEMCl w takiej samej ilości molowej jak DIPEA. Po 20 minutach usunąłem łaźnię chłodzącą i pozwoliłem reakcji ogrzać się do temperatury pokojowej. Surową mieszaninę reakcyjną przemyłem wodą i ekstrahowałem chloroformem. Warstwy organiczne suszyłem nad MgSO₄. Produkt oczyściłem za pomocą chromatografii kolumnowej stosując gradient octan etylu w heksanie. Produkt **42** otrzymałem z wydajnością 50%.

3-(Dimetyloamino)-1-(2-hydroksy-4,6-bis((2-metoksyetoksy)metoksy)fenyl)prop-2-en-1-onu (**43**) otrzymałem w reakcji kondensacji **42** z N,N-dimetylo-dimetoksymetyloaminą. Związek **42** rozpuściłem w DMF. Mieszaninę umieściłem w łaźni grzewczej w temperaturze 75 °C i wkropliłem pięciokrotny równoważnik molowy N,N-dimetylo-dimetoksymetyloaminy względem substratu. Reakcję prowadziłem przez 4,5 h kontrolując jej przebieg za pomocą TLC. Po zakończeniu reakcji do mieszaniny dodałem wodę, po czym mieszaninę ekstrahowałem

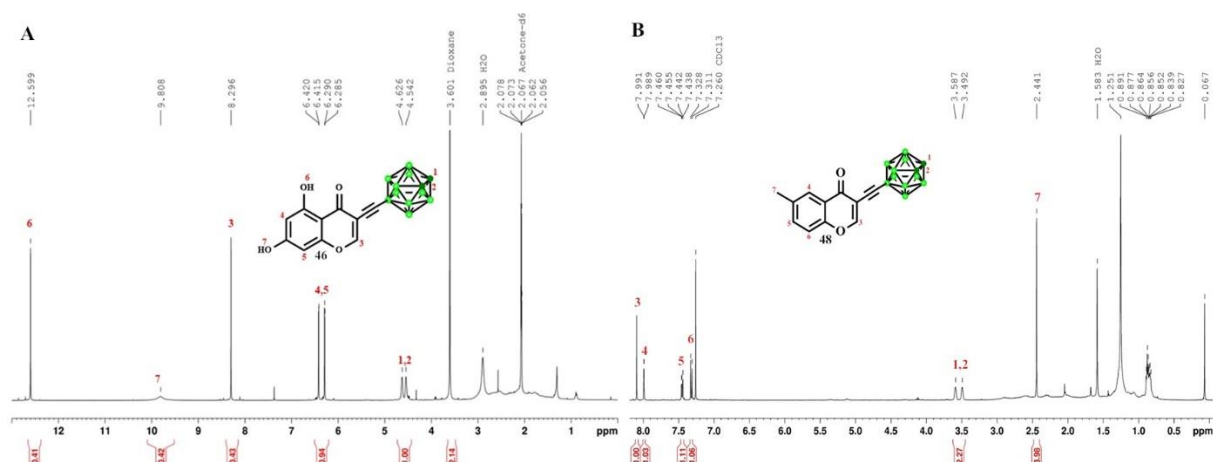
octanem etylu. Surowy produkt naniosłem na kolumnę chromatograficzną i eluowałem octanem etylu otrzymując czysty produkt **43** z wydajnością 85%.

Syntezę 3-jodo-5,7-bis((2-metoksyetoksy)metoksy)-4H-chromen-4-onu (**44**) przeprowadziłem w reakcji cyklizacji związku **43** przy użyciu jodu pierwiastkowego (I₂) w metanolu. Związek **43** wraz z I₂ rozpuściłem w bezwodnym metanolu. Reakcję prowadziłem przez 24 h w warunkach standardowych kontrolując jej przebieg za pomocą TLC. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowałem i dodałem 5% roztworu tiosiarczanu sodu w celu usunięcia nadmiarowego jodu, po czym mieszaninę ekstrahowałem chloroformem. Produkt oczyściłem za pomocą preparatywnego TLC stosując jako eluent 100% octanu etylu otrzymując produkt **44** z wydajnością 87%.

3-(1,2-Dikarba-*closo*-dodekarboran-9-etynylo)-5,7-bis((2-metoksyetoksy)metoksy)-4H-chromen-4-on (**45**) otrzymałem na drodze sprzęgania Sonogashiry związków **44** i **40**. Związki **44** i **40** wraz z katalizatorem palladowym Pd(PPh₃)₄ oraz jodkiem miedzi CuI rozpuściłem w bezwodnym, nasyconym argonem DMF. Po 20 minutach dodałem DIPEA. Reakcję prowadziłem przez 24 h kontrolując jej przebieg za pomocą TLC. Po zakończeniu reakcji mieszaninę wylałem na schłodzony 0,1 M bufor fosforanowy po czym mieszaninę ekstrahowałem octanem etylu. Produkt oczyściłem za pomocą preparatywnej TLC stosując jako eluent 100% octanu etylu otrzymując związek **45** z wydajnością 70%.

3-(1,2-Dikarba-*closo*-dodekarboran-9-etynylo)-5,7-dihydroksy-4H-chromen-4-on (**46**) otrzymałem w wyniku usunięcia grup ochronnych MEM w warunkach kwaśnych [127]. Związek **46** rozpuściłem w metanolu i dodałem 10 procentowy roztwór odgazowanego kwasu solnego. Mieszaninę ogrzałem do 70 °C i reakcję prowadziłem przez 1 h w atmosferze argonu kontrolując jej przebieg za pomocą TLC. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodałem wodę, mieszaninę ekstrahowałem octanem etylu. Produkt oczyściłem za pomocą dwóch następujących po sobie chromatografii kolumnowych najpierw stosując jako eluent gradient octanu etylu w heksanie, a potem gradient eteru dietylowego w heksanie. Produkt **46** otrzymałem z wydajnością 95%.

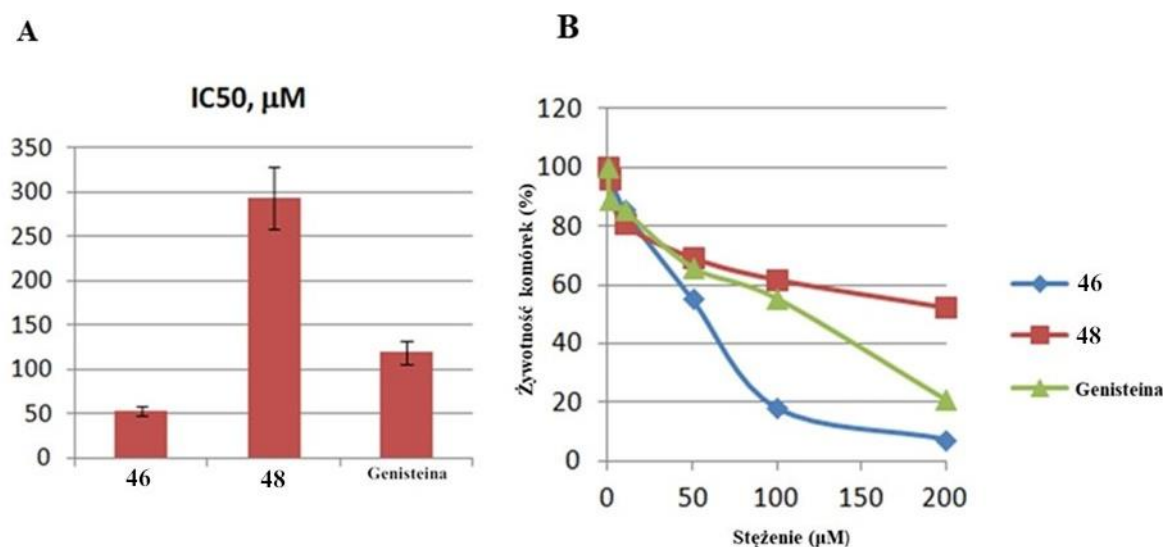
Dodatkowo przeprowadziłem syntezę 6-metylo-3-(1,2-dikarba-*closo*-dodekarboran-9-etynylo)-4H-chromen-4-onu (**48**) w reakcji dostępnego handlowo 6-metylo-4H-chromen-4-onu (**47**) z 9-etynylo-1,2-dikarba-*closo*-dodekarboranem (**40**) metodą analogiczną do metody opisanej w przypadku syntezy **46**. Oba analogi gensiteiny zostały w pełni scharakteryzowane za pomocą spektroskopii ¹H-, ¹³C-, ¹¹B-NMR, spektroskopii w podczerwieni IR, spektroskopii UV-VIS, HPLC oraz spektrometrii masowej (ESI) MS.



Rysunek 23. Widma $^1\text{H-NMR}$ analogów genisteiny: **46** (A) i **48** (B).

4.3. Wstępne badania biologiczne otrzymanych analogów 46 i 48 genisteiny.

Wstępne badania biologiczne otrzymanych analogów **46** i **48** zostały wykonane przez dr Katarzynę Bednarską-Szczepaniak z Pracowni Chemii Medycznej Instytutu Biologii Medycznej PAN. Cytotoksyczność związków została zbadana metodą MTT na komórkach raka wątroby Huh70.



Rysunek 24. Żywotność komórek raka wątroby Huh70 traktowanych analogami genisteiny **46** i **48** wraz z wyznaczonym parametrem IC_{50} .

Otrzymane analogi genisteiny modyfikowane klasterem boru wyraźnie różnią cytotoksycznością w stosunku do linii komórkowej raka wątroby Huh70. Warto przy tym zauważyć, że pochodna **46** ($\text{IC}_{50} = 53 \pm 4.6 \mu\text{M}$) jest bardziej toksyczna od genisteiny ($\text{IC}_{50} = 119 \pm 13 \mu\text{M}$) i równocześnie znacznie bardziej toksyczna od pochodnej **48** ($\text{IC}_{50} = 283 \pm 26$

μM). Różnice te mogą nabrać dodatkowego znaczenia w przypadku zaobserwowania zróżnicowanego powinowactwa genisteiny i pochodnych **46** i **48** w stosunku do receptorów α i β -estrogenu. Badania te są w toku w ramach współpracy z dr Geert A. Daudey z Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Disease (CiMUS) University of Santiago de Compostela.

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 klastra 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*-dodekaborano)-*commo*-3,3'-kobaltanu (III) umożliwiających 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, wykorzystanej z powodzeniem do otrzymania funkcjonalnych nanocząstek drugiej generacji, kompozytów klastrów boru i terapeutycznych kwasów nukleinowych.

- Opracowanie oryginalnej metody funkcjonalizacji metalokarboranów na drodze alkirowania na atomie siarki cyklicznego tiofosforanu bis(8,8'-dihydroksy-1,2-dikarbocloso-dodekaborano)-*commo*-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-oksapentoksy)-[1,1'-di(2-O-trytyloksyetylo)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu] (III), wykorzystanego do otrzymania funkcjonalnych nanocząstek trzeciej generacji, kompozytów klastrów boru i terapeutycznych kwasów nukleinowych.
- Wykorzystanie $^{11}\text{B-NMR}$ i $^1\text{H-NMR}$ 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 klastrami boru.

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

BIBLIOGRAFIA

- [1] Fischli, W.; Leukart, O.; Schwyzer, R. Hormone-receptor interactions. Carboranylalanine (Car) as a phenylalanine analogue: reactions with chymotrypsin. *Helv. Chim. Acta.* **1977**, *60*, 959–963.
- [2] Esher, E.; Guillemette, G.; Leukart, O.; Regoli, D. Pharmacological properties of two analogues of angiotensin II containing carboranylalanine (car). *Eur J Pharmacol.* **1980**, *66*, 267–272.
- [3] 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.
- [4] Olejniczak, A.B.; Koziółkiewicz, M.; Leśnikowski Z.J. Carboranyl oligonucleotides: 4. Synthesis, and physicochemical studies of oligonucleotides containing 2'-O-(o-carboran-1-yl)methyl group. *Antisense Nucl. Acid Drug Develop.* **2002**, *12*, 79–94.
- [5] Leśnikowski, Z. J. Challenges and Opportunities for the Application of boron clusters in drug design. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (17), 7738–7758.
- [6] Stephenson, M. L.; Zamecnik, P. C. Inhibition of rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1978**, *75*, 285–288.
- [7] 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.
- [8] Egli, M.; Manoharan, M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, 2529–2573.
- [9] 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.
- [10] DeFrancesco, H.; Dudley, J.; Coca, A. Boron Chemistry: An Overview w *Boron Reagents in Synthesis*; ACS Symposium Series; American Chemical Society, **2016**, *1236*, 1–25.
- [11] Grabowski, S.J.; Borowce jako centra kwasów Lewisa w oddziaływaniach międzycząsteczkowych – Porównanie z wiązaniami wodorowymi. *Wiad. Chem.* **2017**, *71*, 7–8.
- [12] Grimes, R. N. *Carboranes*. Elsevier: Boston, **2016**.
- [13] Hoffmann, R.; Lipscomb, W.N. Theory of Polyhedral Molecules. III. Population analyses and reactivities for the carboranes. *Chem. Phys.* **1962**, *36*, 3489–3493.
- [14] Marfavi, A.; Kavianpour, P.; Rendina, L.M. Carboranes in drug discovery, chemical biology and molecular imaging. *Nat. Rev. Chem.* **2022**, *6*, 486–504.
- [15] Olejniczak, A. Karborany i Metalokarborany Część I. Karborany. *Wiad. Chem.* **2004**, *58*, 895–913.
- [16] Williams, R. E.; The polyborane, carborane, carbocation continuum: architectural patterns. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 177–207.
- [17] Poater, J.; Solà, M.; Viñas, C.; Teixidor, F. Hückel's rule of aromaticity categorizes aromatic *closo* boron hydride clusters. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 7437–7443.
- [18] Heying, T.L.; Ager, Jr. J. W.; Clark, S.L.; Mangold, D.J.; Goldstein, H.L.; Hillman, M.; Polak, R.J.; Szymanski, J.W.; A new series of organoboranes. I. Carboranes from the reaction of decaborane with acetylenic compounds. *Inorg. Chem.* **1963**, *2*, 1089–1092.
- [19] Fein, M. M.; Bobinski, J.; Mayes, N.; Schwartz, N.; Cohen, M.S. Carboranes. I. The preparation and chemistry of 1-isopropenylcarborane and its derivatives (a new family of stable *closo*-boranes). *Inorg. Chem.* **1963**, *2*, 1111–1115.

- [20] Valliant, J. F.; Guenther, K. J.; King, A. S.; Morel, P.; Schaffer, P.; Sogbein, O. O.; Stephenson, K. A. The medicinal chemistry of carboranes. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 173–230.
- [21] Turner, A. R.; Robertson, H. E.; Borisenko, K. B.; Rankin, D. W. H.; Fox, M. A. Gas-phase electron diffraction studies of the icosahedral carboranes, ortho-, meta- and para-C₂B₁₀H₁₂. *Dalton Trans.* **2005**, *7*, 1310–1318.
- [22] Scholz, M.; Hey-Hawkins, E. Carboranes as pharmacophores: properties, synthesis, and application strategies. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7035–7062.
- [23] Fauchère, J. L.; Do, K. Q.; Jow, P. Y. C.; Hansch, C. Unusually strong lipophilicity of ‘fat’ or ‘super’ amino-acids, including a new reference value for glycine. *Experientia* **1980**, *36*, 1203–1204.
- [24] *Biological correlations—the Hansch approach*, Van Valkenburg, W., Ed. w *Advances in Chemistry*, American Chemical Society: Washington, D. C., **1974**, *114*.
- [25] Schwyzer, R.; Do, K. Q.; Eberle, A. N.; Fauchère, J. Synthesis and biological properties of enkephalin-like peptides containing carboranylalanine in place of phenylalanine. *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 2078–2083.
- [26] Yamamoto, K.; Endo, Y. Utility of boron clusters for drug design. Hansch–Fujita hydrophobic parameters π of dicarba-*closo*-dodecaboranyl groups. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2389–2392.
- [27] Oliva, J. M.; Schleyer, P. V. R.; Aullón, G.; Burgos, J. I.; Fernández-Barbero, A.; Alkorta, I. On the electronic structure and stability of icosahedral R-X₂Z₁₀H₁₂ and Z₁₂H₁₂²⁻ clusters; r = {ortho, meta, para}, X = {C, Si}, Z = {B, Al}. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5101–5108.
- [28] Kalinin, V. N.; Ol’shevskaya, V. A. Some aspects of the chemical behavior of icosahedral carboranes. *Russ. Chem. Bull.* **2008**, *57*, 815–836.
- [29] Bregadze, V. I. Dicarba-*closo*-dodecaboranes C₂B₁₀H₁₂ and their derivatives. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 209–223.
- [30] Plešek, J.; Heřmánek S. Experimental evaluation of charge distribution on particular skeletal atoms in icosahedral carboranes by means of HS-derivatives. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1979**, *44*, 24–33.
- [31] Grunwald, E.; Berkowitz, B. J. The Measurement and correlation of acid dissociation constants for carboxylic acids in the system ethanol-water. Activity coefficients and empirical activity functions. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4939–4944.
- [32] Davidson, D. G.; Hibbert, T. G.; Howard, J. A. K.; Mackinnon, A.; Wade, K. Definitive crystal structures of *ortho*-, *meta*- and *para*-carboranes: supramolecular structures directed solely by C–H···O hydrogen bonding to hmpa (hmpa = hexamethylphosphoramide). *Chem. Commun.* **1996**, 2285–2286.
- [33] Harakas, G.; Vu, T.; Knobler, B. C.; Hawthorne, M. F. Synthesis and crystal structure of 9,12-bis-(4-acetylphenyl)-1,2-dicarbadoecaborane(12): Self-assembly involving intermolecular carboranyl C–H hydrogen bonding. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6405–6406.
- [34] Lee, H.; Knobler, C. B.; Hawthorne, M. F. Supramolecular self-assembly directed by carborane C–H···F interactions. *Chem. Commun.* **2000**, 2485–2486.
- [35] Barberà, G.; Viñas, G.; Teixidor, F.; Rosair, G. M.; Welch A. J. Self-assembly of carborane molecules via C–H···I hydrogen bonding: the molecular and crystal structures of 3-I-1,2-*closo*-C₂B₁₀H₁₁. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**, 3647–3648.
- [36] Baranowski, D.; Mieczkowski, A.; Trzybiński, D.; Woźniak, K.; Bednarska-Sczepaniak, K.; Gdaniec, Z.; Leśnikowski Z. J. Insights into molecular structure of adenosine-boron cluster conjugates and their phenyl isomers as adenosine receptor ligands: Nuclear

- magnetic resonance, crystallographic and computational studies. *J. Mol. Struct.* **2023**, *1274*, 134588.
- [37] Ohta, K.; Yamazaki, H.; Endo, Y. NMR Study of 1-aryl-1,2-dicarba-*closo*-dodecaboranes: intramolecular C–H···O hydrogen bonding in solution. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1937–1940.
- [38] Silverstein, M. R.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*. John Wiley & Sons In. 2005
- [39] Custelcean, R.; Jackson, J. E. Dihydrogen Bonding: Structures, energetics, and dynamics. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1963–1980.
- [40] Grabowski, S. J. Wiązanie wodorowe i inne oddziaływania typu kwas Lewisa-zasada Lewisa. *Wiad. Chem.* **2011**, *65*, 975–1001.
- [41] Dou, J.; Su, F.; Nie, Y.; Li, D.; Wang D. Self-assembled 2D supramolecular networks of copper(I) carborane complexes through C–H···H–B dihydrogen bonding interactions. *Dalton Trans.* **2008**, *31*, 4152–4156.
- [42] Pecina, A.; Lepšík, M.; Řezáč, J.; Brynda, J.; Mader, P.; Řezáčová, P.; Hobza, P.; Fanfrlík, J. QM/MM Calculations reveal the different nature of the interaction of two carborane-based sulfamide inhibitors of human carbonic anhydrase II. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 16096–16104.
- [43] Fanfrlík, J.; Lepšík, M.; Horinek, D.; Havlas, Z.; Hobza, P. Interaction of carboranes with biomolecules: formation of dihydrogen bonds. *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 1100–1105.
- [44] Fanfrlík, J.; Hnyk, D.; Lepšík, M.; Hobza, P. Interaction of heteroboranes with biomolecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 2085–2093.
- [45] Hermansson, K.; Wójcik, M.; Sjöberg, S. *o*-, *m*-, and *p*-Carboranes and their anions: Ab Initio calculations of structures, electron affinities, and acidities. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 6039–6048.
- [46] Sivaev, I. B.; Anufriev, S. A.; Shmalko, A. V. How substituents at boron atoms affect the CH-acidity and the electron-withdrawing effect of the *ortho*-carborane cage: A close look on the ¹H NMR Spectra. *Inorganica Chim. Acta* **2023**, *547*, 121339.
- [47] Andrews, J. S.; Zayas, J.; Maitland Jr. J. 9-Iodo-*o*-carborane. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 3715–3716.
- [48] Atkins, P.; Jones, L.; Laverman, L. *Chemical principles: the quest for insight*. W.H Freeman and Company: U.S.A **2007**.
- [49] Marshall, W. J.; Young, R. J.; Grushin, V. V. Mechanistic features of boron–iodine bond activation of B–iodocarboranes. *Organometallics* **2001**, *20*, 523–533.
- [50] Zheng, Z.; Jiang, W.; Zinn, A. A.; Knobler, C. B.; Hawthorne, M. F. Facile electrophilic iodination of icosahedral carboranes. Synthesis of carborane derivatives with boron-carbon bonds via the palladium-catalyzed reaction of diiodocarboranes with grignard reagents. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2095–2100.
- [51] Jiang, W.; Knobler, C. B.; Curtis, C. E.; Mortimer, M. D.; Hawthorne, M. F. Iodination reactions of icosahedral *para*-carborane and the synthesis of carborane derivatives with boron-carbon bonds. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3491–3498.
- [52] Maurer, J. L.; Serino, A. J.; Hawthorne M. F. Hydrophilically augmented glycosyl carborane derivatives for incorporation in antibody conjugation reagents. *Organometallics* **1988**, *7*, 2519–2524.
- [53] Zakharkin, L. I.; Kirillova, V. S. Cleavage of *o*-carboranes to (3)-1,2-dicarbaundecarborates by amines. *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* **1975**, *24*, 2484–2486.
- [54] Tomita, H.; Luu, H.; Onak, T. Cage opening of parent *closo* cage carboranes with fluoride ion: formation of 5-fluoro-hexahydro-*nido*-2,4-dicarbahexaborate(1-) ([5-F-*nido*-2,4-C₂B₄H₆]-). *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 812–815.

- [55] Zakharkin, L. I.; Kalinin, V. N.; Gedymin, V. V. Synthesis and some reactions of 3-amino-*o*-carboranes. *J. Organomet. Chem.* **1969**, *16*, 371–379.
- [56] Kasar, R. A.; Knudsen, G. M.; Kahl, S. B. Synthesis of 3-amino-1-carboxy-*o*-carborane and an improved, general method for the synthesis of all three C-amino-C-carboxycarboranes. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 2936–2940.
- [57] Li, J.; Logan, C. F.; Jr, M. J. Simple syntheses and alkylation reactions of 3-iodo-*o*-carborane and 9,12-diiodo-*o*-carborane. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 4868–4870.
- [58] Roscoe, J. S.; Kongpricha, S.; Papetti, S. Icosahedral Carboranes. XIV. Preparation of boron-substituted carboranes by boron-insertion reaction. *Inorg. Chem.* **1970**, *9*, 1561–1563.
- [59] Hawthorne, M. F.; Wegner, P. A. Reconstruction of the 1,2-dicarboclosododecaborane(12) structure by boron-atom insertion with (3)-1,2-dicarbollide ions. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 896–901.
- [60] Plumley, J. A.; Evanseck, J. D. Periodic trends and index of boron Lewis acidity. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 5985–5992.
- [61] Jupp, A. R.; Johnstone, T. C.; Stephan, D. W. Improving the global electrophilicity index (GEI) as a measure of Lewis acidity. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 14764–14771.
- [62] Gomez, F. A.; Hawthorne, M. F. A Simple route to C-monosubstituted carborane derivatives. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1384–1390.
- [63] 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.
- [64] Teixidor, F.; Barberà, G.; Viñas, C.; Sillanpää, R.; Kivekäs, R. Synthesis of boron-iodinated *o*-carborane derivatives. Water stability of the periodinated monoprotic salt. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 3496–3498.
- [65] Puga, A. V.; Teixidor, F.; Sillanpää, R.; Kivekäs, R.; Arca, M.; Barberà, G.; Viñas, C. From mono- to poly-substituted frameworks: A way of tuning the acidic character of C_c-H in *o*-carborane derivatives. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9755–9763.
- [66] Hawthorne, M. F. Chemistry of the polyhedral species derived from transition metals and carboranes. *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 281–288.
- [67] Shriver, D.; Weller, M.; Overton, T.; Rourke, J.; Armstrong, F. *Inorganic chemistry*. Oxford University Press: Oxford, **2014**.
- [68] Olejniczak, A. Karborany i Metalokarborany Część II. Metalokarborany. *Wiad. Chem.* **2005**, *59*, 213–229
- [69] Bauduin, P. *Metallacarboranes: synthesis of boron-heteroatom derivatives and applications in energy and magnetism*. Univeristat Autònoma De Barcelona, **2020**.
- [70] Bauduin, P.; Prevost, S.; Farràs, P.; Teixidor, F.; Diat, O.; Zemb, T. A theta-shaped amphiphilic cobaltabisdicarbollide anion: transition from monolayer vesicles to micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5298–5300.
- [71] Borodinsky, L.; Sinn, E.; Grimes, R. N. Crystal and molecular structure of (C₂H₅)₃NH⁺[Co(1,2-C₂B₉H₁₁)₂]. *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 1686–1689.
- [72] Sivaev, I. B.; Bregadze, V. I. Chemistry of cobalt bis(dicarbollides). A Review. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1999**, *64*, 783–805.
- [73] Juárez-Pérez, E. J.; Núñez, R.; Viñas, C.; Sillanpää, R.; Teixidor, F. The role of C–H···H–B interactions in establishing rotamer configurations in metallabis(dicarbollide) systems. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *16*, 2385–2392.
- [74] Plešek, J.; Baše, K.; Mareš, F.; Hanousek, F.; Štíbr, B.; Heřmánek, S. Potential uses of metallocarborane sandwich anions for analysis, characterization and isolation of various cations and organic bases. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1984**, *49*, 2776–2789.

