

Eliza Filipiak,

dr Justyna Gołębiewska ✉

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

https://doi.org/10.18388/pb.2021_425

✉ autor korespondujący: jgoliebiewska@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: Nukleozydo boranofosfoniany, zastosowania biologiczne, środki terapeutyczne, terapia antysensowa, siRNA, aptamery

Wykaz stosowanych skrótów: BNCT – terapia borowo-neutronowa; FDA (Food and Drug Administration) – Agencja Żywności i Leków

Podziękowania: Publikacja powstała w ramach realizacji projektu badawczego Preludium 16, 2018/31/N/ST5/03589, finansowanego ze środków przyznawanych przez Narodowe Centrum Nauki.

STRESZCZENIE

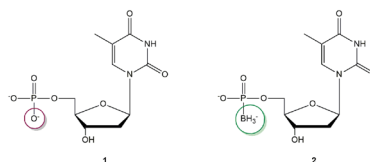
Nukleozydo boranofosfoniany to analogi nukleotydów w których jeden z niemoistkowych atomów tlenu z części fosforanowej został zastąpiony grupą boranową (-BH₃). Związki te wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, między innymi aktywują rybonukleazę H, są odporne na działanie endo- i egz nukleaz, a ich trifosforany są dobrymi substratami dla polimeraz DNA i RNA. Pochodne nukleozydo boranofosfonianów stosowane są między innymi w terapii antysensowej, w wyciszaniu ekspresji genów za pomocą techniki siRNA oraz jako potencjalne proleki antywirusowe i antynowotworowe. Boranofosfoniany są także wykorzystywane przy projektowaniu aptamerów oraz w nowej metodzie sekwencjonowania DNA. W niniejszej pracy skróto przedstawiono potencjalne biologiczne zastosowania boranofosfonianów.

WPROWADZENIE

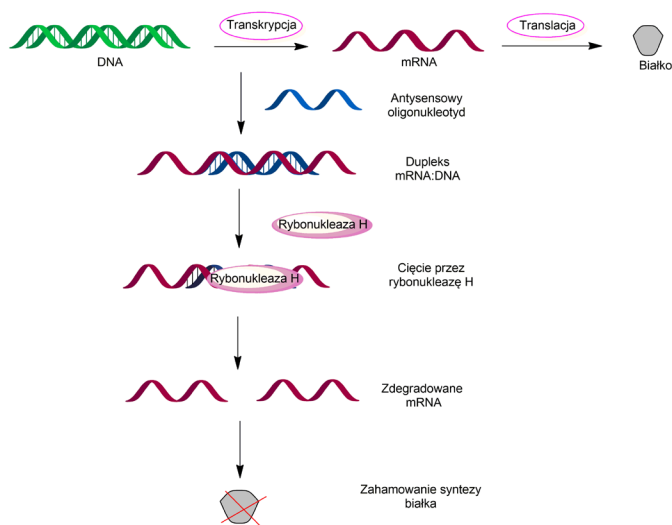
W ostatnich latach rośnie zainteresowanie cząsteczkami zawierającymi w swojej strukturze atom lub atomy boru, ze względu na ich obiecujące właściwości biologiczne, które sprawiają, że związki te mogą być potencjalnie wykorzystywane w biochemii i medycynie jako nowe środki terapeutyczne lub diagnostyczne [1-3]. Jedną z klas związków, zawierającą atom boru w formie grupy boranowej (-BH₃) są nukleozydo boranofosfoniany. Są to analogi nukleotydów, w których jeden z niemoistkowych atomów tlenu z części fosforanowej został zastąpiony funkcją -BH₃ (Ryc. 1) [4]. Wprowadzenie grupy boranowej do cząsteczki powoduje zwiększenie lipofilowości cząsteczki, podwyższenie odporności na działanie nukleaz komórkowych oraz stabilność w podwyższonej temperaturze (odporność na hydrolizę i utlenianie) [1]. Sprawia to, że boranowe pochodne nukleotydów mogą łatwiej przeniknąć do komórki, wolniej ulegają rozkładowi w medium komórkowym i dlatego, w porównaniu do naturalnych nukleotydów, są lepszymi kandydatami do zastosowań terapeutycznych [1]. Boranofosfoniany, dzięki swoim unikalnym właściwościom mogą być więc wykorzystywane jako substraty w terapii antysensowej [2], przy projektowaniu nowych proleków [4], w wyciszaniu ekspresji genów za pomocą strategii siRNA [5], w nowej metodzie sekwencjonowania DNA [6] oraz przy wytwarzaniu aptamerów metodą SELEX [7]. Dodatkowo, możliwość aktywowania rybonukleazy H przez oligonukleotydy zawierające nukleozydo boranofosfoniany [8], wysoka odporność hydrolityczna tych związków na działanie nukleaz komórkowych [9] oraz fakt, że ich 5'-trifosforany są substratami dla polimeraz DNA i RNA [6], sprawia, że mogą być wykorzystywane jako narzędzia badawcze w biologii molekularnej np. w poznawaniu mechanizmów procesów enzymatycznych oraz przy projektowaniu nowych terapeutyków [1].