- [75] Tarrés, M.; Viñas, C.; González-Cardoso, P.; Hänninen, M. M.; Sillanpää, R.; Ďord'ovič, V.; Uchman, M.; Teixidor, F.; Matějček, P. Aqueous self-assembly and cation selectivity of cobaltabisdicarbollide dianionic dumbbells. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6786–6794.
- [76] 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.
- [77] Pazderová, L.; Tüzün, E. Z.; Baval, D.; Litecká, M.; Fojt, L.; Grüner, B. Chemistry of carbon-substituted derivatives of cobalt bis(dicarbollide)(1-) ion and recent progress in boron substitution. *Molecules* **2023**, *28*, 6971.
- [78] Grüner, B.; Kugler, M.; El Anwar, S.; Holub, J.; Nekvinda, J.; Baval, D.; Růžičková, Z.; Pospíšilová, K.; Fábry, M.; Král, V.; Brynda, J.; Řezáčová, P. Cobalt bis(dicarbollide) alkylsulfonamides: potent and highly selective inhibitors of tumor specific carbonic anhydrase IX. *ChemPlusChem* **2021**, *86*, 352–363.
- [79] El Anwar, S.; Pazderová, L.; Baval, D.; Bakardjiev, M.; Růžičková, Z.; Horáček, O.; Fojt, L.; Kučera, R.; Grüner, B. Structurally rigidified cobalt bis(dicarbollide) derivatives, a chiral platform for labelling of biomolecules and new materials. *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 2572–2575.
- [80] Plešek, J.; Heřmánek, S.; Baše, K.; Todd, L. J.; Wright, W. F. Zwitterionic compounds of the 8,8'-X(C₂B₉H₁₀)₂Co series with monoatomic O, S, Se, Te, N bridges between carborane ligands. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1976**, *41*, 3509–3515.
- [81] Mátel, L.; Macášek, F.; Rajec, P.; Heřmánek, S.; Plešek, J. B-halogen derivatives of the bis(1,2-dicarbollyl)cobalt(III) anion. *Polyhedron* **1982**, *1*, 511–519.
- [82] Bühl, M.; Hnyk, D.; Macháček, J. Computational Study of structures and properties of metallaboranes: cobalt bis(dicarbollide). *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4109–4120.
- [83] Dash, B. P.; Satapathy, R.; Swain, B. R.; Mahanta, C. S.; Jena, B. B.; Hosmane, N. S. Cobalt bis(dicarbollide) anion and its derivatives. *J. Organomet. Chem.* **2017**, *849–850*, 170–194.
- [84] Jelinek, T.; Štibr, B.; Mareš, F.; Plešek, J.; Heřmánek, S. Halogenation of 4,5-dicarbaborachno-nonaborane(13),4,5-C₂B₇H₁₃. *Polyhedron* **1987**, *6*, 1737–1740.
- [85] Plešek, J.; Heřmánek, S.; Franken, A.; Císařová, I.; Nachtigal, C. Dimethyl sulfate induced nucleophilic substitution of the [bis(1,2-dicarbollido)-3-cobalt(1-)]ate ion. Syntheses, properties and structures of its 8,8'-μ-sulfato, 8-phenyl and 8-dioxane derivatives. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1997**, *62*, 47–56.
- [86] Teixidor, F.; Pedrajas, J.; Rojo, I.; Viñas, C.; Kivekäs, R.; Sillanpää, R.; Sivaev, I.; Bregadze, V.; Sjöberg, S. Chameleonic capacity of [3,3'-Co(1,2-C₂B₉H₁₁)₂] in coordination. Generation of the highly uncommon S(thioether)-Na bond. *Organometallics* **2003**, *22*, 3414–3423.
- [87] Olejniczak, A. B.; Plešek, J.; Leśnikowski, Z. J. Nucleoside–metallacarborane conjugates for base-specific metal labeling of DNA. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 311–318.
- [88] Plešek, J.; Grüner, B.; Báča, J.; Fusek, J.; Císařová, 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.
- [89] Plešek, J.; Grüner, B.; Císařová, 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.
- [90] Horáček, O.; Dhaubhadel, U.; Holub, J.; Grüner, B.; Armstrong, D. W.; Kučera, R. Employment of chiral columns with superficially porous particles in chiral separations of

- cobalt Bis (dicarbollide) and *nido*-7,8-C₂B₉H₁₂(1-) derivatives. *Chirality* **2023**, *35*, 937–951.
- [91] Horáček, O.; Papajová-Janetková, M.; Grüner, B.; Lochman, L.; Štěrbová-Kovaříková, P.; Vespalec, R.; Kučera, R. The first chiral HPLC separation of dicarba-*nido*-undecarborate anions and their chromatographic behavior. *Talanta* **2021**, *222*, 121652.
- [92] Grüner, B.; Cisařová, I.; Franken, A.; Plešek, J. Resolution of the [6,6'-μ-(CH₃)₂P-(1,7-(C₂B₉H₁₀)₂)-2-Co] bridged cobaltacarborane to enantiomers pure by chiral HPLC, circular dichroism spectra and absolute configurations by X-Ray diffraction. *Tetrahedron Asymmetry* **1998**, *9*, 79–88.
- [93] Plešek, J. The age of chiral deltahedral borane derivatives. *Inorganica Chim. Acta* **1999**, *289* (1–2), 45–50.
- [94] 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.
- [95] Kaniowski, D.; Ebenryter-Olbinska, 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.
- [96] 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.
- [97] Batsanov, A. S.; Fox, M. A.; Howard, J. A. K.; Hughes, A. K.; Johnson, A. L.; Martindale, S. J. 9,12-Diiodo-1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane(12). *Acta Crystallogr. C* **2003**, *59*, 74–76.
- [98] van den Berg, R. J. B. H. N.; Korevaar, C. G. N.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. Effective, high-yielding, and stereospecific total synthesis of d-erythro-(2R,3S)-sphingosine from d-ribo-(2S,3S,4R)-phytosphingosine. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5699–5704.
- [99] T. Brown, D. J. S. Brown w *Oligonucleotides and analogues. A Practical Approach*. Ed.: F. Eckstein, IRL Press: Oxford, **1991**, 1–24.
- [100] 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.
- [101] Śmiałkowski, K.; Bednarska-Szczepaniak, K.; Kulik, K.; Suwara, J.; Grüner, B.; Nawrot, B.; Leśnikowski Z.J. Synthesis of DNA-metallacarborane composites and assembly into functional nanoparticles with anti-EGFR gene silencing activity, **2024**, w przygotowaniu.
- [102] Sivaev, I. B.; Bregadze, V. I. Lewis acidity of boron compounds. *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *270–271*, 75–88.
- [103] Heseck, D.; Lee, M.; Noll, B. C.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. Complications from dual roles of sodium hydride as a base and as a reducing Agent. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2567–2570.
- [104] Chamberlin, R. M.; Scott, B. L.; Melo, M. M.; Abney, K. D. Butyllithium deprotonation vs alkali metal reduction of cobalt dicarbollide: A new synthetic route to C-substituted derivatives. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 809–817.
- [105] Nekvinda, J.; Švehla, J.; Cisařová, 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.




- [106] Sardo, C.; Janczak, S.; Leśnikowski, Z. J. Unusual resistance of cobalt bis dicarbollide phosphate and phosphorothioate bridged esters towards alkaline hydrolysis: the “Metallacarborane Effect.” *J. Organomet. Chem.* **2019**, *896*, 70–76.
- [107] Garegg, P. J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Stroemberg, R. Nucleoside Hydrogenphosphonates w *Oligonucleotide Synthesis*. *Chem. Informationsdienst* **1986**, *17*, 168-169.
- [108] Stawinski, J.; Ströberg, R. Di- and oligonucleotide synthesis using H-phosphonate chemistry. w *Oligonucleotide Synthesis*. Herdewijn, P. Ed.; Humana Press: Totowa, **2005**, 81–100.
- [109] Tajti, Á.; Keglevich, G.; Bálint, E. Microwave-assisted alcoholysis of dialkyl H-phosphonates by diols and amino alcohols. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2017**, *192*, 769–775.
- [110] 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.
- [111] *Phosphorus-31 NMR spectroscopy*. Kühl, O., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, **2009**.
- [112] Jones, D. J.; O’Leary, E. M.; O’Sullivan, T. P. Synthesis and application of phosphonothioates, phosphonodithioates, phosphorothioates, phosphinothioates and related compounds. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 4279–4292.
- [113] 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.
- [114] Yamamoto, F.; Oka, H.; Antoku, S.; Ichiya, Y.; Masuda, K.; Maeda, M. Synthesis and characterization of lipophilic 1-[¹⁸F]fluoroalkyl-2-nitroimidazoles for imaging hypoxia. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 590–597.
- [115] 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.
- [116] Kaniowski, D.; Ebenryter-Olbińska, K.; Kulik, K.; Suwara, J.; Cypryk, W.; Jakóbiak-Kolon, A.; Leśnikowski, Z.; Nawrot, B. Composites of nucleic acids and boron clusters (C₂B₁₀H₁₂) as functional nanoparticles for downregulation of EGFR oncogene in cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4863.
- [117] Nourazarian, A. R.; Najar, A. G.; Farajnia, S.; Khosroushahi, A. Y.; Pashaei-Asl, R.; Omid, Y. Combined EGFR and C-*Src* antisense oligodeoxynucleotides encapsulated with PAMAM dendrimers inhibit HT-29 colon cancer cell proliferation. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2012**, *13*, 4751–4756.
- [118] 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.
- [119] 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.
- [120] 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.
- [121] 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.
- [122] 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.
- [123] Zayas, J.; Jones, M. Jr. 9-Iodo-*o*-carborane. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 3715–3716.
- [124] Schäfer, M.; Krummenacher, I.; Braunschweig, H.; Finze, M. Boron clusters with a ferrocenylalkynyl group bonded to boron: synthesis, characterization, and electrochemical trends. *Z. Für Anorg. Allg. Chem.* **2015**, *641*, 660–668.
- [125] Himmelspach, A.; Finze, M. Dicarba-*closo*-dodecaboranes with one and two ethynyl groups bonded to boron. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *13*, 2012–2024.
- [126] St. Denis, J.; Gordon Iv, J.; Carroll, V.; Priefer, R. Novel synthesis of the isoflavone genistein. *Synthesis* **2010**, *10*, 1590–1592.
- [127] Greene, W.; Wuts, P.G.M. *Protective groups in organic synthesis*. John Wiley & Sons, **2006**
- [128] Ito, F.; Iwasaki, M.; Watanabe, T.; Ishikawa, T.; Higuchi, Y. The first total synthesis of kwakhurin, a characteristic component of a rejuvenating plant, “Kwao Keur”: toward an efficient synthetic route to phytoestrogenic isoflavones. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 674–681.

**KOPIE PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ PRACY
DOKTORSKIEJ**

Article

Metallacarborane Synthons for Molecular Construction—Oligofunctionalization of Cobalt Bis(1,2-dicarbollide) on Boron and Carbon Atoms with Extendable Ligands

Krzysztof Śmiałkowski^{1,2} , Carla Sardo^{1,3}  and Zbigniew J. Leśnikowski^{1,*} 

¹ Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Medical Biology Polish Academy of Sciences, Lodowa 106, 93-232 Lodz, Poland; ksmialkowski@cbm.pan.pl (K.Ś.); csardo@unisa.it (C.S.)

² Lodz Institutes of the Polish Academy of Science, The Bio-Med-Chem Doctoral School, University of Lodz, 90-237 Lodz, Poland

³ Department of Pharmacy, University of Salerno, Via Giovanni Paolo II, 132, 84084 Fisciano, SA, Italy

* Correspondence: zlesnikowski@cbm.pan.pl; Tel.: +48-42-209-33-80

Abstract: The exploitation of metallacarboranes' potential in various fields of research and practical applications requires the availability of convenient and versatile methods for their functionalization with various functional moieties and/or linkers of different types and lengths. Herein, we report a study on cobalt bis(1,2-dicarbollide) functionalization at 8,8'-boron atoms with different heterobifunctional moieties possessing a protected hydroxyl function allowing further modification after deprotection. Moreover, an approach to the synthesis of three and four functionalized metallacarboranes, at boron and carbon atoms simultaneously via additional functionalization at carbon to obtain derivatives carrying three or four rationally oriented and distinct reactive surfaces, is described.

Keywords: metallacarboranes; cobalt bis(1,2-dicarbollide); oligofunctionalization; alkylation; stereochemistry



Citation: 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. <https://doi.org/10.3390/molecules28104118>

Academic Editors: Michael A. Beckett and Igor B. Sivaev

Received: 13 April 2023

Revised: 4 May 2023

Accepted: 5 May 2023

Published: 16 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Boron clusters, a class of polyhedral caged compounds, are playing an increasingly prominent role in the development of a broad range of technologies in fields such as material science [1,2] and medicinal chemistry [3–5]. They also find applications as labels for nucleic acid fragments [6–8]. Conjugates of DNA oligonucleotides and functionalized boron clusters have recently been proposed as building blocks for the construction of new nanomaterials for biomedical applications [9,10].

The ability of a boron cluster's type of dicarbaborate anion (*nido*-7,8-C₂B₉H₁₁) to coordinate a wide spectrum of metal ions, such as Fe, Co, Cr, Ta, Mo, W, V, and Nb, and form metal complexes, namely, metallacarboranes, extends the range of its prospective applications [11–14]. Among them, the most widely used metallocarborane is cobalt bis(1,2-dicarbollide), which is a sandwich of two [C₂B₉H₁₁]²⁻ (dicarbollide) units with a cobalt ion in the center of the complex structure.

The broad technological potential of metallacarboranes requires access to a diverse array of functionalities (reactive functional groups, alkyl chains, spacers or polymers of various lengths, pharmacologically active species, etc.). Furthermore, it is necessary for more than one of these kinds of functionalities to coexist in the same metallacarborane structure to produce hetero-functionalized, tailor-made metallacarborane derivatives. The possibility to arrange these functionalities in a specific spatial orientation with respect to the topology of the 3D cluster core facilitates the achievement of the desired covalent modification, providing atomic-level precision and allowing for the control of size and surface composition. Finally, a highly relevant aspect regarding molecular design is the possibility of distancing the metallacarborane cage from the introduced functional group and the prospect of their further modification and/or extension.

The successful use of functionalized 1,2-dicarbododecaborane as a core unit in the synthesis of building blocks containing a boron cluster and DNA for the construction of functional nanoparticles carrying therapeutic nucleic acids [9,10] prompted us to extend this technology towards metallacarboranes. Due to the different shapes of metallacarboranes, it may be possible to obtain nanoparticles with a different topology than that of 1,2-dicarbododecaborane, which, in turn, can affect their biological properties. The ability of boron clusters to function as membrane carriers for a broad range of cargo molecules, thereby facilitating therapeutic nucleic acid cellular uptake, constitutes an additional potential advantage of metallacarborane-containing DNA nanoparticles [15–18].

2. Results

Herein, the results of a study on the oligofunctionalization of cobalt bis(1,2-dicarbollide) at boron atoms 8 and 8' and 1,1' and/or 2,2' at carbon atoms with extendable ligands are described. Ligands such as hydroxyalkyls, which possess a hydroxy function separated from the metallacarborane core by spacers, were used. They offer the possibility of maximizing the distance of functional moieties from each other and the cluster core to avoid the influence of metallacarborane (known as the “metallacarborane effect”) [19] on the chemical properties of these moieties. Analogous (but unprotected and substituted at cage carbon atoms only) alkylhydroxy derivatives of cobalt bis(1,2-dicarbollide) were described by Grüner and colleagues [20,21].

Moreover, derivatives were designed to test the applicability of two types of protections commonly employed in the chemical synthesis of DNA hydroxyl-protecting groups, namely, trityl and alkylsilyl protections, to allow for chemo-selection in a subsequent chemical manipulation. These results are complemented by studies on the further functionalization of the metallocarborane substituted on the 8,8' boron atoms via substitution on the 1,1' and 2,2' carbon atoms of the carborane ligands.

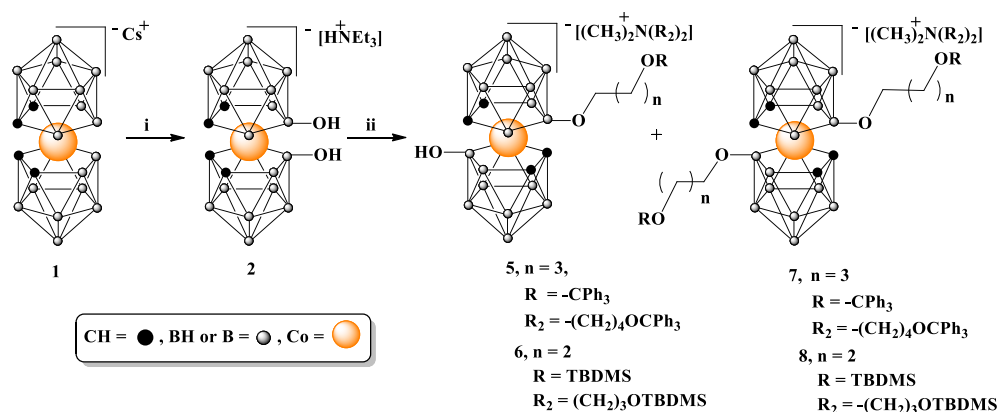
2.1. Functionalization at 8 and 8' Boron Atoms via Direct Alkylation of Hydroxy Groups in 8,8'-Dihydroxy-bis(1,2-dicarbollide)-3-cobalt(1-)ate (2)

The functionalization procedure began with converting cobalt bis(1,2-dicarbollide) (1) into easily available 8,8'-dihydroxy-bis(1,2-dicarbollido)-3-cobalt(1-)ate (2) in a reaction with 80% aqueous sulfuric acid [22]. The substitution reaction proceeded selectively at the 8 and 8' boron atoms, which are the ones with maximum electron density [23].

As the alkylating agents used for compound 2 were 4-(trityloxy)butyl-4-methylbenzenesulfonate (3) [24] or (3-bromopropoxy)-*tert*-butyldimethylsilane (4), which differ in terms of leaving groups (tosyl or bromine) and hydroxyl group protection (trityl, -CPh₃ or *tert*-butyldimethylsilyl, TBDMS), NaH was used as a base to activate the hydroxyl groups in 2 (Scheme 1).

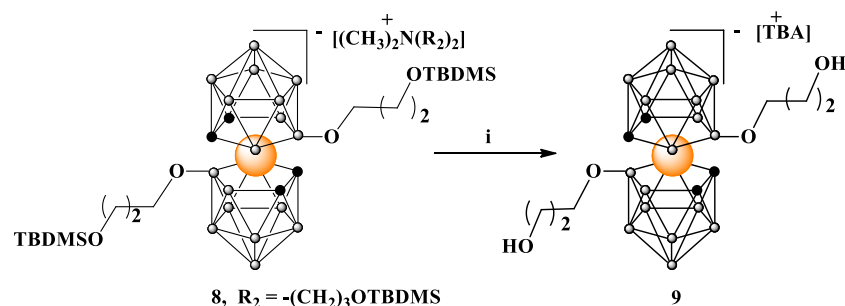
For the reactions involving both tosylate 3 and bromide 4, even if an excessive amount of NaH was used, the complete alkylation of both hydroxyl groups was not achieved after 24 h, yielding a mixture of mono-substitution products 5 or 6 (minor products) and bis-substitution products 7 or 8 (major products). Both mono- and bis-alkylated products are easily separable via column chromatography conducted on silica gel using a gradient of methanol or acetonitrile in chloroform as the eluting solvent system.

The final yield of trityl-protected 7 after purification was found to vary considerably, ranging from 30 to 60%, although the yield of conversion detected in the crude reaction mixture was high, with a bis-functionalized derivative as the major product formed. This variability in the recovery of the tritylated products 5 and 7 can be ascribed to the relative instability of the trityl protection in 5 and 7. A reason for this instability could be the known Lewis acidity of the boron cluster cage [25] and the acid lability of trityl protection. Interestingly, it seems that one of the factors influencing this effect may be the distance of the trityl protection from the metallocarborane core because in compounds 15, 16, and 21, which contain longer linkers, the instability of the trityl groups does not appear to be a problem.



Scheme 1. Alkylation of 8,8'-dihydroxy-bis(1,2-dicarbollide)-3-cobalt(1-)-ate (**2**) with $\text{Ts}(\text{CH}_2)_4\text{OCPh}_3$ (**3**) or $\text{Br}(\text{CH}_2)_3\text{OTBDMS}$ (**4**) as electrophiles. i. H_2SO_4 80% 140 °C; ii. NaH, **3** or **4**, 80 °C or 60 °C, and DMF; TBDMS = $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$.

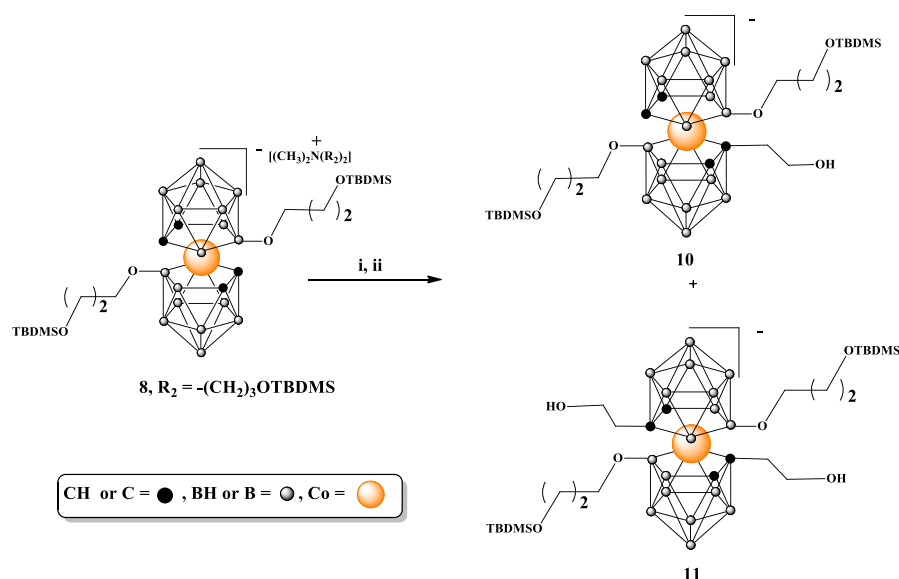
Compounds **6** and **8** containing silyl protections are reasonably stable anions that can be purified and separated via column chromatography on silica gel. TBDMS protecting groups were quantitatively removed from terminal hydroxyls via treatment with TBAF in THF at room temperature, as demonstrated for **8** (Scheme 2). This treatment led to a counterion exchange in **9**, which was demonstrated using NMR analysis.



Scheme 2. Deprotection of TBDMS protected **8**. i. TBAF in THF. TBDMS = $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, TBA = $\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3]_4$.

As indicated via ^1H NMR (Supplementary Information, Figures S2, S7 and S12), alkylated compounds **5–8** were isolated in the form of tetraalkylammonium $(\text{CH}_3)_2\text{NR}_2$ salt, where R_2 is $-\text{(CH}_2\text{)}_4\text{OCPh}_3$ or $-\text{(CH}_2\text{)}_3\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (Scheme 1). The unexpected structure of the tetraalkylammonium counterions is most probably due to the in situ formation of sodium dimethylamine as a result of a side reaction involving the reduction of DMF, used as a solvent by NaH, and its reaction with the alkylating agent [26]. The modest nucleophilicity of the hydroxyls on one side and the erosion of reagents because of this competing reaction with solvent on the other side account for the use of an excess of reagents to achieve good yields. These undesirable properties of the pair of NaH and DMF are also responsible for the incomplete alkylation of both hydroxyl groups in **2** mentioned above under the conditions employed, despite the other advantages of DMF solvent.

Next, we attempted to functionalize the carbon atoms of the bisubstituted on the boron atoms compound **8** (Scheme 3). The reaction was carried out in anhydrous DME at a temperature ranging from -70 °C to room temperature according to a typical procedure. First, to a solution of **8** in DME, $n\text{BuLi}$ in hexane and then ethylene oxide solution in THF were added. After 24 h, the reaction was quenched, which, after a standard workup, yielded the mono-substitution product **10** formed as the minor product and the bis-substitution product **11** formed as the major one. Although moderate amounts of the target compounds can be obtained using this approach, the synthetic yields are generally not high.



Scheme 3. Substitution on carbon atoms in 8,8'-alkoxy-functionalized metallacarborane **8**. i. $nBuLi$, DME; ii. ethylene oxide. TBDMS = $-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$.

We hypothesize that the reasons for the limited susceptibility of the type **8** compounds to functionalization on carbon atoms may include the electron-donating effect of boron cluster ligands; steric hindrance due to the presence of large substituents at the 8 and 8' positions, thereby hampering the electrophile's access to the activated carbon atoms; the formation of intramolecular hydrogen bonds between the oxygen atoms of the substituents at the 8,8' position and acidic carborane C-H groups (Figure 1) analogously to C-H...X-B hydrogen bonds [27,28]; and rotations of 1,2-dicarbollide ligands around an axis, thereby decreasing the susceptibility of C-H groups to activation and alkylation. Consequently, we decided to test a different approach based on derivatives of cobalt bis(1,2-dicarbollide) with arrested rotation and containing a phosphorothioate bridging moiety, namely, **13**.

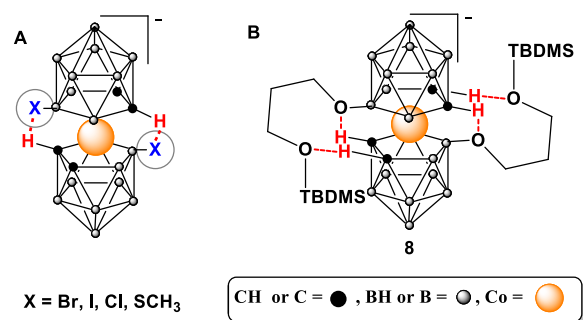
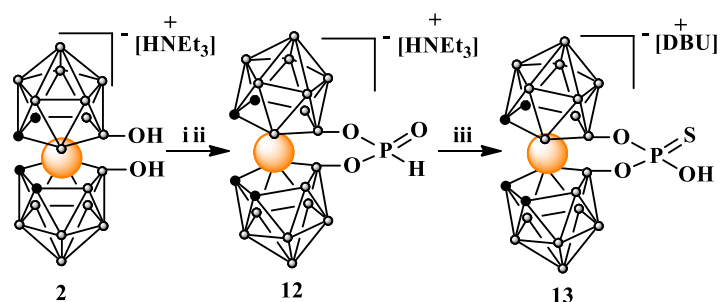


Figure 1. Intramolecular hydrogen bonds in halogenated cobalt bis(1,2-dicarbollide) (**A**) and hypothetical intramolecular interactions in 8,8'-bis-alkylated **8** (**B**).

2.2. Functionalization at Boron Atoms 8 and 8' via S-Alkylation of 8,8'-O,O-[Cobalt bis(1,2-dicarbollide)]phosphorothioate (**13**)

2.2.1. Synthesis of 8,8'-Bridged 8,8'-O,O-[Cobalt bis(1,2-dicarbollide)]phosphorothioate (**13**)

The target compound **13** was obtained through a simple, two-step procedure (Scheme 4). In the first step, the 8,8'-dihydroxy-derivative **2** was converted into 8,8'-bridged 8,8'-O,O-[cobalt bis(1,2-dicarbollide)] H-phosphonate acid ester (**12**) via a reaction with tris(1H-imidazol-1-yl)phosphine [29] and the in situ hydrolysis of the resultant imidazolid.



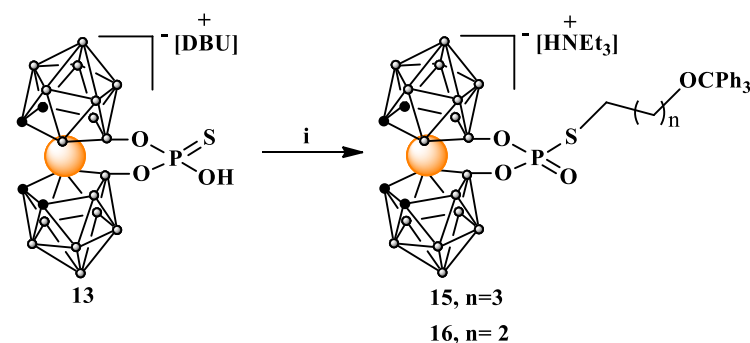
Scheme 4. Synthesis of H-phosphonate (**12**) and thiophosphate (**13**) esters of 8,8'-dihydroxy-bis(1,2-dicarbollido)-3-cobalt(1-)-ate (**2**); i. PCl₃, imidazole, Et₃N in THF; ii. H₂O, iii. S₈, DBU in MeOH. DBU = 1,8-diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en.

In the second step, H-phosphonate acid ester **12** was dissolved in anhydrous methanol; then, elemental sulfur S₈ was added. A strong organic base, 1,8-diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en (DBU), was added to the resultant suspension, and the reaction was left for 96 h at room temperature with stirring. After the evaporation of the methanol, the residue containing the crude product was purified via silica gel column chromatography using a gradient of acetonitrile in chloroform as the eluting solvent system.

2.2.2. S-Alkylation of 8,8'-Bridged 8,8'-O,O-[Cobalt bis(1,2-dicarbollide)]phosphorothioate (**13**) with Linear and Branched Alkylating Agents

Sulfur is a larger atom than oxygen, rendering its electrons more polarizable and the atom itself more nucleophilic. The alkylation of the sulfur atom of phosphorothioates is a viable method for the synthesis of their S-alkylated derivatives. This method takes advantage of the excellent nucleophilic properties of sulfur and is commonly used in organophosphorus chemistry [30].

Using these advantageous properties of phosphorothioates, we attached both linear **13** and **14** or branched **20** ligands containing hydroxyl functions protected by a trityl group to the metallocarborane derivative **13**. The alkylation reaction proceeded smoothly, and the yields of the isolated alkylated products **15**, **16**, and **21** were high (Scheme 5).

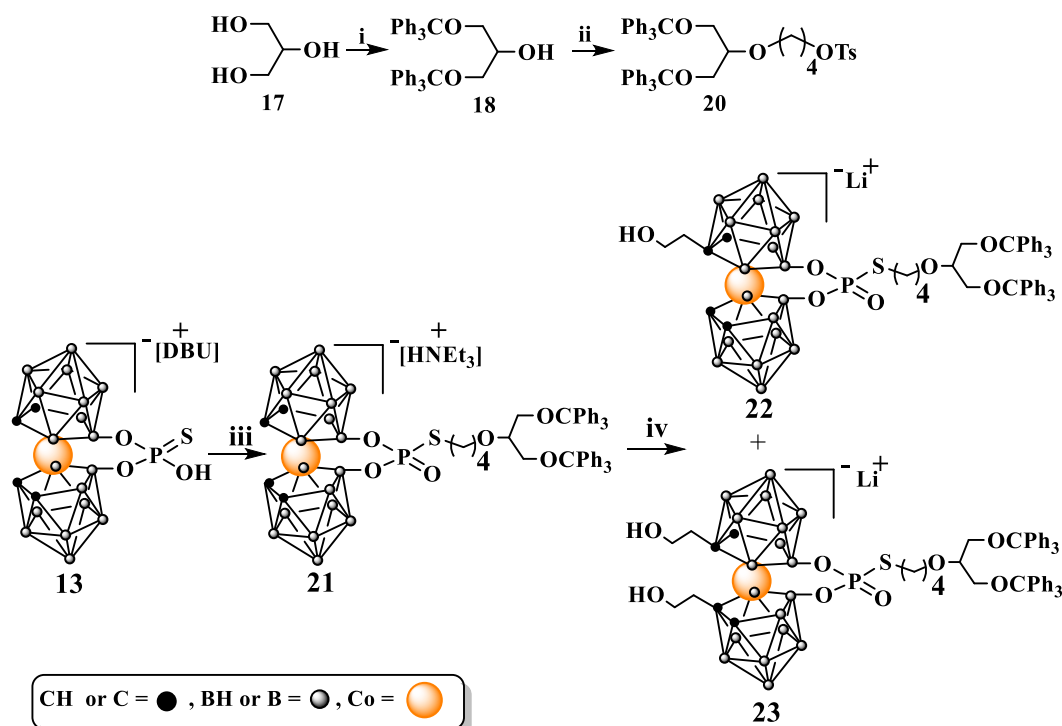


Scheme 5. Alkylation of 8,8'-O,O-[cobalt bis(1,2-dicarbollide)]phosphorothioate (**13**) with linear alkylating agent. i. Ts(CH₂)₄OCPH₃ (**3**) or Br(CH₂)₃OCPH₃ (**14**), acetone, NEt₃, 60 °C, and 24 h. DBU = 1,8-diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en.

It is worth noting that derivatives of known 8,8'-bridged 8,8'-O,O-[cobalt bis(1,2-dicarbollide)]phosphate [22], a counterpart of **13** containing an 8,8'-O,O-phosphate bridge instead of a phosphorothioate one, have not yet been described. The expected low nucleophilicity of the phosphorus center resulting from the metallocarborane effect [19] and the lower nucleophilicity of oxygen compared to sulfur atom can be one of the reasons for this.

Consequently, a study on the functionalization of **13**'s carbon atoms was undertaken. For this purpose, a method for the synthesis of a branched alkylating agent (**20**), in this case, a glycerol derivative, was first developed. In the first step, bis(trityloxy)propan-2-ol

(18) was synthesized according to a method reported in the literature [31]. Next, 18 was reacted with 1,4-bis(*p*-toluenesulfonyloxy)butane (19), yielding a branched alkylating agent with an elongated linker (20) (Scheme 6).



Scheme 6. Synthesis of branched alkylation agent 4-(1,3-bis(trityloxy)propan-2-yloxy)butyl-4-methylbenzenesulfonate (20), its use to alkylate 8,8'-O,O-[cobalt bis(1,2-dicarbollide)]phosphorothioate (13), and functionalization of 21 on carbon atoms: i. ClCPh_3 (trityl chloride), pyridine; ii. NaH, DMF, 1,4-bis-(4-methylbenzenesulfonate)butane (19); iii. Et_3N , 20 in a acetone/EtOAc; iv. *n*BuLi, DME; ethylene oxide; DBU = 1,8-diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en.

The functionalization of 21 on carbon atoms was achieved via the activation of cage C-H groups with *n*BuLi followed by treatment with ethylene oxide. As expected, carrying out the synthesis of 22 and 23 required overcoming the low susceptibility of intermediate 21 to substitution on carbon atoms. However, mono- and disubstituted derivatives 22 and 23 were obtained with yields that enabled their full characterization and use for further chemical manipulations. The accessibility and high yields offered by the synthesis of intermediates 13 and 21 allow for the easy scaling-up of the synthesis of 22 and 23 (if needed).

3. Discussion

In the literature, the description of metallacarborane building blocks with hydroxyl or other functional groups separated from a cluster cage by an alkyl spacer seems limited. In this contribution, we report the development of methods for the functionalization of cobalt bis(1,2-dicarbollide) (1) with hetero-bifunctional derivatives of silyl- or trityl-protected alcohols attached directly to boron atoms and trityl-protected branched alcohols attached to metallacarborane through a phosphorothioate bridge. An approach to the synthesis of oligofunctionalized metallacarboranes via carbon deprotonation through *n*BuLi to obtain derivatives carrying substituents at both boron and carbon atoms is also described.

After a long period of discussion, the aromatic, three-dimensional (3D) nature of boron clusters is now widely accepted [32,33]. As in the case of aromatic organic molecules, the attachment of a substituent to one of the atoms of a 3D aromatic boron cluster system changes the distribution of the electron density of the entire molecule and affects the prop-

erties of other reactive centers. This makes the oligofunctionalization of metallocarboranes, especially when performed simultaneously on boron and carbon atoms, a particular challenge. Additionally, the complicated stereochemistry of substituted metallocarboranes owing to the presence of various types of chirality in the same molecule further compounds this challenge.

One of the practical manifestations of an effect of synchronized changes in electron density within the whole metallocarborane molecule on the properties of reactive centers is the inclination for the formation of disubstituted derivatives on boron atoms 8 and 8' and carbon atoms 1,2 and 1',2'. This is illustrated by the preferential formation of disubstituted derivatives compared to monosubstituted ones in the case of **7** vs. **5**; **8** vs. **6**; **11** vs. **10**; and **23** vs. **22**. This is clearly due to the activation of a second nucleophilic center, such as B-OH or C-H groups, by a strong base after a previous substitution at the first center. However, this does not change the fact that the overall alkylation efficiency of the C-H groups in the derivatives of **1** already substituted on 8 and 8'' boron atoms is low.

For example, the monoalkylation derivatives of 8,8'-dihydroxy-bis(1,2-dicarbollide)-3-cobalt(1-)ate (**2**) and bisalkylation derivatives were isolated in a ratio of 1:25 for **5** and **7** and 1:10 for **6** and **8**. The mono- and bis-substituted at carbon atoms derivatives of the bis-substituted at boron atoms of compound **8** were isolated in a 1:3 ratio for **10** and **11**. The same trend, though less pronounced, was observed for the boron and carbon functionalized derivatives **22** and **23** with arrested rotation, for which the ratio of mono-substitution on carbon bis-substitution was 1:1.2.

Another property significantly influencing the chemistry of oligofunctionalized metallocarboranes is their stereochemistry. The phenomenon of boron cluster chirality was recognized early [34–36]; however, this did not initially arouse much interest. The increasing use of boron clusters in the field of new materials, nanotechnology, and medical chemistry renders the stereochemistry of boron clusters increasingly important.

Strangely, though the most symmetric species in nature is the $B_{12}H_{12}^-$ ion, relatively minor changes in the boron cluster structure might render its basic framework dissymmetric enough to provoke chirality [37,38]. This is particularly evident in the case of oligofunctionalized metallocarboranes. The derivatives of type **22** and **23** are extreme examples containing various sources of chirality such as a chiral center at the phosphorus atom, axial and planar chirality due to bending of the metallocarborane molecule, and the existence of a number of isomers due to substitution at carbon atoms in addition to boron substitution.

A comparison of the ^{11}B -NMR spectra for compounds **13**, **15**, **16**, **21**, **22**, and **23** with arrested rotation as well as their ^{31}P -NMR spectra clearly shows changes in the number of isomers of the individual products depending on the type of substitution. Compounds **13**, **15**, **16**, and **21** show a singlet at δ of about 23 ppm attributed to 2B(8,8') in the ^{11}B -NMR spectrum and a singlet at 48.62 ppm for **13** of about 16 ppm for compounds **15**, **16**, and **21** in the ^{31}P -NMR spectrum; these findings are consistent with the relative symmetry of the complexes.

On the contrary, the ^{11}B - and ^{31}P -NMR spectra of mono- and bisalkylated at carbon-atoms derivatives **22** and **23** show a dramatic change in symmetry due to the many possible combinations of substitutions on carbon atoms and the formation of a center of chirality on the phosphorus atom in monosubstituted **22** and in some isomers of bis-substituted **23**. In consequence, four signals at 25.37, 24.65, 23.69, and 22.93 ppm with an integral intensity ratio of 2:2:1:1 corresponding to B8,8' for **22** and five signals at 25.35, 24.40, 23.64, 22.80, and 22.23 ppm with an approximate integral intensity ratio of 1:2:1.5:1:1 for **23** were observed. A similar effect was observed in the ^{31}P -NMR spectra, with seven signals at 15.10, 14.94, 14.57, 14.42, 14.11, 13.74, and 13.49 ppm for **22** and five signals at 14.99, 14.39, 14.16, 14.01, and 13.38 ppm for **23**, thus reflecting the asymmetry of these compounds and formations of isomers.

The sensitivity of standard chromatographic techniques is insufficient for distinguishing these isomers and only allows for the separation of mono- and disubstituted derivatives on carbon atoms, which have already been substituted on boron atoms in the case of **10** and

11 and **22** and **23**. A complete or partial separation of the isomers is probably attainable using HPLC; however, with regard to further practical applications of these derivatives, it is not necessary at the present stage.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

All solvents were purchased in the highest available quality required for their application in this study. The reactions requiring anhydrous conditions were carried out under argon atmosphere using anhydrous solvents treated with activated molecular sieves for at least 24 h. Molecular sieves (4Å and 3Å) were purchased from Alfa Aesar (Karlruhe, Germany) and heat-activated under vacuum before use. Triethylamine, trityl chloride, toluene-sulfonyl chloride, NaHCO₃, Na₂SO₄, 1,4-butanediol, P₂O₅, sodium hydride, n-butyllithium (1.6 M solution in hexane), (3-bromopropoxy)-*tert*-butyldimethylsilane, (**4**) and ethylene oxide (2.9–3.1 M solution in THF) were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Cobalt bis(1,2-dicarbollide) was purchased from Katchem Ltd., Prague, Czech Republic.

4.2. Methods

Chromatography. Ultramate 3000 HPLC system (DIONEX, Sunnyvale, USA), equipped with a photodiode array detector (with fixed wavelengths of 210, 270, 310, and 330 nm) was used to determine the purity of products. The method consisted of a gradient elution from 20% to 90% aqueous acetonitrile using a Hypersil Gold (5µm particle size) reverse-phase column at 25 °C. HPLC data were acquired and processed using Chromeleon 6.8 software (DIONEX, Sunnyvale, CA, USA). Chromatography for purification of products was performed on a 230–400 mesh silica-gel Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) filled glass column. Analytical TLC was performed on F254 silica gel plates purchased from Sigma Aldrich. Compounds were visualized using UV light (254 nm) and/or via staining with 0.05% *w/v* palladium chloride solution in MeOH/HCl.

NMR spectroscopy. ¹H, ¹¹B, ¹¹B{¹H}, ¹³C{¹H}, ³¹P, and ³¹P{¹H} NMR spectra were recorded with a Bruker Advance III 600 MHz spectrometer.

UV-Vis spectrophotometry and line-fitting analysis. Measurements were performed using a Jasco V-750 UV spectrophotometer at room temperature in acetonitrile.

MS and FT-IR. MALDI-TOF MS spectra were recorded using a Voyager-Elite mass spectrometer (PerSeptive Biosystems) with 3-hydroxypicolinic acid (HPA) as the matrix. ESI MS mass spectra were recorded using Agilent 6546 LC/Q-TOF (Santa Clara, California, United States). Negative ions were detected. Infrared absorption spectra were recorded using a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer (Thermo Scientific) equipped with a Smart orbit diamond Attenuated Total Reflectance (ATR) accessory. Samples to be analyzed were placed on a diamond ATR element in a solid form or through casting from CH₂Cl₂ solution. Data were acquired and processed using Omnic 8.1 software (Thermo Scientific, Waltham, CA, USA).

8,8'-dihydroxy-bis(1,2-dicarbollido)-3-cobalt(1-ate) HNET₃ (**2**) was synthesized according to the procedure reported by Plešek et al. [22].

4-Trityloxybutyl 4-methylbenzenesulfonate (**3**) was obtained as described in [39].

3-Bromo-1-trityloxypropane (**14**) was synthesized as described previously [10].

1,3-bis(trityloxy)propan-2-ol (**18**) was synthesized according to a procedure in the literature [31].

1,4-bis-(4-methylbenzenesulfonate)butane (**19**) was synthesized according to a modified procedure from the literature [40].

*Synthesis of 3,3'-Co[(8-O(CH₂)₄OCPH₃]-1,2-C₂B₉H₁₀)(8'-OH-1,2-C₂B₉H₁₀)(CH₃)₂N[(CH₂)₄OCPH₃]₂ (**5**) and 3,3'-Co[(8-O(CH₂)₄OCPH₃]-1,2-C₂B₉H₁₀)]₂(CH₃)₂N[(CH₂)₄Oph₃]₂ (**7**).* Compound **2** (50 mg, 0.10 mmol) was dissolved in 0.5 mL of anhydrous dimethoxyethane (DME) and added to 60% NaH in mineral oil dispersion (4.4 mg, 0.10 mmol NaH) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. After this time has elapsed, the

solvent was evaporated under reduced pressure, and the resultant solid residue was dissolved in 0.5 mL of anhydrous dimethylformamide (DMF) and added to a second aliquot of 60% NaH in mineral oil dispersion (26.2 mg, 0.65 mmol NaH). After sitting for 2 h at room temperature, the mixture was dropped into a solution of **3** (318.8 mg, 0.65 mmol) in 0.5 mL of anhydrous DMF; then, the reaction mixture was heated at 80 °C (oil bath temperature) for 24 h. The post-reaction mixture was concentrated; then, 3 mL of H₂O was added. The resulting precipitate was washed with several aliquots of H₂O. Then, the solid was dissolved in 5 mL of CH₂Cl₂, and the solution was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated. Repeated column chromatography on silica gel using a gradient of CH₃OH in CH₂Cl₂ (0 to 20%) as an eluting solvent system yielded **5** and **7** as the first and second bands, respectively. Fractions containing compound **7** were collected, evaporated to dryness, and then crystallized from hexane, furnishing 96% pure product as determined by HPLC. Monosubstituted compound **5** was obtained as a red oil.

(**5**): **Yield**: 7 mg (5%); **TLC** (CHCl₃:MeOH 4:1); **R_f**: 0.53; **MALDI-MS** (*m/z*): 670.5 (calc. for C₂₇B₁₈H₄₄O₃Co₁: 670.17). Since excessively small quantities of this product were obtained, it was not further analyzed via NMR.

(**7**): **Yield**: 180 mg (62%); **TLC** (CHCl₃:MeOH 4:1); **R_f**: 0.64; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃CN) δ: 7.43 (m, 24H, *H_{arom}*), 7.32 (m, 24H, *H_{arom}*), 7.25 (m, 12H, *H_{arom}*), 4.18 (s, 4H, *CH_{carborane}*), 3.31 (t, *J* = 6.2 Hz, 4H, BOCH₂CH₂CH₂CH₂OTr), 3.07 (m, 8H, *CH₂OTr*), 2.99 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H, NCH₂CH₂CH₂CH₂OTr), 2.86 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.68 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂CH₂OTr), 1.60 (m, 8H, *CH₂CH₂OTr*), and 1.48 (m, 4H, BOCH₂CH₂CH₂CH₂OTr); **¹³C{¹H} NMR** (126 MHz, CD₃CN) δ: 145.53 and 145.18 (12C, *aromatic_{trityl}*); 129.44 and 129.41 (24C, *aromatic_{trityl}*); 129.37 and 128.83 (24C, *aromatic_{trityl}*); 128.21 (12C, *aromatic_{trityl}*); 87.43 and 87.06 (4C, *C(Ph)₃*), 69.43 (2C, BOCH₂CH₂CH₂CH₂OTr), 64.30 (2C, BOCH₂CH₂CH₂CH₂OTr), 63.30 (2C, NCH₂CH₂CH₂CH₂OTr), 62.33 (2C, NCH₂CH₂CH₂CH₂OTr), 51.56 (4C, *CH_{carb}*), 30.39, 29.68 (4C, *CH₂CH₂OTr*), 27.51, 27.13 (2C, BOCH₂CH₂CH₂CH₂OTr), and 20.29 (NCH₂CH₂CH₂CH₂OTr); **¹¹B{¹H} NMR** (160 MHz, CD₃CN) δ: 20.63 (s, 2B, B^{8,8'}), −3.56 (s, 2B, B^{10,10'}), −7.52 (s, 4B, B^{4,4',7,7'}), −9.03 (s, 4B, B^{9,9',12,12'}), −20.53 (s, 4B, B^{5,5',11,11'}), and −28.38 (s, 2B, B^{6,6'}); **¹¹B NMR** (160 MHz, CD₃CN) δ: 20.66 (s, 2B, B^{8,8'}), −3.59 (d, 2B, B^{10,10'}), −8.22 (m, 8B, B^{9,9',12,12',4,4',7,7'}), −20.48 (d, 2B, B^{5,5',11,11'}), and −28.09 (d, 2B, B^{6,6'}); **FT-IR** (cm^{−1}): 3083.53, 3055.16, 3029.62 (ν C-H aromatic, (C-H)_{carb}); 2927.18 (ν C-H_{asym}, CH₂); 2867.43 (ν C-H, CH₂O, ν C-H_{sym}, CH₂); 2543.23 (ν B-H); 1596.06, 1488.72, 1447.49 (ν C=C); 1152.23; 745.10 and 693.37 (δ C-H aromatic); 703.89 (ν B-B); **MALDI-MS** (*m/z*): found 984.2 (calc. for C₅₀B₁₈H₆₆O₄Co₁: 984.59).