BORANOFOSFONIANY W TERAPII ANTYSSENSOWEJ

Antysensowe oligonukleotydy są to syntetyczne oligonukleotydy zaprojektowane do tworzenia dupleksów z mRNA zgodnie z regułami Watsona-Cricka [10]. Nazywane są antysensowymi, ponieważ posiadają sekwencję antysensowej nici DNA, z której transkrybowana jest sensowa nić mRNA. Po wnikięciu do komórki, antysensowy oligonukleotyd składający się średnio z około 12–20 jednostek nukleotydów znajduje swoją unikalną, komplementarną sekwencję sensową w puli mRNA, hybrydyzuje z docelową cząsteczką tworząc heterodupleks mRNA:DNA rozpoznawany przez enzym rybonukleazę H, która ka-



Rycina 1. Porównanie struktury 5'-fosforanu tymidyny (1) i 5'-boranofosfonianu tymidyny (2).

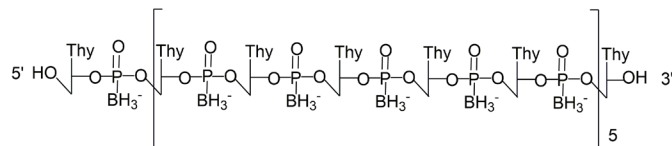


Rycina 2. Schemat ideowy przedstawiający proces wyciszania ekspresji genów za pomocą techniki antysensowej.

talizuje proces degradacji nici mRNA w tej hybrydzie i tym samym uniemożliwia dalszą ekspresję genu (zatrzymanie procesu translacji, Ryc. 2).

Strategia antysensowa stwarza wiele możliwości do selektywnej regulacji ilości szkodliwego białka w komórce i dlatego mechanizm ten jest wykorzystywany w celach terapeutycznych [11,12]. Pierwszym lekiem antysensowym był zatwierdzony w 1992 roku przez FDA *Afovirsen* (oligonukleozydo tiofosforan), który hamował replikację wirusa brodawczaka ludzkiego. Niestety lek ten nie przeszedł dalszych badań klinicznych i ostatecznie nie został wprowadzony na rynek [13]. Do tej pory tylko 6 syntetycznych oligonukleotydów wykazało wyraźny efekt terapeutyczny w bardzo rygorystycznych badaniach klinicznych i zostały zatwierdzone przez FDA jako leki w terapii antysensowej. Związki te to między innymi *Eteplirsen* (30-nukleotydowy fosforomorfolido oligonukleotyd) stosowany w leczeniu dystrofii mięśniowej Duchenne'a oraz *Nusinersen* (18-nukleotydowy 2'-O-metoksyetoksy oligonukleozydo tiofosforan zawierający fragment 5-metylocytydyny) stosowany w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni [14].