*Synthesis of 3,3'-Co [8-O(CH₂)₃OTBDMS]-1,2-C₂B₉H₁₀](8'-OH-1,2-C₂B₉H₁₀)(CH₃)₂N[(CH₂)₃OTBDMS]₂ (**6**) and 3,3'-Co [8-O(CH₂)₃OTBDMS-1,2-C₂B₉H₁₀]₂ (CH₃)₂N[(CH₂)₃OTBDMS]₂ (**8**). Compound **2** (300 mg, 0.65 mmol) was dissolved in 3 mL of anhydrous DME under argon atmosphere and added to 60% NaH in mineral oil dispersion (26.2 mg, 0.65 mmol NaH). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. Subsequently, the solvent was evaporated, and the solid residue was dissolved in 3 mL of anhydrous DMF and added to a second portion of 60% NaH in mineral oil dispersion (157 mg, 3.93 mmol NaH). After sitting for 2 h at room temperature, the mixture was heated to 60 °C (oil bath temperature) and 911 μL of (3-bromopropoxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane (**4**) (3.93 mmol) was added dropwise. After 22 h, an additional quantity of **4** (600 μL, 2.59 mmol) was added, and the mixture was stirred for next 24 h at 60 °C. A white solid was formed. The post-reaction mixture was then filtered through syringe filter (5 μm, PTFE, Carl Roth), and DMF was evaporated under reduced pressure. The solid residue was treated with 2 mL of CHCl₃ and filtered; then, the filtrate was concentrated and loaded on a silica gel column for separation of products. First, 100% CHCl₃ and then 5% and 10% CH₃CN in CHCl₃ were used as eluting solvent systems. Compound **8** was isolated as first fraction and obtained in the form of orange crystals after solvent evaporation; its purity was above 95% as determined via HPLC. The second fraction containing **6** was obtained as red oil after solvent evaporation. Both products **6** and **8** were isolated as N,N-bis[(3-(*tert*-butyldimethylsilyloxypropyl)]-N,N-dimethyl ammonium salts [26].*

(6): **Yield:** 60 mg (10%); **TLC** (CHCl₃:CH₃CN 3:1) **R_f**: 0.53; **¹H NMR** (600 MHz, CD₃CN) δ : 6.05 (s, 1H, OH), 3.73 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, BOCH₂CH₂CH₂OSi), 3.69 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂OSi), 3.65 (m, 2H, BOCH₂CH₂CH₂OSi), 3.56 (s, 2H, CH_{carb}), 3.45 (s, 2H, CH_{carb}), 3.27 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂OSi), 2.97 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.88 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂OSi), 1.74 (m, $J = 6.4$ Hz, 2H, BOCH₂CH₂CH₂OSi), 0.90 (s, 9H, BOCH₂CH₂CH₂OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 0.89 (s, 18H, NCH₂CH₂CH₂OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 0.07 (s, 6H, BOCH₂CH₂CH₂OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), and 0.05 (s, 12H, NCH₂CH₂CH₂OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃); **¹³C{¹H} NMR** (126 MHz, CD₃CN) δ : 67.05 (1C, BOCH₂CH₂CH₂OSi), 62.56 (2C, NCH₂CH₂CH₂OSi), 61.23 (1C, BOCH₂CH₂CH₂OSi), 60.17 (2C, NCH₂CH₂CH₂OSi), 52.03 (2C, N(CH₃)₂), 46.23 (2C, CH_{carb}), 45.51 (2C, CH_{carb}), 35.92 (1C, BOCH₂CH₂CH₂OSi), 26.45 (2C, NCH₂CH₂CH₂OSi), 26.27 (6C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 26.11 (3C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 18.81 (1C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 18.72 (2C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), -5.10 (2C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), and -5.40 (4C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃); **¹¹B{¹H} NMR** (193 MHz, CD₃CN) δ : 27.16 (s, 1B, B^{8'}), 25.10 (s, 1B, B⁸), -5.02 to -9.09 (10B, overlapped B^{9,9',10,10',12,12',4,4',7,7'}), -20.10 to -20.69 (4B, B^{5,5',11,11'}), and -29.18 to -30.16 (2B, B^{6,6'}); **¹¹B NMR** (160 MHz, CD₃CN) δ : 27.16 (s, 1B, B^{8'}), 25.09 (s, 1B, B⁸), -3.22 to -9.40 (10B, overlapped B^{9,9',10,10',12,12',4,4',7,7'}), -19.72 to -21.11 (4B, B^{5,5',11,11'}), and -28.81 to -30.49 (2B, B^{6,6'}); **FT-IR** (cm⁻¹): 3278.64, 2952.00, 2927.58, 2855.64, 2539.99, 1470.65, 1387.53, 1360.69, 1252.66, 1156.76, 1093.25, 1005.54, 972.16, 938.48, 880.24, 832.61, 774.98, 718.29, and 661.26; **ESI-MS** (m/z): found 530.39 and 472.35 [M-*t*Butyl]⁻ (calc. for C₁₃B₁₈H₄₃Si₁O₃Co₁: 529.09).

(8): **Yield:** 572 mg (80%); **TLC** (CHCl₃:CH₃CN 3:1) **R_f**: 0.70; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃CN) δ : 4.18 (s, 4H, CH_{carb}), 3.69 (m, 4H, BOCH₂CH₂CH₂OSi), 3.64 (t, $J = 6.4$ Hz, 4H, NCH₂CH₂CH₂OSi), 3.38 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, and BOCH₂CH₂CH₂OSi), 3.27 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂OSi), 2.97 (s, 6H, N(CH₃)₂), 1.88 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂OSi), 1.58 (m, $J = 6.2$ Hz, 4H, BOCH₂CH₂CH₂OSi), 0.90 (s, 18H, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 0.88 (s, 18H, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 0.07 (s, 12H, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), and 0.04 (s, 12H, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃); **¹³C NMR** (126 MHz, CD₃CN) δ : 66.18 (2C, BOCH₂CH₂CH₂OSi), 62.54 (2C, NCH₂CH₂CH₂OSi), 60.95 (2C, BOCH₂CH₂CH₂OSi), 60.17 (2C, NCH₂CH₂CH₂OSi), 52.06 (2C, N(CH₃)₂), 51.60 (4C, CH_{carb}), 35.97 (2C, BOCH₂CH₂CH₂OSi), 26.46 (2C, NCH₂CH₂CH₂OSi), 26.28 (6C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 26.12 (6C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 18.83 (2C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 18.72 (2C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), -5.09 (4C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), and -5.39 (4C, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃); **¹¹B{¹H} NMR** (160 MHz, CD₃CN) δ : 20.61 (s, 2B, B^{8,8'}), -3.61 (s, 2B, B^{10,10'}), -7.45 (s, 4B, B^{4,4',7,7'}), -9.03 (s, 4B, B^{9,9',12,12'}), -20.51 (s, 4B, B^{5,5',11,11'}), and -28.38 (s, 2B, B^{6,6'}); **¹¹B NMR** (160 MHz, CD₃CN) δ : 20.76 (s, 2B, B^{8,8'}), -3.59 (d, 2B, B^{10,10'}), -7.18 to -9.37 (m, 8B, overlapped B^{4,4',7,7',9,9',12,12'}), -20.48 (d, 4B, B^{5,5',11,11'}), and -28.02 (d, 2B, B^{6,6'}); **FT-IR** (cm⁻¹): 3048.6 (C-H_{carb}); 2949.4 (ν C-H_{asym}, CH₃); 2927.4 (ν C-H_{asym}, CH₂), 2891.6 and 2884.2 (ν C-H_{sym}, CH₃); 2856.2 (ν C-H, CH₂O, ν C-H_{sym}, CH₂); 2605.2 and 2550.6 (ν B-H); 1470.8 (δ C-H_{sym}, CH₂) and 1436.0; 1386.2; 1359.5; 1251.2 (Si-CH₃) and 1161.9 (Si-O-C); 1093.1 (ν Si-O); 1019.3; 1006.3; 975.2; 955.3; 942.7; 881.; 831.8 and 772.4 (ν Si-C); 710.9; 661.0; **MALDI-MS** (m/z): found 700.5 (calc. for C₂₂B₁₈H₆₂CoO₄Si₂ 700.43).

Deprotection of compound 8 to obtain [3,3'-Co(8-O(CH₂)₃OH-1,2-C₂B₉H₁₀)₂] TBA (9). Compound 8 (20 mg, 0.018 mmol) was dissolved in 0.2 mL of tetrahydrofuran (THF). A total of 69 μ L of tetrabutylammonium fluoride (TBAF) (1M solution in THF, 0.069 mmol) was added to the obtained solution, and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Then, solvent was evaporated under reduced pressure, and the resulting oil was dissolved in CHCl₃ and applied to the silica gel column prepared in the same solvent. Elution in a gradient 1 to 20% CH₃CN in CHCl₃ provided 96% pure 9 (determined by HPLC) as TBA salt. **Yield:** 12.5 mg (95%); **TLC** (CHCl₃:CH₃CN 3:1) **R_f**: 0.47; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃CN) δ : 4.17 (s, 4H, CH_{carb}), 3.52 (t, $J = 6.3$ Hz, 4H, BOCH₂CH₂CH₂OH), 3.43 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, BOCH₂CH₂CH₂OH), 3.10–3.03 (m, 8H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 2.58 (s, 2H, OH), 1.59 (m, $J = 8.2, 3.7$ Hz, 12H, BOCH₂CH₂CH₂OH, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.41–1.28 (m, 8H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), and 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 12H, NCH₂CH₂CH₂CH₃); **¹³C NMR** (126 MHz, CD₃CN) δ : 67.47 (2C, BOCH₂CH₂CH₂OH), 60.63 (2C, BOCH₂CH₂CH₂OH), 59.23 (4C, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 51.39 (4C, CH_{carb}), 35.54 (2C, BOCH₂CH₂CH₂OH), 24.21 (4C, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 20.25 (4C, NCH₂CH₂CH₂CH₃), and 13.72 (4C, NCH₂CH₂CH₂CH₃);

$^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ NMR (160 MHz, CD_3CN) δ : 20.95 (s, 2B, $\text{B}^{8,8'}$), -3.49 (s, 2B, $\text{B}^{10,10'}$), -7.71 (s, 4B $\text{B}^{4,4',7,7'}$), -8.85 (s, 4B, $\text{B}^{9,9',12,12'}$), -20.44 (s, 4B, $\text{B}^{5,5',11,11'}$), and -28.14 (s, 2B, $\text{B}^{6,6'}$); ^{11}B NMR (160 MHz, CD_3CN) δ : 20.97 (s, 2B, $\text{B}^{8,8'}$), -3.48 (d, 2B, $\text{B}^{10,10'}$), -7.18 to -9.26 (m, 8B, $\text{B}^{4,4',7,7',9,9',12,12'}$), -20.42 (d, 4B, $\text{B}^{5,5',11,11'}$), and -28.19 (d, 2B, $\text{B}^{6,6'}$); FT-IR (cm^{-1}): 3588.76 (ν O-H); 3450.79 (ν N^+ -R); 3052.83 (C-H_{carb}); 2962.10 (ν C-H_{asym}, CH_2); 3932.36 and 2873.70 (ν C-H, CH_2O , ν C-H_{sym}, CH_2); 2529.19 (ν B-H); 1467.75 (ν N^+ -R), 1380.63; 1161.25 (HO-C); 1105.54; 1062.05; 1007.15; 969.00; 945.10; 920.29; 876.90; 789.11; 735.69; 696.07; 664.83; MALDI-MS (m/z): found 472.8 (calc. for $\text{C}_{10}\text{B}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Co}_1$ 471.90).

Synthesis of 3,3'-Co[[8-O(CH₂)₃OTBDMS-1-(CH₂)₂OH]-1,2-C₂B₉H₉][8'-O(CH₂)₃OTBDMS-1',2'-C₂B₉H₁₀]]⁻ (10) and 3,3'-Co[(8-O(CH₂)₃OTBDMS-1-(CH₂)₂OH)-1,2-C₂B₉H₉]₂⁻ (11). Compound **8** (50 mg, 0.04 mmol) was dried via co-evaporation with anhydrous benzene and then kept under vacuum, over P_2O_5 overnight. Then, it was dissolved in anhydrous DME (1 mL), and the solution was cooled in CO_2 /isopropanol cooling bath. After 15 min, $n\text{-BuLi}$ (43 μL , 1.6 M solution in hexane, 1.5 eq) was added, and the reaction mixture was stirred for 10 min. Afterwards, cooling bath was removed, and the mixture was stirred for next 10 min. Then, the reaction mixture was cooled again in cooling bath and another portion of $n\text{-BuLi}$ (43 μL) was added. After 15 min, ethylene oxide (60 μL , 2.9–3.1 M solution in THF, 4.5 eq) was added, and the reaction was left overnight in cooling bath. Then, CH_2Cl_2 (3 mL) was added to the reaction mixture, the reaction was quenched via addition of water, and the organic solution was washed three times with 5 mL portions of water. Organic layer was separated and dried over MgSO_4 ; then, solvents were evaporated. Crude product was purified and mono- and bis-substituted products were separated through silica gel column chromatography using a gradient of MeOH in CH_2Cl_2 from 0 to 3% of MeOH.

(10): Yield: 4.7 mg (9%); TLC (MeOH: CH_2Cl_2 1:12.5): R_f : 0.28; ESI-MS (m/z): found 744.55, (calc. for $\text{C}_{24}\text{B}_{18}\text{H}_{66}\text{O}_5\text{Si}_2\text{Co}_1$ 744.48). Since excessively small quantities of this product were obtained, it was not further analyzed via NMR.

(11): Yield: 15 mg (27%); TLC (MeOH: CH_2Cl_2 1:12.5): R_f : 0.16; ^1H NMR (500 MHz, CD_3CN) δ : 4.32–4.08 (s, 2H, diastereoisomeric $\text{CH}_{\text{carborane}}$), 3.77 to 3.52 (m, 16H, overlapped $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{BOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{BOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.52 to 3.39 (m, 4H, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{\text{carb}}$), 3.39 to 3.31 (m, 4H, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{\text{carb}}$), 3.03 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.74 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.65 (m, 4H, $\text{BOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 0.90 (s, 18H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.88 (s, 18H, $\text{BOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.07 (s, 12H, $\text{BOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), and 0.05 (s, 12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CD_3CN) δ : 67.39 (2C, $\text{BOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 66.93 (1C, $\text{CH}_{\text{carborane}}$), 64.82 (1C, $\text{CH}_{\text{carborane}}$), 64.10 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSi}$), 62.28 (2C, $\text{BOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 61.00 (2C, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{\text{carb}}$), 57.17 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 56.24 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 53.22 (2C, $\text{C}_{\text{carborane}}$), 45.17 (2C, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{C}_{\text{carb}}$), 36.89 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 27.28 (2C, $\text{BOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 26.98 (6C, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.77 (6C, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 19.53 (2C, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 19.39 (2C, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), -4.38 (4C, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), and -4.73 (4C, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$). $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ NMR (120 MHz, CD_3CN) δ : 29.65, 25.25, 24.28, 23.33, 21.98 (in ratio: 3:1.5:1:1:10), 31.27 to 19.66 (m, overlapped diastereoisomeric $\text{B}^{8,8'}$), -2.63 to -13.75 (m, overlapped diastereoisomeric, $\text{B}^{10,10',9,9',12,12',4,4',7,7'}$), -14.09 to -21.65 (m, overlapped diastereoisomeric $\text{B}^{5,5',11,11'}$), and -22.11 to -29.38 (m, overlapped diastereoisomeric $\text{B}^{6,6'}$); ^{11}B NMR (120 MHz, CD_3CN) δ : 30.85–20.54 (m, overlapped diastereoisomeric $\text{B}^{8,8'}$), -2.16 to -13.03 (m, overlapped diastereoisomeric, $\text{B}^{10,10',9,9',12,12',4,4',7,7'}$), -13.91 to -21.45 (m, overlapped diastereoisomeric, $\text{B}^{5,5',11,11'}$), and -21.52 to -27.10 (m, overlapped diastereoisomeric, $\text{B}^{6,6'}$); ESI-MS (m/z): found 788.58 (calc. for $\text{C}_{26}\text{B}_{18}\text{H}_{70}\text{O}_6\text{Si}_2\text{Co}_1$ 788.53).

Synthesis of 8,8'-bridged [8,8'-O₂P(O)H-3,3'-Co(1,2-C₂B₉H₁₀)₂] HNEt₃ H-phosphonate (12). Imidazole (0.51 g, 7.5 mmol) was dissolved in minimum amount of anhydrous acetonitrile. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the procedure was repeated twice. After drying under vacuum for 1.5 h, imidazole was redissolved in 16 mL of anhydrous THF and the solution was cooled to -70 °C in a dry ice/isopropanol bath under argon atmosphere. PCl_3 (210 μL , 2.40 mmol) was added dropwise followed by Et_3N (1 mL, 7.17 mmol) mixed with 1 mL of anhydrous THF. The entire mixture was

stirred at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min and then solution of 8,8'-dihydroxy-bis(1,2-dicarbollido)-3-cobalt(1-ate) HNEt_3 (**2**) (320 mg, 0.69 mmol) in 13 mL of THF was added dropwise. After further 30 min, the reaction mixture was removed from cooling bath and allowed to warm to room temperature. After another 1 h, the reaction was quenched with 30 mL of water and extracted four times with 40 mL of diethyl ether (Et_2O). The combined ether extracts were dried with MgSO_4 and the solvent was evaporated. The resultant solid crude product was dried under vacuum and then purified by silica gel (230–400 mesh) column chromatography using $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CHCl}_3$ 1:4 as eluting solvent system. **Yield:** 320 mg (91%); **TLC** ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{CHCl}_3$ 1:2); **R_f:** 0.35; **$^1\text{H NMR}$** (500 MHz, CD_3CN) δ : 7.47, 6.07 (1H, *P-H*), 3.70 (s, 4H, $\text{CH}_{\text{carborane}}$), 3.10 (m, 6H, NCH_2CH_3), and 1.24 (t, 9H, NCH_2CH_3); **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR** (125 MHz, CD_3CN) δ : 47.96 (4C, C_{carb}), 47.74 (3C, NCH_2CH_3), and 9.24 (3C, NCH_2CH_3); **$^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ NMR** (120 MHz, CD_3CN) δ : 23.02 (s, 2B, $\text{B}^{8,8'}$), -2.83 (s, 2B, $\text{B}^{10,10'}$), -5.70 (s, 4B, $\text{B}^{9,9',12,12'}$), -7.94 (s, 2B, $\text{B}^{4,4'}$), -8.74 (s, 2B, $\text{B}^{7,7'}$), -18.89 (s, 4B, $\text{B}^{5,5',11,11'}$), and -27.85 (s, 2B, $\text{B}^{6,6'}$); **^{11}B NMR** (125 MHz, CD_3CN) δ : 23.02 (s, 2B, $\text{B}^{8,8'}$), -2.83 (d, 2B, $\text{B}^{10,10'}$), -5.70 (d, 4B, $\text{B}^{9,9',12,12'}$), -8.36 (t, 4B, $\text{B}^{4,4',7,7'}$), -18.91 (d, 4B, $\text{B}^{5,5',11,11'}$), and -27.84 (d, 2B, $\text{B}^{6,6'}$); **$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR** (202 MHz, CD_3CN) δ : -3.01 (s, *P-H*); **^{31}P NMR** (202 MHz, CD_3CN) δ : -3.00 (d, *P-H*); **ATR-IR** (cm^{-1}): 3621, 3029, 2993, 2544, 1609, 1474, 1446, 1393, 1218, 1152, 1137, 1094, 1025, 993, 981, 920, 903, 871, 849, 787, 743, 691, and 666. **UV-Vis** λ_{max} (nm): 297 and 445. **ESI-MS** (*m/z*): found 402.24 (calc. for $\text{C}_4\text{H}_{21}\text{O}_3\text{B}_{18}\text{P}_1\text{Co}_1$: 401.71).

Synthesis of 8,8'-bridged [8,8'-O₂P(O)SH-3,3'-Co(1,2-C₂B₉H₁₀)₂] HDBU phosphorothioate (13). H-phosphonate acid ester **12** (130 mg, 0.26 mmol) was dissolved in anhydrous MeOH (6.5 mL). The solution was added under argon atmosphere to S₈ (85 mg, 2.6 mmol). Then, 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en (DBU) (160 μL , 1.05 mmol) was added, and the mixture was stirred for 96 h at room temperature. Subsequently, solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in CH_3CN and then purified via silica gel column chromatography using a gradient of $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CHCl}_3$ from 1:4 to 1:1 as eluting solvent system. Finally, product **13** was eluted from the column using 100% MeOH as eluent. **Yield:** 105 mg (70%); **TLC** ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{CHCl}_3$ 2:1) **R_f:** 0.5; **$^1\text{H NMR}$** (500 MHz, CD_3CN) δ : 9.14 (s, 1H, *NH*), 3.58 (s, 4H, $\text{CH}_{\text{carborane}}$), 3.50 (m, 2H, NHCH_2CH_2), 3.44 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.31 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.69 (dd, $J = 6.6, 3.5$ Hz, 2H, NHCCH_2), 1.97 (dd, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 1.72 (m, 4H, $\text{NHCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), and 1.65 (dt, $J = 14.9, 5.2$ Hz, 2H, $\text{NHCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR** (125 MHz, CD_3CN) δ : 166.94 (NHCCH_2), 54.98 ($\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 49.26 ($\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 46.76 (C_{carb}), 46.63 (C_{carb}), 39.04 (NHCH_2), 33.42 (NHCCH_2), 29.47 ($\text{NHCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 27.05 ($\text{NHCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 24.52 ($\text{NHCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), and 19.96 ($\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); **$^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ NMR** (120 MHz, CD_3CN) δ : 23.46 (s, 2B, $\text{B}^{8,8'}$), -3.54 (s, 2B, $\text{B}^{10,10'}$), -5.72 (s, 4B, $\text{B}^{9,9',12,12'}$), -8.73 (s, 4B, $\text{B}^{4,4',7,7'}$), -19.49 (s, 4B, $\text{B}^{5,5',11,11'}$), and -28.25 (s, 2B, $\text{B}^{6,6'}$); **^{11}B NMR** (120 MHz, CD_3CN) δ : 23.46 (s, 2B, $\text{B}^{8,8'}$), -3.50 (d, 2B, $\text{B}^{10,10'}$), -5.74 (d, 4B, $\text{B}^{9,9',12,12'}$), -8.71 (d, 4B, $\text{B}^{4,4',7,7'}$), -19.53 (d, 4B, $\text{B}^{5,5',11,11'}$), and -28.34 (d, 2B, $\text{B}^{6,6'}$); **$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR** (202 MHz, CD_3CN) δ : 48.63 (s); **^{31}P NMR** (202 MHz, CD_3CN) δ : 48.62 (s); **ATR-IR** (cm^{-1}): 3383 (ν OH), 3223 (ν NH), 3091 (ν NH), 3026, 2926 (ν CH), 2856 (ν CH), 2799 (ν CH), 2545 (ν BH), 1725, 1640, 1607, 1465, 1444, 1363, 1321, 1292, 1205, 1157, 1103, 1076, 978, 936, 910, 887, 836, 747, and 690. **UV-Vis** λ_{max} (nm) 215, 296, and 450. **ESI-MS** (*m/z*): found 434.20 (calc. for $\text{C}_4\text{H}_{21}\text{O}_3\text{B}_{18}\text{P}_1\text{S}_1\text{Co}_1$: 433.78).

Synthesis of 8,8'-bridged [8,8'-O₂P(O)S(CH₂)_nOCPh₃-3,3'-Co(1,2-C₂B₉H₁₀)₂] HNEt₃ S-alkylated phosphorothioates 15 and 16. [8,8'-O₂P(O)SH-3,3'-Co(1,2-C₂B₉H₁₀)₂] HDBU (**13**) (13 mg, 0.02 mmol) was dissolved in acetone (0.520 mL); then, Et_3N (65 μL , 0.46 mmol) was added under stirring at room temperature. The mixture was heated to $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in an oil bath; then, alkylating agent **3** or **14** (0.04 mmol, dissolved in 130 μL of CH_2Cl_2) was added. The reaction mixture was maintained overnight at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ with stirring; then, it was cooled to room temperature, and solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was dispersed in CH_2Cl_2 and then filtered and the solution was loaded on silica gel column prepared in CH_2Cl_2 . Chromatography was performed using a gradient of MeOH in CH_2Cl_2 from 0 to 3% MeOH. (**15**): **Yield:** 17 mg (90%); **TLC** ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{CHCl}_3$ 1:2); **R_f:** 0.71;

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ 7.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 6H, *H_{arom}*), 7.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 6H, *H_{arom}*), 7.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, *H_{arom}*), 3.67 (s, 4H, *CH_{carborane}*), 3.07 (q, *J* = 7.3 Hz, 6H, *NCH₂CH₃*), 3.00 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H *SCH₂CH₂CH₂CH₂OTr*), 2.78 (dt, 2H, *SCH₂CH₂CH₂CH₂OTr*), 1.72 (m, *J* = 7.1 Hz, 2H *SCH₂CH₂CH₂CH₂OTr*), 1.64 (m, *J* = 6.9 Hz, 2H, *SCH₂CH₂CH₂CH₂OTr*), and 1.21 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, *NCH₂CH₃*); **¹³C{¹H} NMR** (126 MHz, CD₃CN): δ 145.55 (3C, *aromatic_{trityl}*), 129.54 (6C, *aromatic_{trityl}*), 128.87 (6C, *aromatic_{trityl}*), 128.01 (3C, *aromatic_{trityl}*), 87.30 (1C, *OC(Ph)₃*), 63.90 (1C, *SCH₂CH₂CH₂CH₂OTr*), 47.76 (overlapped 3C, *HNCH₂CH₃*, 4C, *CH_{carborane}*), 31.20 (1C, *SCH₂CH₂CH₂CH₂OTr*), 29.75 (1C, *SCH₂CH₂CH₂CH₂OTr*), 28.84 (1C, *SCH₂CH₂CH₂CH₂OTr*), and 9.29 (1C, *NCH₂CH₃*); **¹¹B{¹H} NMR** (160 MHz, CD₃CN): δ 23.08 (s, 2B, *B^{8,8'}*), −2.86 (s, 2B, *B^{10,10'}*), −5.54 (s, 4B, *B^{9,9',12,12'}*), −8.36 (s, 4B, *B^{4,4',7,7'}*), −18.87 (s, 4B, *B^{5,5',11,11'}*), and −27.70 (s, 2B, *B^{6,6'}*); **¹¹B NMR** (160 MHz, CD₃CN): δ 23.06 (s, 2B, *B^{8,8'}*), −2.87 (d, 2B, *B^{10,10'}*), −5.57 (d, 4B, *B^{9,9',12,12'}*), −8.16 (d, 4B, *B^{4,4',7,7'}*), −18.92 (d, 4B, *B^{5,5',11,11'}*), and −27.63 (d, 2B, *B^{6,6'}*); **³¹P NMR{¹H}** (202 MHz, CD₃CN): δ 16.72 (s), 11.37 (s); **³¹P NMR** (202 MHz, CD₃CN): δ 16.72 (t) and 11.37 (t); **ATR-IR (cm^{−1})** 3032 (ν CH aromatic), 2987 (ν CH aliphatic), 2925 (ν CH aliphatic), 2851 (ν CH aliphatic), 2681, 2566 (ν BH), 1727, 1595, 1474, 1447, 1392, 1264, 1200, 1134, 1103, 1068, 1032, 1016, 980, 941, 917, 901, 849, 735 (aromatic CH bending), and 705 (aromatic CH bending). **UV-Vis λ_{max}** (nm) 196, 299, and 440. **ESI-MS (*m/z*)**: found: 748.37 (calc. for C₂₇B₁₈H₄₃O₄P₁S₁Co₁: 748.24).