Obecnie trwają intensywne badania nad różnymi modyfikacjami nukleotydów, które mogłyby być wykorzystywane w terapii antysensowej, gdyż naturalne oligonukleotydy nie są wystarczająco efektywne, ponieważ ulegają szybkiej degradacji przez nukleazy, a dodatkowo, ich duża polarność utrudnia transport przez błony komórkowe. Niestety większość antysensowych oligonukleotydów, pomimo trwałości w środowisku komórkowym i dużej lipofilowości, nie powoduje aktywacji rybonukleazy H, dlatego proces wyciszania ekspresji genów nie zachodzi wydajnie. I tu właśnie jednym z przykładów analogów nukleotydów, które spełniają wszystkie kryteria efektywnych środków antysensowych są oligonukleozydo boranofosfoniany. Związki te, dzięki obecności grupy boranowej, są bardziej lipofilowe, przez co łatwiej przenikają przez błony komórkowe, są również bardziej odporne na degradację przez nukleazy oraz co

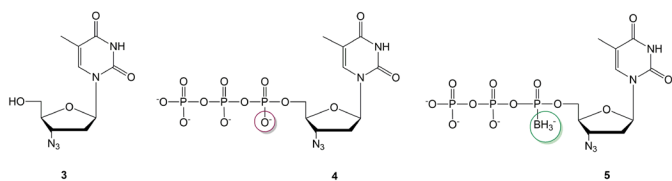


Rycina 3. Przykład całkowicie boranowanego oligonukleotydu, który tworzy kompleksy z DNA jak i z RNA.

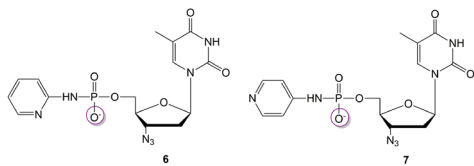
najważniejsze – ich dupeksy są rozpoznawane przez rybonukleazę H (również patrz niżej), która dokonuje cięcia nici RNA w kompleksie mRNA:DNA powodując jej degradację i zahamowanie syntezy białka. Włączenie pojedynczego boranowego nukleotydu do łańcucha oligonukleotydowego nie ma większego wpływu na stabilność termodynamiczną tworzących dupeksów, natomiast w pełni zmodyfikowane grupą boranową oligonukleotydy są mniej trwałe przez co znacząco aktywują działanie rybonukleazy H. Stwierdzono że, całkowicie zmodyfikowany grupami boranofosfonianowymi łańcuch oligonukleotydowy (Ryc. 3) hybryduje do komplementarnego DNA lub RNA tworząc dupeksy [9] co potwierdziło, że nukleozydo boranofosfoniany mogą być rozważane jako potencjalne terapeutyki antysensowe. Boranofosfoniany mają duży potencjał biologiczny, który może być wykorzystywany dla projektowania nowych czynników antywirusowych, antynowotworowych lub przeciwzapalnych [2].

BORANOFOSFONIANY JAKO LEKI PRZECIWWIRUSOWE

Prowadzone są również badania nad wykorzystaniem pochodnych nukleozydo boranofosfonianów jako leków przeciwwirusowych nakierowanych na inhibicję procesu odwrotnej transkrypcji i zahamowanie replikacji materiału genetycznego wirusa (np. wirusa HIV) [15]. Nukleozydo boranofosfoniany pełnią zwykle rolę proleków, które jako takie są nieaktywne biologicznie, dopiero po wnikięciu do komórki zostają ufosforylowane przez kinazy komórkowe do aktywnych biologicznie trifosforanów (5, Ryc. 4) [16]. W takiej formie dideoksynukleozydo 5'- α -P-boranotrifosforany hamują replikację wirusa przez włączenie się do sekwencji wirusowego DNA, co powoduje terminację procesu odwrotnej transkrypcji [1]. Przykładem analogów nukleotydowych stosowanych w terapii przeciwtretowirusowej są związki zawierające AZT (3'-azydotymidynę) (3, Ryc. 4) jako część nukleozydową. Niestety, wysoka polarność fosforanów utrudnia ich transport do komórki, dlatego zaczęto projektować związki zawierające grupy maskujące ładunek ujemny w cząsteczce poprzez przyłączenie lipofilowych fragmentów do części fosforanowej.