(16): Yield: 16 mg (86%); **TLC** (CH₃CN:CHCl₃ 1:2) **R_f**: 0.69; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃CN) δ: 7.43 (m, 6H, *H_{arom}*), 7.33 (m, 6H, *H_{arom}*), 7.25 (m, 3H, *H_{arom}*), 3.67 (s, 4H, *CH_{carborane}*), 3.10 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H *SCH₂CH₂CH₂OTr*), 3.08 (q, *J* = 7.3 Hz, 6H, *NCH₂CH₃*), 2.97 (dt, *J* = 14.9, 7.3 Hz, 2H, *PSCH₂CH₂CH₂OTr*), 2.58 (s, 1H, *CH₃OH*), 1.27 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H *PSCH₂CH₂CH₂OTr*), 1.22 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, *NCH₂CH₃*), and 1.18 (s, 3H, *CH₃OH*); **¹³C{¹H} NMR** (126 MHz, CD₃CN) δ: 145.27 (3C, *aromatic_{trityl}*), 129.45 (6C, *aromatic_{trityl}*), 128.78 (6C, *aromatic_{trityl}*), 127.94 (3C, *aromatic_{trityl}*), 87.25 (*OC(Ph)₃*), 62.71 (*PSCH₂CH₂CH₂OTr*), 55.13 (4C, *CH_{carb}*), 47.64 (*HNCH₂CH₃*), 47.59, 32.14, 31.98 (d, *J* = 6.1 Hz), 30.29, 29.66, 28.41 (d, *J* = 3.8 Hz), and 9.17 (*HNCH₂CH₃*); **¹¹B{¹H} NMR** (160 MHz, CD₃CN): δ (ppm) 23.08 (s, 2B, *B^{8,8'}*), −2.86 (s, 2B, *B^{10,10'}*), −5.53 (s, 4B, *B^{9,9',12,12'}*), −8.36 (s, 4B, *B^{4,4',7,7'}*), −18.87 (s, 4B, *B^{5,5',11,11'}*), and −27.70 (s, 2B, *B^{6,6'}*); **¹¹B NMR** (160 MHz, CD₃CN): δ 23.07 (s, 2B, *B^{8,8'}*), −2.92 (d, 2B, *B^{10,10'}*), −5.60 (d, 4B, *B^{9,9',12,12'}*), −8.38 (d, 4B, *B^{4,4',7,7'}*), −18.98 (d, 4B, *B^{5,5',7,7'}*), and −27.88 (d, 2B, *B^{6,6'}*); **³¹P{¹H} NMR** (202 MHz, CD₃CN) δ: 16.54 (s); **³¹P NMR** (202 MHz, CD₃CN) δ: 16.54 (t); **ATR-IR (cm^{−1})** 3032 (ν CH aromatic), 2987 (ν CH aliphatic), 2925 (ν CH aliphatic), 2851 (ν CH aliphatic), 2684, 2567 (ν BH), 1699, 1596, 1474, 1447, 1392, 1265, 1200, 1135, 1104, 1066, 1032, 1016, 980, 941, 917, 902, 849, 735 (aromatic CH bending), and 705 (aromatic CH bending). **UV-Vis λ_{max}** (nm) 194, 299, and 436. **ESI-MS (*m/z*)**: 734.35 (calc. for C₂₆B₁₈H₄₁O₄P₁S₁Co₁: 734.17).

Synthesis of 4-[1,3-bis(trityloxy)propan-2-yl-oxy]butyl-4-methylbenzenesulfonate (20). The reaction was performed under argon atmosphere in anhydrous conditions. 1,3-Bis(trityloxy)propan-2-ol (**18**) (2.35 g, 4.07 mmol) was dissolved in 18 mL of anhydrous DMF; then, NaH_{60%} (195 mg, 4.87 mmol) was added. After stirring for 15 min, 1,4-bis(*p*-toluenesulfonyloxy)butane [**40**] (4.23 g, 10.63 mmol), dissolved in 18 mL of DMF, was added. The reaction mixture was stirred for another 2 h at room temperature and was then cooled in ice bath; subsequently, an excess of NaH was centrifuged. The supernatant was poured into a cooled 40 mL volume of phosphate buffer. The mixture was extracted with AcOEt (4x 100 mL). Organic extracts were combined, washed with H₂O, and dried over MgSO₄. Solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified via silica gel column chromatography using a gradient of AcOEt in hexane from 0% to 10% as eluting solvent system. **Yield:** 883 mg (27%); **TLC** (Hexane:AcOEt 2:1) **R_f**: 0.55; **¹H NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.78 (d, 2H, *H_{arom}*), 7.41 (d, 12H, *H_{arom}*), 7.27 (m, 20H, *H_{arom}*), 4.04 (t, 2H, *OCH₂CH₂CH₂CH₂OSO₂*), 3.55 (p, 1H, *TrOCH₂CHOCH₂OTr*), 3.48 (t, 2H, *OCH₂CH₂CH₂CH₂OSO₂*), 3.23 (ddd, 4H, *TrOCH₂CH*), 2.43 (s, 3H, *CH₃tosyl*), 1.75 (m, 2H, *OCH₂CH₂CH₂CH₂OSO₂*), and 1.58 (m, 2H, *OCH₂CH₂CH₂CH₂OSO₂*); **¹³C{¹H} NMR** (125 MHz, CD₃CN) δ: 144.62 (1C, *aromatic_{tosyl}*), 144.05 (6C, *aromatic_{trityl}*), 133.19 (1C, *aromatic_{tosyl}*), 129.81 (2C, *aromatic_{tosyl}*), 128.73 (12C,

*aromatic*_{trityl}), 127.88 (2C, *aromatic*_{tosyl}), 127.76 (12C, *aromatic*_{trityl}), 126.91 (6C, *aromatic*_{trityl}), 86.52 (2C, OC(Ph)₃), 78.59 (1C, TrOCH₂CHOCH₂OTr), 70.51 (1C, OCH₂CH₂CH₂CH₂OSO₂-), 69.47 (1C, OCH₂CH₂CH₂CH₂OSO₂-), 63.39 (2C, TrOCH₂CH), 26.10 (1C, OCH₂CH₂CH₂CH₂OSO₂), 25.86 (1C, OCH₂CH₂CH₂CH₂OSO₂), and 21.64 (1C, CH₃^{tosyl}); **ATR-IR** (cm⁻¹): 3054, 3018, 2946, 2929, 2869, 1978, 1732, 1596, 1488, 1447, 1352, 1304, 1218, 1187, 1172, 1122, 1094, 1065, 1029, 992, 950, 922, 841, 811, 768, 745, and 699; **UV-Vis** λ_{max} (nm): 198, 229, and 260; **ESI-MS** (*m/z*): found 825.32 [M + Na]⁻, 841.29 [M + K]⁻, (calc. for C₅₂H₅₀O₆S₁ 803.01).

Synthesis of 8,8'-bridged {8,8'-O₂P(O)S[(CH₂)₄OCH(CH₂OCPH₃)₂]-3,3'-Co(1,2-C₂B₉H₁₀)₂} HNEt₃ (21). [8,8'-O₂P(O)SH-3,3'-Co(1,2-C₂B₉H₁₀)₂] HDBU (13) (440 mg, 0.75 mmol) was dissolved in 20 mL of anhydrous acetone; then, anhydrous Et₃N (2.15 mL, 15.42 mmol) was added to the resultant solution under stirring at room temperature. The mixture was heated to 60 °C; then, 4-[1,3-bis(trityloxy)propan-2-yl-oxy]butyl-4-methylbenzenesulfonate (20) (901 mg, 1.12 mmol), which was dissolved in 20 mL of anhydrous AcOEt, was added dropwise. After stirring overnight at 60 °C, the mixture was cooled, and the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was dispersed in CH₂Cl₂, filtered, and the filtrate was loaded into the silica gel column prepared in CH₂Cl₂. Chromatography was performed using a gradient of CH₃OH in CH₂Cl₂ from 0 to 3% of CH₃OH. **Yield:** 560 mg (64%); **TLC** (CH₃CN:CHCl₃ 1:2), R_f: 0.60; **¹H NMR** (600 MHz, CD₃CN) δ: 7.41 (d, 12H, *H*_{aromatic}), 7.31 (m, 18H, *H*_{aromatic}), 3.70 (s, 4H, *CH*_{carborane}), 3.60 (p, 1H, TrOCH₂CHOCH₂OTr), 3.45 (t, 2H, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O), 3.19 (ddd, 4H, CHOCH₂OTr), 3.10 (q, 6H, HNCH₂CH₃), 2.85 (dt, 2H, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O), 1.71 (m, 2H, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O), 1.61 (m, 2H, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O), and 1.24 (t, 9H, NCH₂CH₃); **¹³C{¹H} NMR** (125 MHz, CD₃CN) δ: 144.73 (6C, *aromatic*_{trityl}), 129.10 (12C, *aromatic*_{trityl}), 128.41 (12C, *aromatic*_{trityl}), 127.60 (6C, *aromatic*_{trityl}), 86.89 (2C, OC(Ph)₃), 78.47 (1C, TrOCH₂CHOCH₂OTr), 69.92 (1C, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O), 63.66 (2C, CHOCH₂OTr), 47.28 (3C, HNCH₂CH₃), 47.18 (4C, *CH*_{carborane}), 31.89 (1C, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O), 22.93 (1C, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O), 13.96 (1C, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O), and 8.80 (3C, HNCH₂CH₃); **¹¹B{¹H} NMR** (120 MHz, CD₃CN) δ: 23.02 (s, 2B, B^{8,8'}), -3.04 (s, 2B, B^{10,10'}), -5.67 (s, 4B, B^{9,9',12,12'}), -8.55 (s, 4B, B^{4,4',7,7'}), -19.07 (s, 4B, B^{5,5',11,11'}), and -27.99 (s, 2B, B^{6,6'}); **¹¹B NMR** (120 MHz, CD₃CN) δ: 23.02 (s, 2B, B^{8,8'}), -2.98 (d, 2B, B^{10,10'}), -5.64 (d, 4B, B^{9,9',12,12'}), -8.19 (d, 4B, B^{4,4',7,7'}), -19.05 (d, 4B, B^{5,5',11,11'}), and -27.99 (d, 2B, B^{6,6'}); **³¹P{¹H} NMR** (202 MHz, CD₃CN) δ (ppm) 16.49 (s); **³¹P NMR** (202 MHz, CD₃CN) δ: 16.48 (t); **ATR-IR** (cm⁻¹): 3031, 2929, 2870, 2564, 2564, 2161, 1978, 1644, 1595, 1489, 1447, 1322, 1202, 1134, 1096, 1031, 940, 899, 848, 763, 747, and 697; **UV-Vis** λ_{max} (nm): 196, 233, 299, and 453; **MS (ESI)** (*m/z*): found 1064.52 (calc. for C₄₉B₁₈H₆₃O₆P₁S₁Co₁ 1064.59).

Synthesis of 8,8'-bridged {8,8'-O₂P(O)S[(CH₂)₄OCH(CH₂OCPH₃)₂]-3,3'-Co[1-(CH₂)₂OH-1,2-C₂B₉H₁₀]}(1',2'-C₂B₉H₁₀) HNEt₃ (22) and {8,8'-O₂P(O)S[(CH₂)₄OCH(CH₂OCPH₃)₂]-3,3'-Co[1-(CH₂)₂OH-1,2-C₂B₉H₁₀]} [1'-(CH₂)₂OH-1',2'-C₂B₉H₁₀]} HNEt₃ (23). Compound 21 (175 mg, 0.15 mmol) was dried via co-evaporation with anhydrous benzene and then kept under vacuum over P₂O₅ overnight. Then, it was dissolved in anhydrous DME (3 mL), and the solution was cooled in CO₂/isopropanol cooling bath. After 15 min, n-BuLi (140 μL, 1.6 M solution in hexane, 1.5 eq) was added, and the reaction mixture was stirred for 10 min. Afterwards, the cooling bath was removed, and the mixture was stirred for next 10 min. Then, the reaction mixture was cooled again in cooling bath and another portion of n-BuLi (140 μL) was added. After 15 min, ethylene oxide (200 μL, 2.9–3.1 M solution in THF) was added, and the reaction was left overnight in cooling bath. Then, CH₂Cl₂ (5 mL) was added to the reaction mixture, the reaction was quenched via addition of water, and then the organic solution was washed three times with 5 mL portions of water. Organic layer was separated and dried over MgSO₄; then, solvents were evaporated. Crude product was purified, and mono- and bis-substituted products were separated via silica gel column chromatography using a gradient of MeOH in CH₂Cl₂ from 0 to 3% of MeOH. **(22): Yield:** 17 mg (10%); **TLC** (MeOH:CH₂Cl₂ 1:12.5); **R_f:** 0.13; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃CN): δ (ppm) 7.41 (d, 12H, *H*_{aromatic}), 7.31 (m, 18H, *H*_{aromatic}), 3.90 (s, *CH*_{carborane}), 3.78 to 3.54 (m, overlapped, *CH*_{carborane}, HOCH₂CH₂C_{carb}).

TrOCH₂CHOCH₂OTr), 3.44 (t, 2H, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O-), 3.19 (ddd, 4H, CHOCH₂OTr), 3.02 to 2.64 (m, overlapped, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O-, HOCH₂CH₂C_{carb}), and 1.65 (m, 4H, overlapped, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O); ¹¹B{¹H} NMR (120 MHz, CD₃CN) δ (ppm) 25.37, 24.65, 23.69, 22.93 (in ratio 2:2:1:1) 26.6 to 21.37 (m, overlapped diastereoisomeric B^{8,8'}), 0.52 to -11.61 (m, overlapped diastereoisomeric, B^{10,10',9,9',12,12',4,4',7,7'}), -12.05 to -11.61 (d, overlapped diastereoisomeric B^{5,5',11,11'}), and -21.45 to -28.25 (s, overlapped diastereoisomeric B^{6,6'}); ¹¹B NMR (120 MHz, CD₃CN) δ (ppm) 27.17 to 21.57 (m, overlapped diastereoisomeric B^{8,8'}), 2.85 to -11.77 (m, overlapped diastereoisomeric, B^{10,10',9,9',12,12',4,4',7,7'}), -11.82 to -21.00 (d, overlapped diastereoisomeric B^{5,5',11,11'}), and -21.10 to -29.92 (s, overlapped diastereoisomeric B^{6,6'}); ³¹P{¹H}NMR (202 MHz, CD₃CN) δ: 14.94, 14.58, 14.43, 14.12, and 13.49 (in ratio: 4:1:2:1.5:15); ³¹P NMR (202 MHz, CD₃CN) δ: 14.94 (t), 14.42 (t), 14.12 (t), 13.49 (t); ATR-IR (cm⁻¹): 3630, 3370, 3057, 3031, 2925, 2869, 2565, 2161, 1979, 1596, 1489, 1448, 1255, 1202, 1128, 1077, 1032, 985, 898, 871, 763, 746, and 699; ESI-MS (*m/z*): found: 1108.54 *m/z* (calc. for C₅₁B₁₈H₆₇O₇P₁S₁Co₁ 1108.64).

(23): Yield: 21 mg (12%); TLC (MeOH:CH₂Cl₂ 1:12.5): R_f: 0.27; ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ: 7.40 (d, 12H, H_{aromatic}), 7.31 (m, 18H, H_{aromatic}), 3.84 to 3.51 (m, overlapped, CH_{carborane}, HOCH₂CH₂-, TrOCH₂CHOCH₂OTr), 3.44 (t, 2H, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O-), 3.18 (ddd, 4H, CHOCH₂OTr), 3.12 to 2.66 (m, overlapped, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O, HOCH₂CH₂C_{carborane}), and 1.65 to 1.55 (m, 4H, overlapped, PSCH₂CH₂CH₂CH₂O); ¹¹B{¹H} NMR (120 MHz, CD₃CN) δ: 25.36, 24.41, 23.65, 22.80, 22.23 (in ratio 1:2:1.5:1:1), 26.59 to 20.45 (m, overlapped diastereoisomeric B^{8,8'}), 2.75 to -12.40 (m, overlapped diastereoisomeric, B^{10,10',9,9',12,12',4,4',7,7'}), and -12.34 to -24.64 (m overlapped diastereoisomeric B^{5,5',11,11',6,6'}); ¹¹B NMR (120 MHz, CD₃CN) δ: 26.65 to 20.21 (m, overlapped diastereoisomeric B^{8,8'}), 2.32 to -12.88 (m, overlapped diastereoisomeric, B^{10,10',9,9',12,12',4,4',7,7'}), -12.84 to -25.84 (m overlapped diastereoisomeric B^{5,5',11,11',6,6'}); ³¹P{¹H}NMR (202 MHz, CD₃CN) δ: 15.00, 14.16, 14.02, 13.38 (in ratio 5:1:3:1); ³¹P NMR (202 MHz, CD₃CN) δ: 15.99 (t), 14.40 (s), 14.01 (t), and 13.38 (t); ATR-IR (cm⁻¹): 3566, 3357, 3056, 3027, 2920, 2889, 2857, 2565, 2166, 1596, 1489, 1448, 1291, 1255, 1201, 1120, 1078, 1032, 1001, 889, 871, 764, 746, and 699 ESI-MS (*m/z*): found: 1152.57 (calc. for C₅₃B₁₈H₇₁O₈P₁S₁Co 1152.69).

5. Conclusions

Although derivatives of metallocarboranes containing various simple substituents attached to the boron or carbon atoms of the complex carboranyl ligands are abundant, they do not usually allow for further chemical transformations. The adducts of some metallocarboranes and cyclic ethers are notable exceptions. In this work, we proposed methods for filling this gap, at least partially, by using extendable ligands.

The exploitation of icosahedral metallocarborane's immense potential in various fields of chemistry and technology requires the availability of convenient and versatile methods for their modification with various functional moieties and/or linkers of various types and lengths. Herein, we report a convenient approach to introducing extendible arms on 8,8'-dihydroxy cobalt bis(1,2-dicarbollide). This approach can be used to introduce different hetero-bifunctional electrophiles containing a protected hydroxyl function that allows for further modification.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28104118/s1>. Supporting Information. Metallocarborane Synthons for Molecular Construction—Oligofunctionalization of Cobalt Bis(1,2-dicarbollide) on Boron and Carbon Atoms with Extendable Ligands. Figures S1–S91.

Author Contributions: Conceptualization, investigation, data curation, and writing—original draft preparation, K.Š.; conceptualization, investigation, data curation, and writing—original draft preparation, C.S.; conceptualization, validation, formal analysis, investigation, data curation, writing—review and editing, supervision, project administration, and funding acquisition, Z.J.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported in part by the National Science Center, Poland, grant 2015/16/W/ST5/00413.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or Supplementary Material.

Acknowledgments: The electrospray ionization (ESI) mass spectra for **10–13**, **15**, **16**, and **21–23**, were recorded using an Agilent 6546 LC/Q-TOF at the National Library of Chemical Compounds (NLCC) via a procedure established within the project POL-OPENSREEN financed by the Ministry of Science and Higher Education (decision no. DIR/WK/2018/06 of 24 October 2018). The authors thank Dorota Borowiecka and Agata Kraj of NLCC for recording the mass spectra.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the new compounds synthesized in this work are available from the authors.

References

1. Dash, B.P.; Satapathy, R.; Maguireband, J.A.; Hosmane, N.S. Polyhedral boron clusters in materials science. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 1955–1972. [[CrossRef](#)]
2. Nuñez, R.; Romero, I.; Teixidor, F.; Viñas, C. Icosahedral boron clusters: A perfect tool for the enhancement of polymer features. *Chem. Rev.* **2016**, *45*, 5137–5434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Leśnikowski, Z.J. Challenges and opportunities for the application of boron clusters in drug design. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 7738–7758. [[CrossRef](#)]
4. Messner, K.; Vuong, B.; Tranmer, G.K. The boron advantage: The evolution and diversification of boron's applications in medicinal chemistry. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Marfavi, A.; Kavianpour, P.; Rendina, L.M. Carboranes in drug discovery, chemical biology and molecular imaging. *Nat. Rev. Chem.* **2022**, *6*, 486–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Olejniczak, A.B.; Sut, A.; Wróblewski, A.E.; Leśnikowski, Z.J. Infrared spectroscopy of nucleoside and DNA-oligonucleotide conjugates labeled with carborane or metallacarborane group. *Vibr. Spectrosc.* **2005**, *39*, 177–185. [[CrossRef](#)]
7. Olejniczak, A.B.; Lesnikowski, Z.J. Boron clusters as redox labels for nucleosides and nucleic acids. In *Handbook of Boron Science*; Hosmane, N., Eagling, R., Eds.; World Scientific: Hackensack, NJ, USA, 2018; Volume 4, pp. 1–13.
8. Kodr, D.; Yenice, C.P.; Simonova, A.; Saftić, D.P.; Pohl, R.; Sýkorová, V.; Ortiz, M.; Havran, L.; Fojta, M.; Lesnikowski, Z.J.; et al. Carborane—Or metallacarborane-linked nucleotides for redox labelling. Orthogonal multipotential coding of all four DNA bases for electrochemical analysis and sequencing. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 7124–7134. [[CrossRef](#)]
9. Janczak, S.; Olejniczak, A.; Balabańska, S.; Chmielewski, M.K.; Lupu, M.; Viñas, C.; Lesnikowski, Z.J. The 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. [[CrossRef](#)]
10. Kaniowski, D.; Ebenryter-Olbinska, K.; Kulik, K.; Janczak, S.; Maciaszek, A.; Bednarska-Szczepaniak, K.; Nawrot, B.; Lesnikowski, Z.J. 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. [[CrossRef](#)]
11. Sivaev, I.B. Ferrocene and transition metal bis(dicarbollides) as platform for design of rotatory molecular switches. *Molecules* **2017**, *22*, 2201. [[CrossRef](#)]
12. Dash, B.P.; Satapathy, R.; Swain, B.R.; Mahanta, C.S.; Jena, B.B.; Hosmane, N.S. Cobalt bis(dicarbollide) anion and its derivatives. *J. Organomet. Chem.* **2017**, *849*, 170–194. [[CrossRef](#)]
13. Fink, K.; Boratyński, J.; Paprocka, M.; Goszczyński, T.M. Metallacarboranes as a tool for enhancing the activity of therapeutic peptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1457*, 128–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gozzi, M.; Schwarze, B.; Hey-Hawkins, E. Preparing (metalla)carboranes for nanomedicine. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 1533–1565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Barba-bon, A.; Salluce, G.; Lostalé-Seijo, I.; Assaf, K.I.; Henning, A.; Montenegro, J.; Nau, W.M. Boron clusters as broadband membrane carriers. *Nature* **2022**, *603*, 637–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Verdiá-Báguena, C.; Alcaraz, A.; Aguilera, V.M.; Cioran, A.M.; Tachikawa, S.; Nakamura, H.; Teixidor, F.; Viñas, C. Amphiphilic COSAN and I₂-COSAN crossing synthetic lipid membranes: Planar bilayers and liposomes. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6700–6703. [[CrossRef](#)]
17. Tarfés, M.; Canetta, E.; Paul, E.; Forbes, J.; Azzouni, K.; Viñas, C.; Teixidor, F.; Harwood, A.J. Biological interaction with living cells of COSAN-based synthetic vesicles. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 7804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Avdeeva, V.V.; Garaev, T.M.; Malinina, E.A.; Zhizhin, K.Y.; Kuznetsov, N.T. Physiologically active compounds based on membranotropic cage carriers—derivatives of adamantane and polyhedral boron clusters. *Russ. J. Inorg. Chem.* **2022**, *67*, 28–47. [[CrossRef](#)]