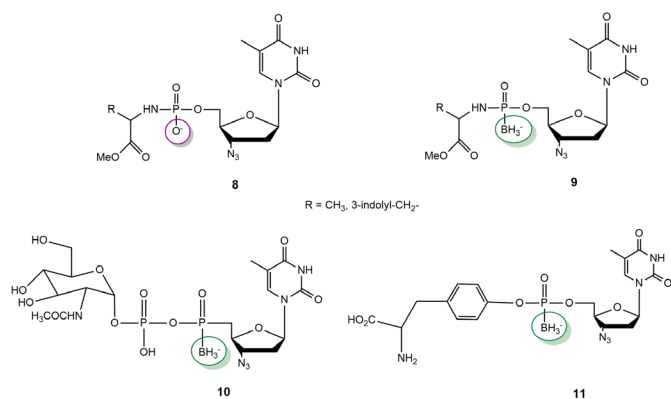
Rycina 4. Struktura AZT (3) trifosforanu AZT (4) i α -P-boranotrifosforanu AZT (5).



Rycina 5. Analogi 5'-fosforanów AZT zawierające aryloaminy jako grupy maskujące zaproponowane przez grupę A. Kraszewskiego.

Wiele grup badawczych na całym świecie zajmuje się projektowaniem różnego typu pronukleotydów [17-20]. Takie badania były prowadzone między innymi w grupie A. Kraszewskiego [21,22] gdzie zaproponowano nukleotydowe pochodne AZT, w których grupę maskującą stanowiły aryloaminy (6, 7, Ryc. 5). Związki te wykazywały wysoką aktywność przeciwwirusową oraz bardzo niską cytotoxyczość [21]. Dokładny mechanizm działania tych związków nie został poznany, lecz uważa się, że pochodne zawierające aryloaminy jako grupy maskujące mogą hamować działanie odwrotnej transkryptazy HIV poprzez blokadę jego miejsca aktywnego lub poprzez oddziaływania allosteryczne [21].

Ciekawym przykładem proleku nakierowanego na inhibicję procesu odwrotnej transkrypcji wirusa HIV, jest zaproponowana przez grupę badawczą C. R. Wagnera pochodna monofosforanu AZT, w której połączony z atomem fosforu aminokwas pełnił rolę grupy maskującej (8, Ryc.6) [20]. Analogi tego typu były dalej modyfikowane poprzez wprowadzenie grupy boranowej, co zostało opisane w pracach B. R. Shaw *et al.* [4] (9, 10, 11, Ryc. 6). Okazało się, że tak modyfikowane związki łączą w sobie zalety boranofosfonianów jak i amidofosforanów oraz posiadają wyższą aktywność przeciwwirusową, większą biodostępność oraz niższą toksyczość niż referencyjny nukleozyd AZT (3). Dodatkowo, obecność grupy boranowej zwiększa siłę wiązania substratu do odwrotnej transkryptazy HIV [15] dzięki czemu enzym ten jest w stanie wbudować efektywniej zmodyfikowane nukleotydy w materiał genetyczny wirusa, czyniąc pochodne nukleozydo boranofosfonianów potencjalnymi kandydatami do zastosowania jako leki przeciwwirusowe.



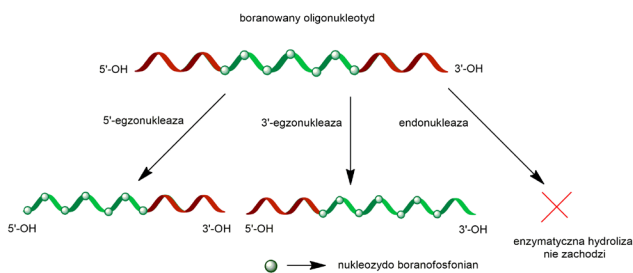
Rycina 6. Struktury potencjalnych proleków: amidofosforanu AZT (8) i innych pochodnych boranofosfonianów (9, 10, 11).