19. Sardo, C.; Janczak, S.; Leśnikowski, Z.J. Unusual resistance of cobalt bis dicarbollide phosphate and phosphorothioate bridged esters towards alkaline hydrolysis: The “metallacarborane effect”. *J. Organomet. Chem.* **2019**, *896*, 70–76. [[CrossRef](#)]
20. 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. [[CrossRef](#)]
21. Nekvinda, J.; Švehla, J.; Císařová, 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. [[CrossRef](#)]
22. Plešek, J.; Grüner, B.; Báča, J.; Fusek, J. 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 $[8,8′\text{-}\mu\text{-CH}_3\text{C(O)}_2 < (1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2\text{-3-Co}]_0$ zwitterion determined by X-ray diffraction analysis. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *649*, 181–190.
23. Sivaev, I.; Bregadze, V.I. Chemistry of cobalt bis(dicarbollides). A review. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1999**, *64*, 783–805. [[CrossRef](#)]
24. Van den Berg, R.J.B.H.N.; Korevaar, C.G.N.; Herman, S.; Overkleeft, H.S.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H. Effective, high-yielding and stereospecific total synthesis of d-erythro-(2R,3S)-sphingosine from d-ribo-(2S,3S,4R)-phytosphingosine. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5699–5704. [[CrossRef](#)]
25. Sivaev, I.B.; Bregadze, V.I. Lewis acidity of boron compounds. *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *270*, 75–88. [[CrossRef](#)]
26. Heseck, D.; Lee, M.; Noll, B.C.; Fisher, J.F.; Mobashery, S. Complications from dual roles of sodium hydride as a base and as a reducing agent. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2567–2570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Planas, J.G.; Teixidor, F.; Viñas, C.; Light, M.E.; Hursthouse, M.B. Self-assembly of halogenated cobaltacarborane compounds: Boron-assisted C-H X-B hydrogen bonds? *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2493–2502. [[CrossRef](#)]
28. Stogniy, M.Y.; Suponitsky, K.Y.; Chizhov, A.O.; Sivaev, I.B.; Bregadze, V.I. Synthesis of 8-alkoxy and 8,8′-dialkoxy derivatives of cobaltbis(dicarbollide). *J. Organomet. Chem.* **2018**, *865*, 138–144. [[CrossRef](#)]
29. Stawinski, J.; Strömberg, R. Di- and oligonucleotide synthesis using H-phosphonate chemistry. In *Methods in Molecular Biology, Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*; Herdewijn, P., Ed.; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, USA, 2008; Volume 288, pp. 81–100.
30. Jones, D.J.; O’Leary, E.M.; O’Sullivan, T.P. Synthesis and application of phosphonothioates, phosphonodithioates, phosphorothioates, phosphinothioates and related compounds. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 4279–4292. [[CrossRef](#)]
31. 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. [[CrossRef](#)]
32. King, B.R. Three-dimensional aromaticity in polyhedral boranes and related molecules. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1119–1152. [[CrossRef](#)]
33. Poater, J.; Viñas, C.; Bennour, I.; Escayola, S.; Solà, M.; Teixidor, F. Too persistent to give up: Aromaticity in boron clusters survives radical structural changes. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 9396–9407. [[CrossRef](#)]
34. Fulcrand-El Kattan, G.; Lesnikowski, Z.J.; Yao, S.; Tanius, F.; Wilson, W.D.; Shinazi, R.F. Carboranyl oligonucleotides. 2. Synthesis and physicochemical properties of dodecathymidylate containing 5-(o-carboranyl-1-yl)-2′-O-deoxyuridine. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7494–7501.
35. Lesnikowski, Z.J.; Shi, J.; Schinazi, R.F. Nucleic acids and nucleosides containing carboranes. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *581*, 156–169. [[CrossRef](#)]
36. Plešek, J. The age of chiral deltahedral borane derivatives. *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *289*, 45–50. [[CrossRef](#)]
37. Grüner, B.; Plzák, Z. High-performance liquid chromatographic separations of boron cluster compounds. *J. Chromatogr.* **1997**, *789*, 497–517. [[CrossRef](#)]
38. Horáková, H.; Grüner, B.; Vespalec, R. Emerging subject for chiral separation science: Cluster boron compounds. *Chirality* **2011**, *23*, 307–319. [[CrossRef](#)]
39. Van Swieten, P.F.; Rene Maehr, R.; van den Nieuwendijk, A.M.C.H.; Kessler, B.M.; Reich, M.; Wong, C.-S.; Kalbacher, H.; Leeuwenburgh, M.A.; Driessen, C.; van der Marel, G.A.; et al. Development of an isotope-coded activity-based probe for the quantitative profiling of cysteine proteases. *Bioorg. Chem. Med. Lett.* **2004**, *14*, 3131–3134. [[CrossRef](#)]
40. Martin, A.E.; Ford, T.M.; Bulkowski, J.E. Synthesis of selectively protected tri- and hexamine macrocycles. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 412–415. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity

Katarzyna Bednarska-Szczepaniak,^[a] Katarzyna Ebenryter-Olbińska,^[b] Gabriela Gajek,^[c] Krzysztof Śmiałkowski,^[a, e] Justyna Suwara,^[b] Lidia Fiedorowicz,^[d, e] and Zbigniew Leśnikowski*^[a]

A versatile method for the automated synthesis of composites containing DNA-oligonucleotides and boron cluster scaffolds and their assembly into functional nanoparticles is described. The obtained, torus-like nanoparticles carry antisense oligonucleotides that target two different oncogenes simultaneously. The nanoparticles exhibited notable silencing efficiency in vitro

in a pancreatic carcinoma cell line PANC-1 toward EGFR and c-Myc genes at the mRNA level, and a significant efficiency at the protein level. The proposed approach may be an attractive alternative to methods currently used, including one therapeutic nucleic acid, one genetic target, or the use of cocktails of therapeutic nucleic acids.

Introduction

Nearly half a century after Stephenson and Zamecnik proposed the concept of antisense oligonucleotides (ASOs), nucleic acid-based drugs^[1] are now a focus of clinicians and the pharmaceutical industry. In addition to ASOs, many other types of therapeutic nucleic acids (TNAs) have been developed. These TNAs have demonstrated potential in treating human diseases, such as cancer, viral infections, and genetic disorders, and as vaccines.^[2]

To date, sixteen oligonucleotide drugs and several COVID-19 vaccines have received regulatory approval from the FDA/EMA.^[2,3] A characteristic feature of these TNAs is that they are directed against one specific biological target and one specific RNA or DNA sequence. Consequently, TNAs currently used in clinical practice are administered as monotherapy.^[4]

Although work on the use of TNA combinations has been performed for many years^[5–7] this technology, based on the use of TNA cocktails of two or more components or their sequential administration, has not yet reached the stage of clinical applications.

Herein, we propose the use of nanoparticles composed of DNA and boron cluster building blocks comprising two different antisense oligonucleotides targeting two different oncogenes as a dual-acting single agent. To the best of our knowledge, no other type of nanoparticles, with or without boron clusters, with a dual mechanism of action has been described so far. Boron clusters were chosen as a scaffold for building blocks due to their rigid, ball-like structure which allows for precise spatial organization of the attached DNA oligonucleotides at the molecular level. Moreover, the use of different boron clusters allows for obtaining building blocks with different topologies, an important feature in the design and construction of functional nanoparticles. As model targets, EGFR^[8] and cellular myelocytomatosis oncogene (c-Myc)^[9] were chosen. Both proteins are overexpressed in several high-mortality human cancers, including pancreatic carcinomas, and are proven therapeutic targets.^[10,11]

Clinical data analysis for numerous cancers based on the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) web server of RNA expression data,^[12] revealed that a high level of mRNA was expressed for both proteins, EGFR and c-Myc, which is associated not only with a low survival rate but also with disease progression in metastatic pancreatic cancer (Figure S31). Therefore, we chose pancreatic cancer as a challenge and cancer type in our studies,^[13] and the human pancreatic cancer cell line PANC-1 as an in vitro model.^[14,15]

The described in this communication nanoparticles constitute the second generation of boron cluster-containing DNA nanomaterials. The first generation is nanoparticles made of only one type of building block, EGFR-silencing tripeds containing boron clusters and anti-EGFR antisense

[a] Dr. K. Bednarska-Szczepaniak, K. Śmiałkowski, Prof. Z. Leśnikowski
Laboratory of Medicinal Chemistry
Institute of Medical Biology, Polish Academy of Sciences
Lodowa Łódź, 106, 92-232, Lodz, Poland
E-mail: zlesnikowski@cbm.pan.pl

[b] Dr. K. Ebenryter-Olbińska, Dr. J. Suwara
Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences
Sienkiewicza Łódź, 112, 90-363 Lodz, Poland

[c] Dr. G. Gajek
Laboratory of Immunobiology of Infections
Institute of Medical Biology, Polish Academy of Sciences
Lodowa Łódź, 106, 92-232, Lodz, Poland

[d] L. Fiedorowicz
Laboratory of Mycobacterium Genetics and Physiology
Institute of Medical Biology Polish Academy of Sciences
Lodowa Łódź, 106, 92-232, Lodz, Poland

[e] K. Śmiałkowski, L. Fiedorowicz
Lodz Institutes of the Polish Academy of Science
The Bio-Med-Chem Doctoral School, University of Lodz, Poland

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/chem.202303531>

oligonucleotides.^[16,17] The second generation, dual-action nanoparticles are made of two types of building blocks, one capable of silencing EGFR and the second with an anti-c-Myc antisense oligonucleotide silencing c-MYC (Figure 1A). Silencing expression of both genes in the same cancerous cell should theoretically have a major benefit for inhibiting cancer progression.^[18] Another type of difference is the use of two different methods for the synthesis of building blocks containing DNA and a boron cluster, which also causes some subtle structural differences between them. It is also important that the new method, described in this work, is much simpler than the first one^[16] and more convenient.

Results and Discussion

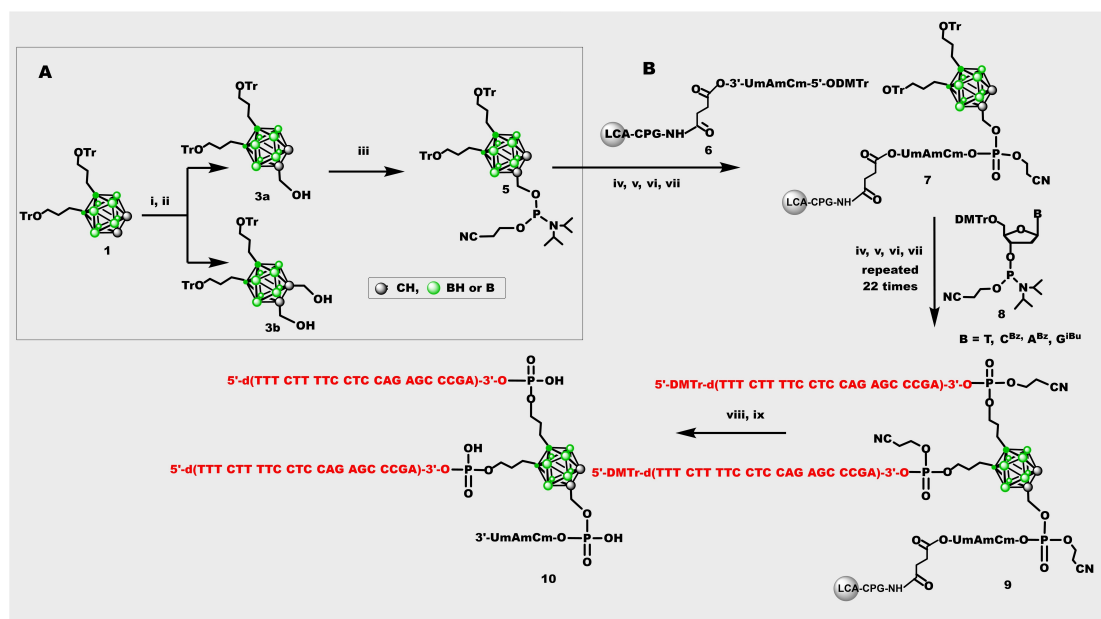
Automated Synthesis of 1,2-Dicarba-*closo*-Dodecaborane Triped 10 and 10 thio, and Oligonucleotides 11–14, and 11 thio–14 thio

To construct nanoparticles with dual antisense anti-EGF and anti-c-Myc activity, such as **10** + **11** + **12** (Scheme 1, Figure 1A), two types of building blocks were synthesized. The first one contains derivatives of the 1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane core (Scheme 1) at positions 9 and 12 with 22-mer DNA strands with sequence 5'-d(TTT CTT TTC CTC CAG AGC CCGA)-3',^[18] complementary (antisense) to the mRNA of the EGFR fragment

between 51 and 74 nt downstream of the AUG initiation codon,^[19] and at position 1 of the boron cluster with 3-mer 3'-UmAmCm-5' ("m" means 2'-OMe substituted), providing triped **10** (Scheme 1). The second building block is a DNA duplex linker, such as **11** + **12** composed of strand **11**, which contains an antisense oligonucleotide that targets the first five codons of the c-Myc mRNA^[20] and a sticky end part complementary to the 5' end of the 22-mer in **10**; and strand **12**, which contains a c-Myc sense fragment and a sticky end part complementary to **10** (Scheme 1, Figure 1A and Table 1). Mixing both types of components leads to the formation of circular and some fraction of linear nanoparticles containing boron clusters and both antisense oligonucleotides, anti-EGFR and anti-c-Myc, due to the formation of duplexes between **10** and linker **11** + **12** (Figure 1).

In the first stage of triped **10** synthesis, an oligofunctionalized boron cluster, 1-(2-hydroxymethyl)-9,12-bis(3-O-tritylprop-1-yl)-1,2-dicarba-*closo*-undecaborane (**3a**), was obtained,^[16,21, 22] which was a scaffold, and the antisense, anti-EGFR oligonucleotide were then synthesized thereon (Scheme 1). Under the conditions used, monosubstituted (**3a**) and disubstituted (**3b**) products are formed that can be easily separated by chromatographic methods.

The triped **10** differs from the building blocks described by us earlier^[16] in two important aspects, the first is the structure and the second is the method of its synthesis. In the first version of **10**,^[16] in position 1 of the boron cluster is a 2-



Scheme 1. A–Synthesis of 1-(2-hydroxymethyl)-9,12-bis(3-O-tritylprop-1-yl)-1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane (**3a**) and 1-[methyl-O-(N,N-diisopropyl-β-cyanoethyl)phosphoramidite]-9,12-bis(3-O-tritylprop-1-yl)-1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane (**5**). B–Automated, solid phase synthesis of triped **10** containing 1,2-dicarba-*closo*-dodecaborane 9,12-bis-functionalized with DNA oligonucleotides. A: (i) (CHO)_n (**2**) in TBAF/THF; (ii) H₂O; (iii) β-cyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphordiamidite (**4**), tetrazole in CH₃CN. B: (iv) detritylation, DMTr/MMTr, 3% DCA in CH₂Cl₂; (v) coupling: BMT activator (0.25 M in CH₃CN); (vi) oxidation: 0.1 M solution of I₂ in THF/H₂O/pyridine (70:10:20; v/v/v); (vii) capping: 5% phenoxyacetic anhydride in THF/pyridine and 10% solution of 1-methylimidazol/THF/pyridine (1:8:1; v/v/v) for 30 s; (viii) cleavage from the solid support and nucleobase deprotection: 1 mL NH₄OH (30%) overnight, (ix) detritylation: 2% TFA. A: (i) (CHO)_n (**2**) in TBAF/THF; (ii) H₂O; (iii) β-cyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphordiamidite (**4**), tetrazole in CH₃CN. B: (iv) detritylation, DMTr/MMTr, 3% DCA in CH₂Cl₂; (v) coupling: BMT activator (0.25 M in CH₃CN); (vi) oxidation: 0.1 M solution of I₂ in THF/H₂O/pyridine (70:10:20; v/v/v); (vii) capping: 5% phenoxyacetic anhydride in THF/pyridine and 10% solution of 1-methylimidazol/THF/pyridine (1:8:1; v/v/v) for 30 s; (viii) cleavage from the solid support and nucleobase deprotection: 1 mL NH₄OH (30%) overnight, (ix) detritylation: 2% TFA.

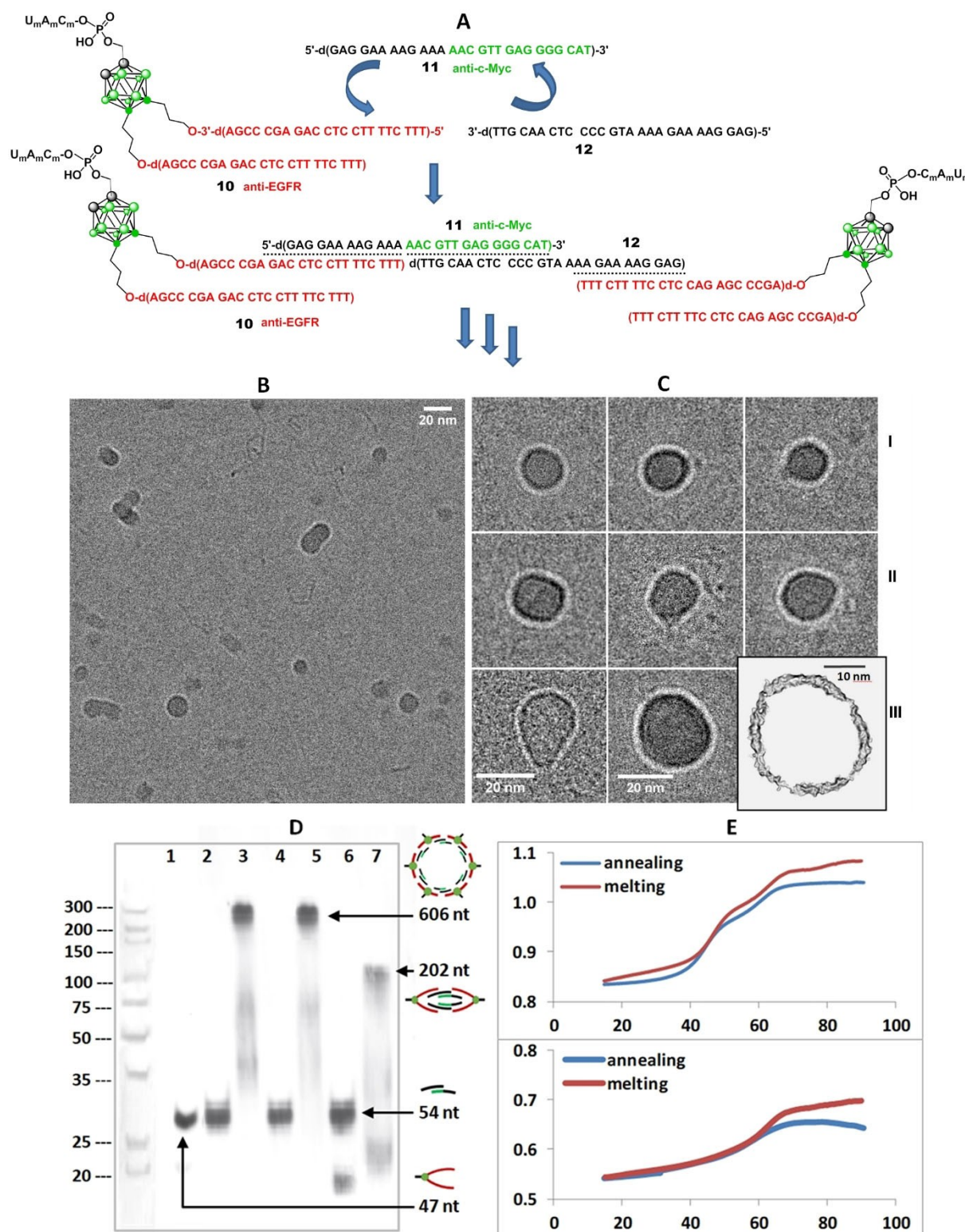












Figure 1. A—Schematic representation of the assembly of nanoconstruct **10** + **11** + **12** from triped **10** and double-stranded linker **11** + **12** with sticky ends 5'-d(GAGGAAAAGAAA...)-3' complementary to the 5'-terminal part of triped **10**. B and C—cryo-TEM images of complex **10** + **11** + **12** (1:1:1 molar ratio). B—Population of closed structures with a diameter of 12–30 nm; an admixture of linear, unclosed structures is also visible; scale bars of 20 nm are shown on representative images. C—Circular structures composed of 3 (I), 4 (II) and 5–6 (III) **10** + **11** + **12** units. The processed image is shown as an inserted graphic (lower right). D—Nondenaturing PAGE analysis of the self-assembly products of **10** and their partially complementary anti-c-Myc components used in equimolar amounts. On the left—marker; Lane 1—**10**; Lane 2—duplex **11** + **12**; Lane 3—three-component objects **10** + **11** + **12**; Lane 4—duplex **11 thio** + **12**; Lane 5—three-component objects **10 thio** + **11 thio** + **12**; Lane 6—duplex **11 thio** + **12 thio**; Lane 7—three-component objects **10 thio** + **11 thio** + **12 thio**. E—The UV-monitored thermal dissociation and association curves for the nanoconstruct **10** + **11 thio** + **12** ($T_m = 46.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$ and $61.1 \pm 1.1^\circ\text{C}$) and double-stranded linker **11 thio** + **12** ($T_m = 59.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$).

Table 1. Sequences of oligonucleotide building blocks: triped **10** and **10thio** targeted against EGFR and components of double-stranded linkers; hybrid oligonucleotide **11** containing anti-sense sequence targeted against c-Myc and sense fragment complementary with 5'-part of anti-EGFR oligonucleotide in **10**, and complementary sequence **12**; antisense oligonucleotide targeted against c-Myc **11thio** and complementary sequence **12thio**; and control oligonucleotides containing scramble sequences, **13**, **14** and **13thio**, **14thio**.

No.	Oligonucleotide sequence	m/z calc.	m/z MS	Rt [min]	UV [nm]
10	5'-d(TTT CTT TTC CTC CAG AGC CCGA)-  -CmAmUm-3'	14623.2	13628.3 ^[c]	11.6 ^[a]	265
10thio	5'-d( TTT CTT TTC CTC CAG AGC CCGA)-  -CmAmUm-3'	14715.7	13757.5 ^[c]	12.1 ^[a]	265
11	5'-d(GAG GAA AAG AAA AAC GTT GAG GGG CAT)-3'	8479.6	8478.5	12.4 ^[b]	255
12	5'-d(GAG GAA AAG AAA ATG CCC CTC AAC GTT)-3'	8310.5	8309.4	12.7 ^[b]	257
13	5'-d(GAG GAA AAG AAA CAT GGG GAG TTT CGA)-3'	8470.6	8469.4	12.1 ^[b]	257
14	5'-d(GAG GAA AAG AAA TCG AAA CTC CCC ATG)-3'	8319.5	8319.9	12.7 ^[b]	257
11thio	5'-d( GAG GAA AAG AAA AAC GTT GAG GGG CAT)-3'	8575.6	8576.4	13.1 ^[b]	255.4
12thio	5'-d( GAG GAA AAG AAA ATG CCC CTC  AAC GTT)-3'	8406.5	8406.3	13.3 ^[b]	256
13thio	5'-d( GAG GAA AAG AAA CAT GGG GAG  TTT CGA)-3'	8566.6	8566.3	13.6 ^[b]	257
14thio	5'-d( GAG GAA AAG AAA TCG AAA CTC  CCC ATG)-3'	8415.5	8415.3	13.3 ^[b]	258

[a] HPLC gradient Conditions B2, [b] HPLC gradient Conditions B1 (for details, please see SI section). **10** and **10thio**, boron cluster core loaded with two identical anti-EGFR 22-mers. [c] The m/z value corresponds to the fragmentation ion without the UmAmCm trinucleotide at boron 2. The zoomed part of the region of the spectrum in the mass range corresponding to the low-intensity molecular ion is shown as an insert in the mass spectra of tripeds **10** and **10thio** available in SI. 5'-terminal tetranucleotide in **10thio** containing three phosphorothioate groups is marked with a red frame. The hybrid of anti-c-Myc oligonucleotide **11**, nucleosides 13–28 from the 5'-end marked in green, and of sense, sticky fragment (nucleosides 1–12 from the 5'-end) complementary with the 5'-part of the anti-EGFR oligonucleotide in **10**. Hybrid oligonucleotide **12**, complementary to **11** within the anti-c-MYC sequence and to part of the **10** sequence at the 5'-end. **11thio** and **12thio**, counterparts of **11** and **12** protected at the 3'- and 5'-ends with tetranucleotides containing three phosphorothioate groups marked with a red frame. The hybrid of scramble oligonucleotide **13** within the anti-c-Myc part, nucleosides 13–28, and of sense, sticky fragment (nucleosides 1–12 from 5'-end) complementary with 5'-part of anti-EGFR oligonucleotide in **10**. Hybrid oligonucleotide **14** complementary to **13** within the scramble sequence and to part of the **10** sequence at the 5'-end. **13thio** and **14thio** counterparts of **13** and **14** protected at the 3'- and 5'-end with tetranucleotides containing three phosphorothioate groups marked with a red frame.

hydroxyethyl group, while in the new version, in position 1 is a 3-mer tail composed of 2'OMe nucleosides Um, Am, and Cm. This seemingly trivial difference is due to a completely different technique for synthesizing composites of boron clusters and DNA used in this work. In the original method, the LCA-CPG solid support was first prepared with the attached boron cluster,^[16,23] which was a tedious and time-consuming procedure, and the appropriate DNA oligomers were then synthesized on the boron cluster. In the present method, only the appropriate boron cluster phosphoramidite must be synthesized, such as **5**, and is then attached to a previously synthesized on LCA-CPG support short or longer DNA oligomer. Then, the appropriate DNA oligomers on the boron cluster are synthesized, as shown in Scheme 1.

The advantage of the new method is the use at each stage of the phosphoramidite chemistry and the automatic method of DNA synthesis that is commonly used.^[24,25]

The second building block is a DNA duplex linker, such as **11 + 12** (Figure 1A and Table 1). The antisense anti-c-Myc part in **11** is the 15-mer sequence 5'-d(AAC GTT GAG GGG CAT)-3' described in the literature.^[20] Another oligodeoxynucleotide used was oligonucleotide **13**, a counterpart of **11** with a scramble 15-mer sequence within the c-Myc part of **11** complementary to oligonucleotide **14**, used to build a control

double-stranded linker **13 + 14** (Table 1).^[26] Nucleolytic degradation of therapeutic nucleic acids in biological environments is a problem that necessitates constant attention for practical ASO applications. Hence, in clinical practice, phosphorothioate analogs of ASOs that contain some or all phosphorothioate bonds in the oligonucleotide backbone instead of the natural internucleotide linkages are often used.^[2,27] Therefore, all oligonucleotide derivatives used in our research (Table 1) were obtained not only in the basic version containing natural phosphodiester internucleotide linkages but also as derivatives **10thio** and **11thio–14thio**, which contain three phosphorothioate internucleotide linkages at the 5' and 3' ends (Table 1) (details of synthesis in SI). Due to the favorable physicochemical properties, sufficient thermodynamic stability of the formed nanoconstructs, and resistance to nucleolytic degradation (vide infra), **10 + 11thio + 12** was used in the silencing experiments with the target genes of EGFR and c-Myc.