ODDZIAŁYWANIE NUKLEOZYDO BORANOFOSFONIANÓW Z ENZYMAMI

Polimerazy to enzymy, których zadaniem jest synteza komplementarnych nici DNA lub RNA. Wyróżnia się polimerazę DNA, która syntetyzuje nić DNA w procesie replikacji oraz polimerazę RNA, która bierze udział w procesie transkrypcji, czyli przy przepisywaniu informacji genetycznej z DNA na mRNA. Oligonukleozydo boranofosfoniany można otrzymać metodami enzymatycznymi używając polimerazy DNA oraz odpowiednich nukleozydo 5'- α -P-boranotrifosforanów jako substratów. Reakcje te są stereoselektywne: jedynie izomer o konfiguracji R_p centrum boranofosfonianowego jest rozpoznawany przez odpowiednią polimerazę, a reakcja zachodzi z inwersją konfiguracji na atomie fosforu [23]. Stwierdzono, że oligonukleozydo boranofosfoniany otrzymane metodami enzymatycznymi mogą hybrydyzować z naturalnymi oligonukleotydami, umożliwiając tym samym komplementarne parowanie do nici DNA. Dodatkowo, kompleksy zawierające boranofosfoniany charakteryzują się mniejszą trwałością termodynamiczną w porównaniu do dupleksów dwóch niezmodyfikowanych nici, dzięki czemu łatwiej aktywują enzym - rybonukleazę H, która jest w stanie je rozpoznać i poprzez mechanizm antysensowy doprowadzić do zdegradowania nici mRNA [24]. Przeprowadzone badania pokazały, że nukleozydo 5'- α -P-boranotrifosforany są dobrymi substratami zarówno dla polimerazy DNA jak i RNA, co pozwala na syntezę łańcucha oligonukleotydu zawierającego wszystkie jednostki nukleotydowe zmodyfikowane grupą boranową. Tak zmodyfikowany łańcuch oligonukleotydu jest stabilny w podwyższonej temperaturze i może być użyty np. w reakcji PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), dla powielania fragmentów kwasów nukleinowych [1,6].

Badano również odporność fragmentów oligonukleozydo boranofosfonianów na hydrolizę enzymatyczną przez endo- i egzozonukleazy [25]. Odporność ta jest zróżnicowana i zależy od stereochemii przy atomie fosforu związanego z atomem boru oraz od konkretnego enzymu. Z przeprowadzonych badań z 3'-egzozonukleazami wynika, że oligonukleotydy z konfiguracją S_p internukleotydu wiązania boranofosfonianowego ulegały hydrolizie enzymatycznej, lecz wydajność tego procesu była 330 razy niższa w porównaniu do niemodyfikowanych oligonukleotydów. W przypadku 5'-egzozonukleaz obydwie izomery ulegały hydrolizie, jednak reakcje były odpowiednio 30 razy (dla S_p diastereomeru) i 80 razy (dla R_p diastereomeru) wolniejsze w porównaniu do niemodyfikowanego oligonukleotydu. Wyniki te sugerują, że pochodne boranofosfonianowe można uznać za znacznie bardziej odporne na działanie egzozonukleaz od niemodyfikowanych odpowiedników. Z kolei oligonukleozydo boranofosfoniany były całkowicie odporne na działanie endozonukleaz i nie ulegały hydrolizie niezależnie od konfiguracji przy centrum boranofosfonianowym [26].

Rybonukleaza H to bardzo ważny enzym z grupy hydrolaz, który degradowa fragmenty mRNA w hybrydach mRNA:DNA poprzez hydrolizę wiązań fosfodiesterowych uwalniając 5'-fosforylowany oligorybonukleotyd i drugi z wolną grupą 3'-hydroksylową [27]. Z przeprowadzonych badań wynika, że rybonukleazę H aktywują tylko natural-



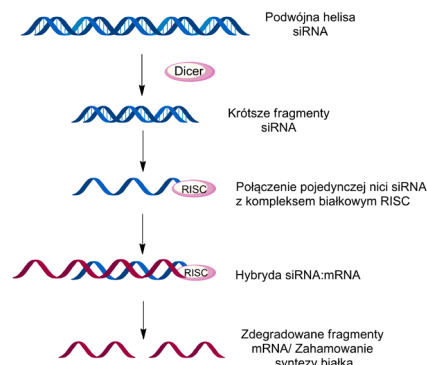
Rycina 7. Schemat przedstawiający działanie egzo- i endonukleaz na całkowicie boranowany w części centralnej oligonukleotydu.