Self-assembly of tripeds and components of the double-stranded linker into nanoconstructs 10 + 11 + 12, 10 + 13 + 14, 10 + 11 thio + 12, and 10 thio + 11 thio + 12 thio

The nanoconstructs were formed by annealing a mixture of tripod **10** or **10 thio** and components of DNA duplex linkers, such as **11**, **11 thio**, or **13**, and complementary strands **12**, **12 thio**, or **14** in a 1:1:1 molar ratio (detailed procedure in SI). Notably, when simply mixing components **10**, **11**, **12**, or **10**, **11 thio**, **12** at ambient temperature, an identical population of **10 + 11 + 12** or **10 + 11 thio + 12** nanoconstructs is formed, as observed when the mixture of components is heated and cooled (Figure 1A), which may be of practical importance and facilitate the use of nanoconstructs in practice. Through electrophoretic analysis, the assembled structures formed by tripeds **10** or **10 thio** and single-stranded oligonucleotide components **11–14** and **11 thio–12 thio** could be visualized.

Autoradiographic analysis reveals one dominant product accounting for approximately 300-base pair (606 nt) DNA constructs, which can correspond to circular complexes formed of a total of 6 tripeds **10** and 6 double-stranded linkers **11 + 12** as estimated in comparison to the dsDNA size marker. More precise sizes of the nanoobjects can be accessed from the cryo-TEM studies discussed below.

It should be emphasized that despite the clear tendency to form nanostructures of similar size, the pool of emerging objects is not fully homogeneous, and objects of various sizes are visible in the form of smears on PAGE gels (Figure 1D and Figure S33 and S34) and cryo-TEM images (Figure 1B).

The impact of the chemical modification of the components with phosphorothioate groups on the efficiency of the nanoconstruct assembly was also studied. It was found that the introduction of three phosphorothioate groups at both the 3'- and 5'- ends of one strand of a double-stranded linker, as in **11 thio + 12**, does not affect the ability to form nanoconstructs (Figure 1D). However, a different situation was observed when all components of the nanoconstruct: **10 thio**, **11 thio** and **12 thio** were protected with phosphorothioate internucleotide linkages at the ends of DNA-oligomers. In this case, the destabilizing effect of phosphorothioate groups, which are a mixture of P-diastereomers, on the stability of the duplexes formed prevents the formation of molecular structures higher than approximately 200 nt (Figure 1D).

It therefore seems that the destabilizing effect of phosphorothioate groups with undefined absolute configurations at the phosphorus atom, which is ignored in the case of phosphorothioate ASO drugs, is significant in the case of the self-assembly of DNA nanoconstructs. This phenomenon is discussed in more detail below in the section describing the thermodynamic properties of nanoconstructs.

Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM)

Samples for the cryo-TEM measurement were prepared in the same manner as for the physicochemical and biological studies, as described in the Materials and Methods section in SI. The

collected cryo-TEM measurement data were transferred to .mrc files, compressed, and subjected to lossless processing into images in .tiff format. Then, to visualize the structures, the images were subjected to contrast and smoothing (Figure 1B and 1 C).

Selected objects were analyzed individually, background noise was reduced and, using the denoising and finding edges functions, the contours of the structures were found (Figure 1C, inserted graphic). Structures were sized using ImageJ 1.54 tools.

For complex **10 + 11 + 12** used in this study, regular ring nanostructures are formed with various diameters ranging from 12 to 30 nm, which roughly corresponds to structures built of units **10 + 11 + 12** from 2 to 6 (Figure 1C), consisting of tripiped **10** and double-stranded linker **11 + 12**. Small amounts of linear, unclosed structures of varying lengths are also observed (Figure 1B).

Thermodynamic studies of nanoconstructs and their components

The appropriate nanoconstructs were subjected to UV-monitored thermal melting experiments. Nanoconstruct **10 + 11 thio + 12**, which was used as a dual-action silencing agent in biological experiments, and nanoconstructs **10 + 11 + 12**, **10 thio + 11 thio + 12 thio** as well as double-stranded linkers **11 thio + 12**, **11 + 12** and **11 thio + 12 thio** used for comparison, were tested. The thermodynamic parameters of the association/dissociation process were calculated with the MeltWin program.^[28] The selected thermodynamic data for the melting transitions and the respective melting temperatures for all tested duplexes are shown in Table 2, and full data are shown in Table S2. The graphical presentation of the **10 + 11 thio + 12** nanoconstruct and double-stranded linker **11 thio + 12** performance is presented in Figure 1E.

Table 2. Thermodynamic parameters and melting temperatures of the double strand to single strand duplex transitions for nanoconstruct **10 + 11 thio + 12** and of other structures tested for comparison.

Oligonucleotide	ΔG [kcal/mol]	T_m [°C] ^[a]	T_m [°C] ^[b]
10 + 11	-9.6 ± 0.0	48.1 ± 0.3	50.8 ± 0.2
10 + 12	-9.6 ± 0.0	48.1 ± 0.3	64.4 ± 0.3
11 + 12	-16.6 ± 0.4	63.8 ± 0.6	62.9 ± 0.4
10 + 12	-9.5 ± 0.2	41.1 ± 0.5	42.6 ± 0.8
10 + 11 thio	-9.8 ± 0.1	46.6 ± 0.8	46.6 ± 0.8
10 + 12	-9.8 ± 0.1	47.7 ± 0.6	61.2 ± 1.2
11 thio + 12	-14.6 ± 0.6	60.6 ± 0.7	59.9 ± 0.6
10 thio + 11 thio	-9.0 ± 0.3	42.2 ± 3.5	47.6 ± 1.6
10 thio + 12 thio	-9.0 ± 0.3	42.3 ± 3.5	60.4 ± 0.2
11 thio + 12 thio	-13.2 ± 0.6	59.1 ± 0.8	58.4 ± 1.0

[a] Thermodynamic parameters (T_m free Gibbs energy ΔG° ; enthalpy ΔH° and entropy ΔS° ; please see Table S2). [b] The melting temperatures were calculated using the first derivative method (for the two-component system) or second derivative for ternary models.

As expected, simple, two-component linkers containing three phosphorothioate internucleotide linkages at the 5' and 3' ends within one (**11 thio**+**12**) or both (**11 thio**+**12 thio**) complementary strands show lower T_m values than the corresponding linker without phosphorothioate modification **11**+**12**, indicating their lower stability: T_m **11**+**12** ($62.9 \pm 0.4^\circ\text{C}$) > T_m **11 thio**+**12** ($59.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$) > T_m **11 thio**+**12 thio** ($58.4 \pm 0.9^\circ\text{C}$). The melting profiles of three-component systems containing triped **10** (or **10 thio**) with a boron cluster as a core and double-stranded linker show two distinct points of inflection illustrating the biphasic character of the dissociation/association process of the nanoconstructs. An example of the melting curve for the nano-construct **10**+**11 thio**+**12** is shown in Figure 1E, which is also provided for comparison of its double-stranded linker **11 thio**+**12**. The melting curves for the other variants of the nanoconstructs, **10**+**11**+**12** and **10 thio**+**11 thio**+**12 thio**, are shown in Figure S36 in the SI. Comparing the T_m of the double-stranded linker **11 thio**+**12** ($59.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$) and the T_m of the duplex **10**+**12** formed by triped **10** and oligonucleotide **12**, which is part of the linker **11 thio**+**12**, ($42.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$) and the T_m of the biphasic dissociation of triped **10**+**11 thio**+**12** ($46.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$ and $61.1 \pm 1.1^\circ\text{C}$) (Table 2) allows us to propose the most likely nanoconstruct dissociation scheme. Thus, in the first stage, the double-stranded linker from triped **10** bearing the anti-EGFR antisense sequence was detached and then the double-stranded linker dissociated, leading to the release of the second active antisense oligonucleotide anti-c-Myc **11 thio**.^[29,30]

The trend observed for the destabilizing effect of the phosphorothioate groups on the stability of nanoconstructs measured by T_m value was similar to that on double-stranded linkers, although it was less pronounced: T_m **10**+**11**+**12** ($50.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$ and $64.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$) > T_m **10**+**11 thio**+**12** ($46.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$ and $61.1 \pm 1.1^\circ\text{C}$) \cong T_m **10 thio**+**11 thio**+**12 thio** ($47.6 \pm 1.6^\circ\text{C}$ and $60.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$).

Particular attention should be focused on the observed decrease in the stability of nanoconstructs, as measured by T_m after phosphorothioate groups (PS) are introduced.^[31] Replacing the achiral phosphodiester internucleotide linkage with a chiral phosphorothioate diester center that exhibits two distinct stereochemical configurations (designated S_P and R_P) can have a profound effect on the properties of modified TNAs.^[32]

Research on stereocontrolled chemical methods of internucleotide linkage formation in the synthesis of modified DNA/RNA has been conducted for a long time,^[32–34] but no practical and scalable methods have been reported thus far. As a result, mixtures of up to 2^n individual drug molecules (diastereoisomers of TNAs) differing in properties, in which n equals the number of chiral, internucleotide phosphorothioate linkages, are used in clinical practice as a compromise.^[35] However, our observations indicate that this compromise may be acceptable at the present stage of method development for the stereospecific synthesis of phosphorothioate modifications of nucleic acid drugs, but it is less acceptable when these mixtures are used as building blocks in nanoconstruction for chemotherapeutic or other applications. This is evidenced by the decrease in T_m of nanoconstructs **10 thio**+**11 thio**+**12 thio** in compar-

ison to **10**+**11**+**12** or **10**+**11 thio**+**12** and the inability of **10 thio**+**11 thio**+**12 thio** to create nanoconstructs with a higher molecular weight, as shown by PAGE studies (Figure 1D, Lane 7).

These results prompted us to use in gene silencing experiments the dual-action nanoconstruct **10**+**11 thio**+**12** that contains only one crucial component, **11 thio**, which is protected by phosphorothioate modifications. Based on the increased resistance of triped **10** to nucleolytic degradation due to the presence of the boron cluster modification observed earlier,^[37] protecting the triped with phosphorothioate modifications was abandoned.

Serum stability of nanoconstructs **10**+**11 thio**+**12** and **10**+**11**+**12**, corresponding to double-stranded linkers **11 thio**+**12** and **11**+**12** and single-stranded components **10**, **11**, and **11 thio**

To test the stability of the nanoconstructs used in silencing experiments and their components in biological environments, experiments using human serum were performed. Human serum contains several exo- and endonucleolytic activities that are responsible for the digestion of unmodified and phosphorothioate-modified oligonucleotides.^[36] We compared the stability of nanoconstruct **10**+**11**+**12**, which contains unprotected oligonucleotide components, and nanoconstruct **10**+**11 thio**+**12**, which contains anti-c-Myc antisense oligonucleotide **11** and **11 thio** protected with three phosphorothioate linkages at the 3' and 5' termini. The stability of protected and unprotected oligonucleotide building blocks **10** and **11**+**12** was also tested (for experimental details please see the SI section). The most stable form contained boron cluster modification triped **10** with $t_{1/2} = 19.5$ h and chimeric duplex **11 thio**+**12** with $t_{1/2} = 10.0$ h bearing **11 thio** protected with three phosphorothioate internucleotide linkages at both 3' and 5' ends and unprotected, complementary strand **12**. The nanoconstruct **10**+**11 thio**+**12** was less stable overall with $t_{1/2} = 7.6$ h. It should be remembered, however, that in the case of **10**+**11 thio**+**12** or **10**+**11**+**12**, the decrease in the concentration of the intact nanoconstruct is affected not only by enzymatic degradation but also, probably to a greater extent, by dissociation into the constituent parts containing the anti-EGFR antisense sequence **10** and the **11 thio**+**12** duplex containing the anti-c-Myc oligonucleotide **11 thio**. In this context, the slow dissociation of the nanoconstruct releasing active antisense oligonucleotides and the above-mentioned relatively high resistance to degradation of components **10** and **11 thio**+**12** is highly desirable. Unprotected nanoconstruct **10**+**11**+**12** was degraded faster, with a half-life $t_{1/2} = 4.9$ h, but remained more stable than **11**+**12** with $t_{1/2} = 2.3$ h, which became completely digested after 24 hours; only 14% remained after 6 hours (compared to the 30% stability of **10**+**11**+**12** and 60% stability of **11 thio**+**12**, Figure 2A). In addition to the protective function of phosphorothioate internucleotide linkages, the mentioned above possible effect of modification with a boron cluster on the increase in nucleolytic stability cannot be overlooked.^[37]

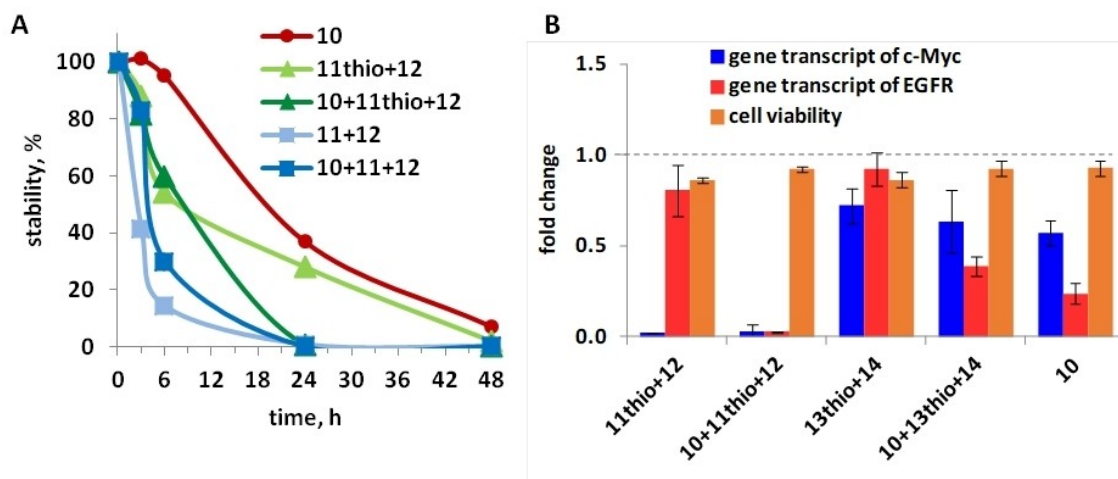


Figure 2. A—Stability of modified nanostructures with phosphorothioate (thio) internucleotide linkages (11 thio + 12, 10 + 11 thio + 12) in comparison to unmodified components (10, 11 + 12, 10 + 11 + 12) in human serum (experimental details are described in the SI section). B—Viability of PANC-1 cells (orange bars) and silencing of EGFR and c-Myc mRNA transcripts (red and blue bars) in the presence of nanoconstruct 10 + 11 thio + 12, its components 10 and 11 thio + 12 used for comparison, and 10 + 13 thio + 14 and 13 thio + 14 containing scramble sequence in 13 thio + 14 within the anti-c-Myc part of double-stranded module 11 thio + 12, used as negative control for c-Myc (100 nM, 24 h; experimental details are described in the “Reverse transfection” part in SI section).

Cytotoxicity of nanoconstruct 10 + 11 thio + 12, double-stranded linker 11 thio + 12, and controls

PANC-1 cells were treated with nanoconstructs 10 + 11 thio + 12 or a control 10 + 13 thio + 14 consisting of a scramble sequence instead of the anti-c-Myc sequence in the double-stranded linker. To determine the cytotoxicity of the constructs, an MTT viability assay was performed.

The cytotoxicities of the nanoconstruct components, triped 10 and double-stranded linkers 11 thio + 12 and 13 thio + 14, were also tested. All samples were tested for 24 h at a concentration of 100 nM, which was selected as optimal based on previous studies involving a nanoconstruct build of 10 and complementary triped that were directed against EGFR mRNA.^[16] Lipofectamine 3000 was used as the transfection reagent, which was not cytotoxic to cells (Figure S32). The MTT results indicate that the screened oligonucleotides are generally nontoxic to the cancer cells, and the mitochondrial activity is only slightly lowered under the conditions used (Figure 2B).

Silencing of human EGFR and c-MYC mRNA transcripts in PANC-1 cells line exposed to nanoconstruct 10 + 11 thio + 12. Real-time quantitative PCR assay

The procedure was performed analogously as described earlier^[38,39] and in detail in the SI section. A prominent and specific effect of the nanoconstruct 10 + 11 thio + 12 used at 100 nM on the abundance of the EGFR and c-Myc gene-specific transcripts was observed after 24 h, in which both gene transcripts were silenced (Figure 2B)

The specificity of the observed silencing activities is confirmed by the fact that the nanoconstruct 10 + 13 thio + 14 and double-stranded linker 13 thio + 14 that contain the

scramble sequence instead of the anti-c-Myc sequence showed no activity against the c-Myc gene. Triped 10 which contained an antisense sequence targeted against EGFR also exhibited silencing activity, but to a lesser extent than a full nanoconstruct. It also showed small, unspecific activity toward c-Myc transcription. Sequence-nonspecific effects of antisense oligonucleotides are well recognized. This results from the limited requirement of RNase H for long double-stranded substrates. This enzyme is highly specific regarding the type of its substrate's backbone, which must be mRNA/DNA-oligonucleotide heteroduplex; however, RNase H does not require full-length homology between the target mRNA and the incoming antisense oligonucleotide to recognize and cleave the mRNA strand.^[3] The presence of a centrally located boron cluster in 10 may increase its small, nonspecific activity. This hypothesis is supported by the increase in RNase H activity toward poly r(A) achieved by a short oligothymidylic acid containing boron cluster modification in the central part of the oligomer.^[37] One possible explanation of this phenomenon may involve the affinity of boron clusters toward both nucleic acids and proteins, which may result in transient “gluing” of the oligonucleotide substrate and the enzyme protein, facilitating mRNA cleavage.^[40,41]

Dual silencing of EGFR and c-MYC genes by nano-construct 10 + 11 thio + 12 in PANC-1 cells line. Intra-cellular protein staining

To evaluate the effect of the 10 + 11 thio + 12 construct on c-Myc and EGFR protein levels in PANC-1 cells, an intracellular labeling technique and cytometric measurements, as well as an immunochemical staining method and fluorescence microscopy, were used as described in detail in the SI section. The

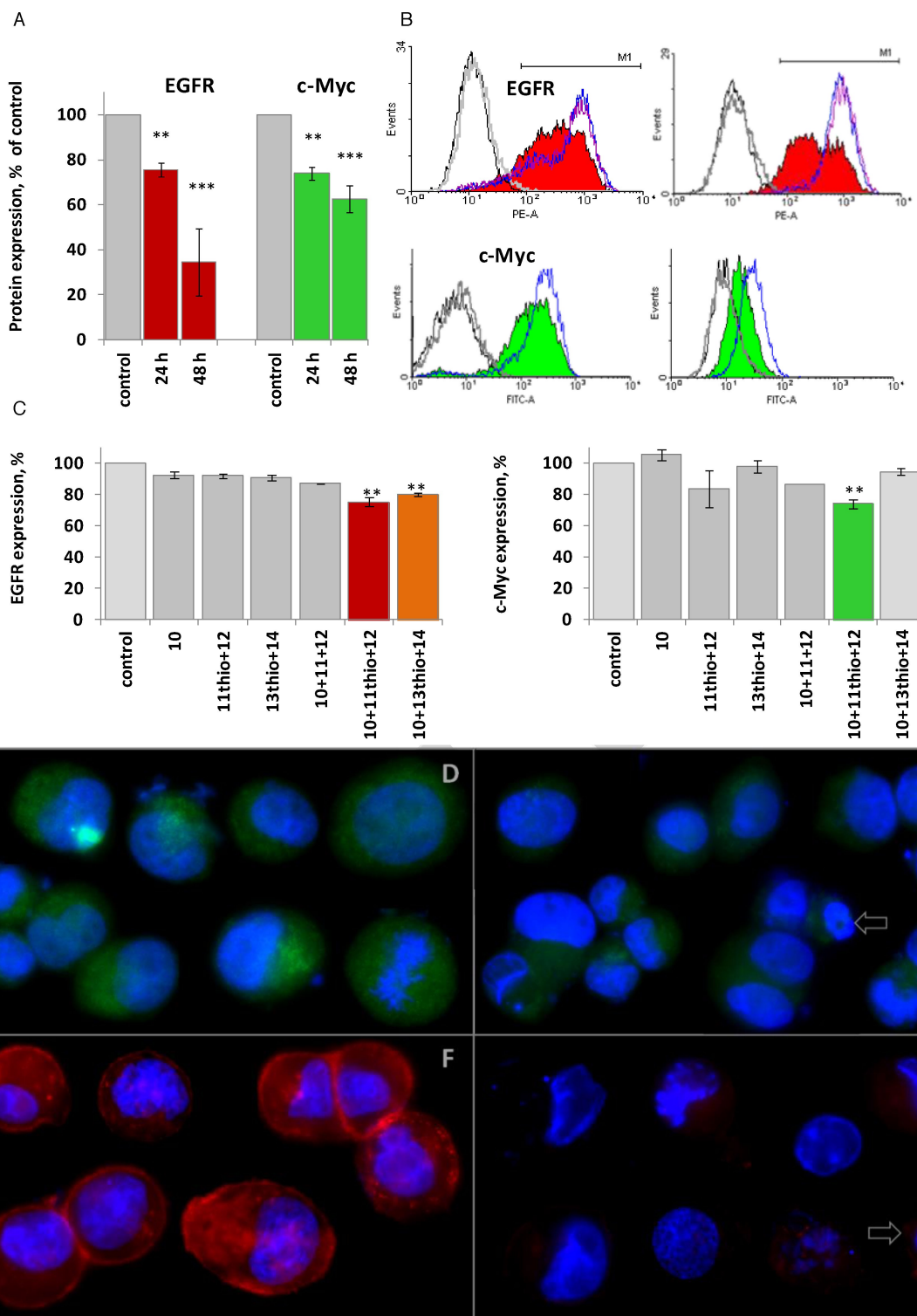


Figure 3. A—Expression of EGFR and c-Myc proteins in PANC-1 cells incubated with the 10 + 11 thio + 12 (100 nM) for 24 and 48 h, percentage of control cells; mean \pm SD, 3–6 repeats; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Bonferroni test). B—Representative histograms of EGFR and c-Myc protein expression in cells. Blue line histograms—control cells, color-filled—cells with the nanoconstruct, gray line - binding of nonspecific antibodies, black line—background fluorescence of non-stained cells. C—EGFR and c-MYC protein expression in cells treated 10 + 11 thio + 12, 10 + 11 + 12, 10 + 13 thio + 14, 10, 11 thio + 12, or 13 thio + 14 (100 nM, 24 h); mean \pm SD, 4–6 repeats; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Bonferroni test). D–G—Epifluorescence microscopy images of PANC-1 cells stained for intracellular visualization of c-Myc (green, D and E), EGFR (red, F and G), and for nuclei (blue, D–G); details are described in Materials and Methods in the SI. D and F—untreated cells, E and G—10 + 11 thio + 12-treated cells (100 nM, 48 h) 1000 \times magnification. Apoptotic nuclei are marked with an arrow (E and G).

activity of the 10 + 11 thio + 12 construct (100 nM) was assessed after 24 h and 48 h and compared to the activity of the

reference scramble 10 + 13 thio + 14 construct. The activity was also compared to other control samples, such as triped 10,

double-stranded linkers **11 thio** + **12** and **13 thio** + **14** and nanoconstruct **10** + **11** + **12**, without phosphorothioate protection of anti-c-Myc sequence **11**. After 24 h of incubation with cells, the **10** + **11 thio** + **12** construct reduced the levels of c-Myc and EGFR proteins by approximately 30% (Figure 2A and Figure 3C). The reference construct containing the scramble sequence instead of the anti-c-Myc sequence (**10** + **13 thio** + **14**) did not affect c-Myc expression as expected and reduced the level of EGFR protein by approximately 20% due to the anti-EGFR activity of **10** present within the structure of the nanoconstruct (Figure 3C). Triped **10** only slightly downregulated EGFR protein expression (Figure 3C). This demonstrates triped **10** more effectively reduces the expression of the EGFR protein when used as a part of nanostructures **10** + **11 thio** + **12** or **10** + **13 thio** + **14**. The nanoconstruct **10** + **11** + **12**, without phosphorothioate protection of anti-c-Myc sequence **11**, reduced the c-Myc protein level less efficiently than the nanoconstruct containing phosphorothioate-protected **11 thio** (Figure 3C). Prolonged incubation of cells with the **10** + **11 thio** + **12** construct (up to 48 h) resulted in a higher decrease in EGFR and c-Myc protein levels, EGFR (by up to 70%) and c-Myc (by 40%) (Figure 3A and 3B).

The c-Myc protein (stained green, Figure 3D and 3E), localized inside the cells, and EGFR (stained red, Figure 3F and 3G) in the cellular membrane were visualized with immunofluorescent images. Cells incubated with the dual anti-sense anti-EGFR and anti-c-MYC **10** + **11 thio** + **12** nano-construct after 48 h of treatment (Figure 3E and 3G) showed a marked decrease in the intensity of green (c-Myc) and red (EGFR) fluorescence. Moreover, as shown in the SI (Figure S35), a decrease in c-Myc- and EGFR-derived fluorescence in the cells was noted after 24 h incubation with the nanoconstruct (Figure S35). Characteristic apoptotic nuclei with chromatin condensation were visible in treated cells (Figure 3E and 3G, and Figure S35B and S35D).

Conclusions

A second generation of nanoconstructs composed of DNA and boron clusters, which contain two different antisense oligonucleotides that target two different oncogenes as a single, dual-action agent, was described. The pancreatic carcinoma and PANC-1 cell lines were selected as biological models, and the EGFR and c-Myc proteins were selected as biological targets for this study. The nanoparticles used to silence the biosynthesis of EGFR and c-Myc at the mRNA level were demonstrated to be highly efficient by the RT-PCR method, and a significant reduction in both protein levels in cells was observed by the intracellular protein staining method. The proposed dual-action nanoparticle approach may be an attractive alternative to the current monotherapy strategies, including one therapeutic nucleic acid, one genetic target, or the developmental use of cocktails containing different therapeutic nucleic acids. Contrary to these strategies, the strategy proposed in this work is a case of multidrug therapy, consisting of the simultaneous action of two different therapeutic nucleic acids on two different bio-

logical targets, in the same cell. Moreover, its uniqueness is related to the fact that both drugs are administered as one nanoparticle containing both therapeutic components. In addition, in the proposed strategy, dual-action nanoparticles are easily adapted to carry antisense oligonucleotides directed against other target genes, and the nanoparticles are easily optimized.

Supporting Information

Full experimental details, materials, methods, procedures and full characterization of all compounds, RP-HPLC traces, ESI-MS and ¹H-, ¹¹B-, ³¹P-NMR, FT-IR spectra, survival analysis for pancreatic adenocarcinoma patients for c-Myc and EGFR, PANC-1 cell viability in the presence of nanoconstructs at concentrations of 100 nM and 200 nM, table with full thermodynamic parameters for nanoconstructs and their components, additional PAGE gels.

The authors have cited additional references within the Supporting Information.^[42–46]

Acknowledgements

The authors thank Prof. M. Cedzyński and Prof. A. Świerko for access to the cell culture infrastructure and the gift of pooled human serum, Dr. Michał Rawski for assistance with cryo-TEM measurements. Ms. Dorota Borowiecka and Ms. Agata Kraj of the National Library of Chemical Compounds (NLCC) POL-OPENSOURCE for recording the mass spectra and Dr. Ewelina Wielgus of the Center of Molecular and Macromolecular Studies PAS for recording and refining the mass spectra of compounds **10** and **10 thio**. Funding by National Science Centre in Poland, grant No. 015/16/W/ST5/00413. The electrospray ionization (ESI) mass spectra for low molecular weight compounds 1–5 were recorded on Agilent 6546 LC/Q-TOF at the NLCC established within the project POL-OPENSOURCE financed by the Ministry of Science and Higher Education (decision no. DIR/WK/2018/06 of October 24, 2018). Purchase of the Bruker Avance NEO 400 NMR spectrometer used for ³¹P-NMR measurements was supported by the funds from the EU Regional Operational Program of the Lodz Region, RPLD.01.01.00-10-0008/18.).

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords: therapeutic nucleic acids · antisense oligonucleotides · EGFR and c-MYC oncogenes · anti-cancer therapy · boron cluster · nanoparticles

- [1] M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 285–288.
- [2] J. A. Kulkarni, D. Witzigmann, S. B. Thomson, S. Chen, B. R. Leavitt, R. Pieter, P. R. Cullis, R. van der Meel, *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16*, 630–643.
- [3] M. Egli, M. Manoharan, *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, 2529–2573.
- [4] *Combination Therapy Against Multidrug Resistance*, (Eds.: M. Wani, A. Ahmad), Academic Press, **2020**.
- [5] V. Elez, WO2004054657A1, **2003**.
- [6] X. Zhang, W. Niu, M. Mu, S. Hu, C. Niu, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2020**, *22*, 196.
- [7] R. R. Banala, S. K. Vemuri, G. H. Dar, V. Palanisamy, M. Penkulinti, M. V. Surekha, A. V. G. Reddy, M. R. Nalam, G. P. V. Subbai-ah, *Spine J.* **2019**, *19*, 896–904.
- [8] M. L. Uribe, I. Marrocco, Y. Yarden, *Cancers* **2021**, *13*, 2748.
- [9] C. V. Dang, L. M. S. Resar, E. Emison, S. Kim, Q. Li, J. E. Prescott, D. Wosney, K. Zeller, *Exp. Cell Res.* **1999**, *253*, 63–77.
- [10] V. Llombart, M. R. Mansour, *EBioMedicine* **2022**, *75*, 103756.
- [11] G. Donati, B. Amati, *Mol. Oncol.* **2022**, *16*, 3828–3854.
- [12] Z. Tang, C. Li, B. Kang, G. Gao, C. Li, Z. Zhang, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 98–102.
- [13] W. Park, A. Chawla, E. M. O'Reilly, *Jama* **2021**, *326*, 851–862.
- [14] A. K. Witkiewicz, E. A. McMillan, U. Balaji, G. Baek, W. C. Lin, J. Mansour, M. Mollaei, K. U. Wagner, P. Koduru, A. Yopp, M. A. Choti, C. J. Yeo, P. McCue, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6744.
- [15] H. Lin, C. Hu, S. Zheng, X. Zhang, R. Chen, Q. Zhou, *Aging* **2021**, *13*, 12493–12513.
- [16] D. Kaniowski, K. Ebenryter-Olbińska, K. Kulik, S. Janczak, A. Maciaszek, K. Bednarska-Szczepaniak, B. Nawrot, Z. J. Lesnikowski, *Nanoscale* **2020**, *12*, 103–114.
- [17] D. Kaniowski, K. Ebenryter-Olbińska, K. Kulik, J. Suwara, W. Cypryk, A. Jakóbi-Kolon, Z. J. Lesnikowski, B. Nawrot, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4863.
- [18] A. R. Nourazarian, A. G. Najar, S. Farajnia, A. Y. Khosroushahi, R. Pashaei-Asl, Y. Omid, *Asian Pac. J. Cancer P.* **2012**, *13*, 4751–4756.
- [19] A. K. Petch, M. Sohail, M. D. Hughes, I. Benter, J. Darling, E. M. Southern, S. Akhtar, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 819–830.
- [20] M. R. Bennett, S. Anglin, J. R. McEwan, R. Jagoe, A. C. Newby, G. I. Evan, *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 820–828.
- [21] T. Goto, K. Ohta, T. Suzuki, S. Ohta, Y. Endo, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6414–6424.
- [22] H. Nakamura, K. Aoyagi, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1167–1171.
- [23] S. Janczak, A. Olejniczak, S. Balabańska, M. K. Chmielewski, M. Lupu, C. Viñas, Z. J. Lesnikowski, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 15118–15122.
- [24] T. Brown, D. J. S. Brown in *Oligonucleotides and analogues. A Practical Approach*, (Ed. F. Eckstein), IRL Press, Oxford, **1991**, pp. 1–24.
- [25] Z. J. Leśnikowski, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 7738–7758.
- [26] J. S. Carroll, A. Swarbrick, E. A. Musgrove, R. L. Sutherland, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3126–3131.
- [27] S. Ochoa, W. T. Milam, *Molecules* **2020**, *25*, 4659.
- [28] J. A. McDowell, D. H. Turner, *Biochemistry* **1996**, *35*, 14077–89.
- [29] E. A. Lesnik, S. M. Freier, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10807–10815.
- [30] N. Sugimoto, N. Shu-Chi, M. Katoh, A. Matsumura, H. Nakamuta, T. Ohmichi, M. Yoneyama, M. Sasaki, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11211–11216.
- [31] C. A. Stein, *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 641–644.
- [32] N. Iwamoto, D. C. D. Butler, N. Svrzikapa, S. Mohapatra, I. Zlatev, D. W. Y. Sah Meena, S. M. Standley, G. Lu, L. H. Apponi, M. Frank-Kamenetsky, J. J. Zhang, C. Vargeese, G. L. Verdine, *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 845–851.
- [33] Z. J. Lesnikowski, *Nucleos. Nucleot.* **1992**, *11*, 1621–1638.
- [34] Z. J. Lesnikowski, *Bioorg. Chem.* **1993**, *21*, 127–155.
- [35] H. Jahns, N. Taneja, J. L. S. Willoughby, M. Akabane-Nakata, C. R. Brown, T. Nguyen, A. Bisbe, S. Matsuda, M. Hettlinger, R. M. Manoharan, K. G. Rajeev, M. A. Maier, I. Zlatev, K. Charisse, M. Egli, M. Manoharan, *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, 1221–1240.
- [36] H. Takakusa, N. Iwazaki, M. Nishikawa, T. Tokuyuki Yoshida, S. Obika, T. Inoue, *Nucleic Acid Ther.* **2023**, *33*, 83–94.
- [37] Z. J. Lesnikowski, G. Fulcrand, R. M. Lloyd, A. Juodawlkis, R. F. Schinazi, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5741–5746.
- [38] A. Szala, S. Sawicki, A. S. Swierzko, J. Szemraj, M. Sniadecki, M. Michalski, A. Kaluzynski, J. Lukasiewicz, A. Maciejewska, D. Wydra, D. C. Kilpatrick, M. Matsushita, M. Cedzynski, *Cancer Immunol. Immunother.* **2013**, *62*, 1411–1419.
- [39] A. S. Swierzko, K. Florczak, M. Cedzyński, J. Szemraj, D. Wydra, L. Bak-Romaniszyn, J. Emerich, Z. Sułowska, *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *56*, 959–971.
- [40] T. M. Goszczyński, K. Fink, K. Kowalski, Z. J. Leśnikowski, J. Boratyński, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9800.
- [41] D. Kaniowski, K. Kulik, J. Suwara, K. Ebenryter-Olbińska, B. Nawrot, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12190.
- [42] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, *Nat. Methods* **2019**, *9*, 676–682.
- [43] L. McAlary, J. A. Aquilina, J. J. Yerbury, *Front. Neurol. Neurosci.* **2016**, *10*, 499.
- [44] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55–63.
- [45] G. Gajek, B. Marciniak, J. Lewkowski, R. Kontek, *Molecules* **2020**, *25*, 658.
- [46] K. Bednarska-Szczepaniak, E. Przelazły, K. D. Kania, M. Szwed, M. Litecká, B. Grüner, Z. J. Leśnikowski, *Cancers* **2021**, *13*, 3855.

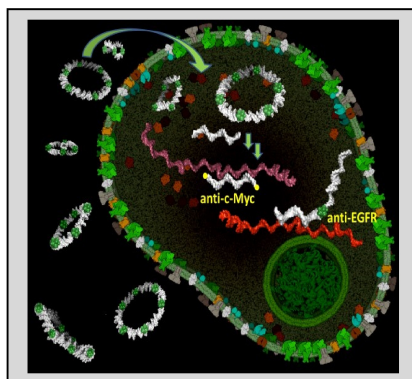
Manuscript received: October 25, 2023

Accepted manuscript online: January 12, 2024

Version of record online: ■ ■ ■ ■ ■

RESEARCH ARTICLE

A versatile method for the automated synthesis of composites containing DNA-oligonucleotides and boron cluster scaffolds and their assembly into functional nanoparticles is described. The torus-like nanostructures carry antisense oligonucleotides that target two different oncogenes and act as dual-action agents silencing two oncogenes EGFR and c-Myc simultaneously. The system can be readily adapted to target other biological components.



*Dr. K. Bednarska-Szczepaniak, Dr. K. Ebenryter-Olbińska, Dr. G. Gajek, K. Śmiałkowski, Dr. J. Suwara, L. Fiedorowicz, Prof. Z. Leśniowski**

1 – 11

Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity



OŚWIADCZENIE

Imię i nazwisko

Krzysztof Śmiałkowski

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo/ wydawnictwo, tom, strony:

Metallacarborane synthons for molecular construction—oligofunctionalization of cobalt bis(1,2-dicarbollide) on boron and carbon atoms with extendable ligands. Molecules 2023, 28, 4118.

Autorzy publikacji (w kolejności wskazanej w artykule):

Śmiałkowski, K.; Sardo, C.; Leśnikowski, Z. J.

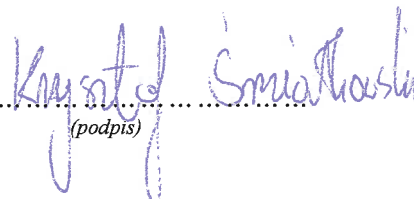
Oświadczam, że w publikacji *Metallacarborane synthons for molecular construction—oligofunctionalization of cobalt bis(1,2-dicarbollide) on boron and carbon atoms with extendable ligands.*

mój udział polegał na opracowaniu i optymalizacji metod otrzymywania opisanych związków, a w szczególności:

- a) Syntezie dialkoksy pochodnych 8,8'-dihydroksy COSANU: 8,8'-di(4-O-trytyloksypropylo)- oraz 8,8'-di(3-O-tertbutylo-dimetylosililoksy)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu (III)
- b) Syntezie 8,8'-di(3-hydroksypropylo)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu (III)
- c) Syntezie 1-hydroksyetylo-8,8'-di(3-O-tertbutylo-dimetylosililoksy)-bis(1,2-dikarbolido)-3,3'-kobaltanu (III)
- d) Syntezie cyklicznego tiofosforanu bis(8,8'-dihydroksy-1,2-dikarba-closo-dodekaborano)-3,3'-kobaltanu (III)
- e) Syntezie liniowych oraz rozgałęzionych odczynników alkilujących oraz wykorzystanie ich do S-alkilowania cyklicznego tiofosforanu bis(8,8'-dihydroksy-1,2-dikarba-closo-dodekaborano)-3,3'-kobaltanu (III)
- f) Syntezie hydroksyetylo-C-podstawionych S-alkilowych pochodnych cyklicznego estru kwasu tiofosforowego 8,8'-dihydroksy-[bis(1,2-dikarba-closo-dodekaborano)]-3,3'-kobaltanu (III)

Pełnej charakterystyce otrzymanych połączeń metodami chromatograficznymi i spektroskopowymi, określeniu struktury oraz stereochemii wszystkich otrzymanych pochodnych wykorzystując spektroskopię rezonansu magnetycznego ^1H -, ^{13}C -, ^{11}B -, ^{31}P -NMR, spektroskopię UV-VIS oraz spektrometrii ESI-MS, ze szczególnym uwzględnieniem i analizą asymetrii badanych cząstek co stanowi ważny i oryginalny wkład w lepsze zrozumienie stereochemii tych połączeń. Brałem udział w przygotowaniu, redagowaniu i korektach manuskryptu.

Łódź, dnia 25.05.2024


.....
(podpis)

Fisciano, 10/05/2024

DECLARATION / STATEMENT

First name and last name

Carla Sardo

Affiliation

University of Salerno, Department of Pharmacy. Via Giovanni Paolo II, 132, Fisciano (SA), Italy

Title of publication, year of publication, magazine / publishing house, volume, pages:

Metallacarborane synthons for molecular construction—oligofunctionalization of cobalt bis(1,2-dicarbollide) on boron and carbon atoms with extendable ligands. *Molecules* 2023, 28, 4118.

Authors of publications (in the order indicated in the article):

Śmiałkowski, K.; Sardo, C.; Leśnikowski, Z. J.

Description of contribution: *(performance of experiments, statistical analysis of results, interpretation of results, preparation of the manuscript text, management of a scientific project including research described in this work, etc.).*

Performance of experiments and original manuscript drafting.

Fisciano, 10/05/2024

.....

.....

(signature)



Załącznik Nr 6
do Regulaminu - Postępowanie w Sprawie Nadania Stopnia
Doktora Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu w Dyscyplinie
Nauki Medyczne w Instytucie Biologii Medycznej PAN

OŚWIADCZENIE

Imię i nazwisko:

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo/ wydawnictwo, tom, strony:

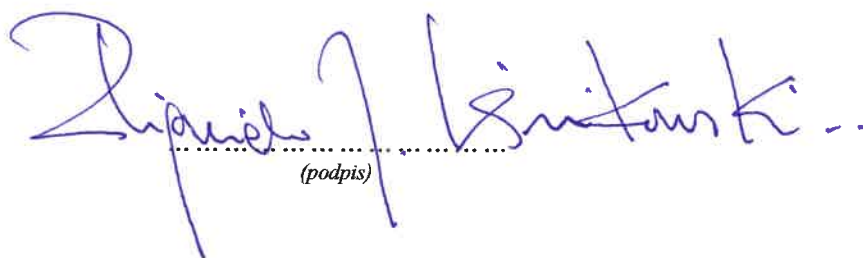
Metallacarborane Synthons for Molecular Construction— Oligofunctionalization of Cobalt Bis(1,2-dicarbollide) on Boron and Carbon Atoms with Extendable Ligands. Molecules 2023, 28, 4118. <https://doi.org/10.3390/molecules28104118>

Autorzy publikacji: (w kolejności wskazanej w artykule):

Smiałkowski K., Sardo C., Lesnikowski Z.J.

Oświadczam, że w publikacji: Metallacarborane Synthons for Molecular Construction— Oligofunctionalization of Cobalt Bis(1,2-dicarbollide) on Boron and Carbon Atoms with Extendable Ligands mój udział polegał na: pozyskaniu funduszy na badania, sformułowaniu ogólnej koncepcji, nadzorze nad badaniami, udziale w napisaniu i wyedytowaniu pracy.

Łódź, dnia 15 maja 2024 r.


(podpis)

OŚWIADCZENIE

Imię i nazwisko

Krzysztof Śmiałkowski

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo/ wydawnictwo, tom, strony:

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

Autorzy publikacji (w kolejności wskazanej w artykule):

Bednarska-Szczepaniak, K.; Ebenryter-Olbińska, K.; Gajek, G.; Śmiałkowski, K.; Suwara, J.; Fiedorowicz, L.; Leśnikowski Z.

Oświadczam, że w publikacji *Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity.*

mój udział polegał na:

Opracowaniu i optymalizacji metody otrzymywania 1-hydroksymetylo- oraz 1,2-dihydroksymetylo-9,12-bis(3-O-trytyloksyprop-1-ylo)-1,2-dikarba-closo-dodekaboranu jako platform dla antysensowych DNA-oligonukleotydów. pełnej charakterystyce otrzymanych połączeń metodami chromatograficznymi i spektroskopowymi, określeniu struktur oraz stereochemii otrzymanych pochodnych klastra boranowego przy pomocy spektroskopii rezonansu magnetycznego ^1H -, ^{13}C -, ^{11}B -NMR oraz widm spektrometrii masowej ESI-MS. Byłem odpowiedzialny także za opracowanie wyników części chemicznej do publikacji, a także brałem udział w pisaniu i korektach manuskryptu na kolejnych etapach jego publikacji.

Łódź, dnia ...25.05.2024

...Krzysztof Śmiałkowski
(podpis)

Załącznik Nr 6
do Regulaminu - Postępowanie w Sprawie Nadania Stopnia
Doktora Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu w Dyscyplinie
Nauki Medyczne w Instytucie Biologii Medycznej PAN

OŚWIADCZENIE

Imię i nazwisko:

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo/ wydawnictwo, tom, strony:

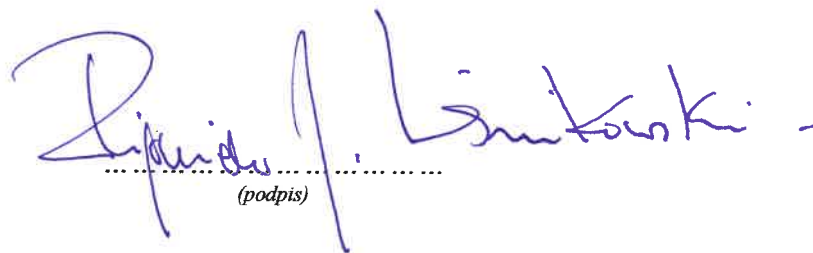
Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity Chem. Eur. J. 2024, e202303531

Autorzy publikacji: (w kolejności wskazanej w artykule):

Bednarska-Szczepaniak, K.; Ebenryter-Olbińska, K.; Gajek, G.; Śmiałkowski, K.; Suwara, J.; Fiedorowicz, L.; Leśnikowski Z.

Oświadczam, że w publikacji: *Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity*, mój udział polegał na: *pozyskaniu funduszy na badania, sformułowaniu ogólnej koncepcji, nadzorze nad badaniami, udziale w napisaniu i wyedytowaniu pracy.*

Łódź, dnia 15 maja 2024 r.


.....
(podpis)

OŚWIADCZENIE

Imię i nazwisko:

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo/ wydawnictwo, tom, strony:

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

Autorzy publikacji: (w kolejności wskazanej w artykule):

Bednarska-Szczepaniak, K.; Ebenryter-Olbińska, K.; Gajek, G.; Śmiałkowski, K.; Suwara, J.; Fiedorowicz, L.; Leśnikowski Z.

Oświadczam, że w publikacji: *Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity.*

mój udział polegał na:

Planowaniu, wykonaniu, opracowaniu do druku i opisaniu w manuskrypcie części biologicznej dotyczącej metody mikroskopowej i znakowania wewnątrzkomórkowego białek; analizie klinicznych danych ekspresji białek (materiały SI); opracowaniu i przygotowaniu do druku wyników badań cryo-TEM; formatowaniu „template” artykułu; wykonaniu wykresów i rycin części biologicznej 1B,C i 3; opracowaniu graficznym rycin 1D,E i 2 (współudział); opracowaniu części biologicznej do materiałów SI (współudział); redagowaniu poprawek do manuskryptu (współudział).

Łódź, dnia 10.05.2024

.....*K. Bednarska-Szczepaniak*.....
(podpis)

OŚWIADCZENIE

Imię i nazwisko:

dr inż. Katarzyna Ebenryter-Olbińska

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo/ wydawnictwo, tom, strony:

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

Autorzy publikacji: (w kolejności wskazanej w artykule):

Bednarska-Szczepaniak, K.; Ebenryter-Olbińska, K.; Gajek, G.; Śmiałkowski, K.; Suwara, J.; Fiedorowicz, L.; Leśnikowski Z.

Oświadczam, że w publikacji: *Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity.*

mój udział polegał na:

opracowaniu metody i przeprowadzeniu eksperymentów chemicznych prowadzących do przekształcenia trytylowej pochodnej klastra boranowego w jednostkę zdolną do wbudowania w łańcuch oligonukleotydowy z wykorzystaniem metody amidofosforynowej na fazie stałej, udział w tej syntezie oraz oczyszczanie i przeprowadzenie analiz fizykochemicznych produktów uzyskiwanych na poszczególnych jej etapach. Byłam też odpowiedzialna za przygotowanie wszystkich pozostałych modyfikowanych oraz niemodyfikowanych oligonukleotydów wykorzystywanych do badań prezentowanych w powyższej publikacji. Prowadziłam również eksperymenty, które posłużyły wyznaczeniu parametrów termodynamicznych dupleksów utworzonych z tripedów oraz komplementarnych do nich niemodyfikowanych oligonukleotydów.

Byłam osobą zaangażowaną w opracowywanie wyników do manuskryptu oraz redagowania publikacji.

Łódź, dnia 11.05.2024....

Ebenryter - Olbińska
(podpis)

OŚWIADCZENIE

Imię i nazwisko:

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo/ wydawnictwo, tom, strony:
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

Autorzy publikacji: (w kolejności wskazanej w artykule):
Bednarska-Szczepaniak, K.; Ebenryter-Olbińska, K.; Gajek, G.; Śmiałkowski, K.; Suwara, J.; Fiedorowicz, L.; Leśnikowski Z.

Oświadczam, że w publikacji: *Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity.*

mój udział polegał na:

- wykonaniu testu MTT oraz rt-PCR
- przygotowaniu opisu wyżej wymienionych metod
- opracowaniu wyników testu MTT oraz rt-PCR

Lódź, dnia 10.05.2024

dr. Golonka Gajek
(podpis)

OŚWIADCZENIE

Imię i nazwisko:

Justyna Suwara

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo/ wydawnictwo, tom, strony:

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

Autorzy publikacji: (w kolejności wskazanej w artykule):

Bednarska-Szczepaniak, K.; Ebenryter-Olbińska, K.; Gajek, G.; Śmiałkowski, K.; Suwara, J.; Fiedorowicz, L.; Leśnikowski Z.

Oświadczam, że w publikacji: *Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity.*

mój udział polegał na:

wykonaniu analiz elektroforetycznych mających na celu ocenę efektywności składania jak i stabilności nukleolitycznej badanych nanokonstruktów.

Łódź, dnia 22.05.2024

Suwara Justyna
.....

(podpis)

OŚWIADCZENIE

Imię i nazwisko: *LIDIA FIEDOROWICZ*

Tytuł publikacji, rok wydania, czasopismo/ wydawnictwo, tom, strony:

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

Autorzy publikacji: (w kolejności wskazanej w artykule):

Bednarska-Szczepaniak, K.; Ebenryter-Olbińska, K.; Gajek, G.; Śmiałkowski, K.; Suwara, J.; Fiedorowicz, L.; Leśnikowski Z.

Oświadczam, że w publikacji: *Synthesis of DNA-boron cluster composites and assembly into functional nanoparticles with dual, anti-EGFR, and anti-c-MYC oncogene silencing activity.*

mój udział polegał na:
*przygotowaniu kompozycji do badań biologicznych oraz ocenie ich jakości
w rozdzielce elektroforetycznym PAGE; opisie metodologii w publikacji.*

Łódź, dnia *22/05/2024*.....

Lidia Fiedorowicz
.....
(podpis)