ne fragmenty DNA lub zmodyfikowane w taki sposób, aby wiązanie fosfodiesterowe zachowywało ładunek ujemny. Ponieważ diestry boranofosfonianów posiadają formalny ładunek ujemny, stały się potencjalnymi kandydatami do takich badań. Stwierdzono, że oligonukleotydy zawierające boranofosfonianowe wiązanie internukleotydydowe aktywują rybonukleazę H 76 razy (w 20°C) oraz 18 razy (w 30°C) wydajniej w porównaniu do oligonukleotydu z wiązaniem fosfodiesterowym. Dodatkowo, ponieważ hybrydy mRNA:DNA modyfikowane grupą boranową są mniej termodynamicznie stabilne, zwiększa to stopień aktywacji rybonukleazy H [8]. Przede wszystkim wysoka odporność na działanie nukleaz oraz fakt, że aktywują rybonukleazę H powoduje, że nukleozydy boranofosfonianowe są obiecującymi kandydatami do zastosowań w terapii antysensowej (Ryc. 7).

BORANOFOSFONIANY W WYCISZANIU EKSPRESJI GENÓW ZA POMOCĄ siRNA

siRNA (ang. *Short Interfering RNA*) to krótkie fragmenty dwuniciowego RNA, zawierające około 20 par zasad, które biorą udział w procesie wyciszania ekspresji uszkodzonych genów na poziomie mRNA [28]. W tym procesie ważną rolę odgrywa enzym Dicer, który tnie dwuniciowy RNA na krótsze fragmenty. Łączą się one z kompleksem białkowym RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*), który ułatwia ich rozplatanie, a następnie pojedyncza nić siRNA-RISC wiąże się do komplementarnego fragmentu komórkowego mRNA. Powstała w ten sposób hybryda siRNA:mRNA jest rozcinana przez kompleks białkowy RISC uniemożliwiając w ten sposób translację mRNA i tym samym ekspresję informacji genetycznej zawartej w tym fragmencie mRNA (Ryc. 8) [28].

Ponieważ fragmenty siRNA są ujemnie naładowane, z trudnością przenikają przez błony komórkowe, a ponadto są również podatne na degradację przez nukleazy komórkowe [29]. Z tych względów trwają badania nad modyfikowaniem struktury siRNA by polepszyć ich odporność na nukleazy i ułatwić transport do komórki. Przykładem mogą tu być badania nad regulacją ekspresji genu EGFP zielonego białka fluorescencyjnego w komórkach HeLa [5]. Badania wykazały, że wprowadzenie grupy boranowej do siRNA zwiększa jego odporność na działanie nukleaz co najmniej dziesięciokrotnie, co czyni boranofosfonian bardziej użytecznym narzędziem badawczym niż niemodyfikowane siRNA. Wysoka aktywność przy niskich stę-



Rycina 8. Schemat przedstawiający proces wyciszania ekspresji genów według strategii siRNA.

żeniach, a także brak toksyczności sprawiają, że fragmenty siRNA zawierające w swojej strukturze grupę boranofosfonianową są intensywnie badane jako nowa klasa potencjalnych środków terapeutycznych [5,30].

BORANOFOSFONIANY W SYNTEZIE APTAMERÓW METODĄ SELEX

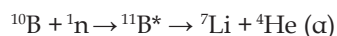
Metoda SELEX [31] (ang. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) to technika wykorzystująca amplifikację wybranych kwasów nukleinowych przy pomocy polimeraz DNA lub RNA [32]. Krótkie fragmenty kwasów nukleinowych (zawierające około 20-100 jednostek nukleotydydowych) rozpoznające specyficzne cele molekularne określa się mianem aptamerów [33]. Służą one między innymi jako wysoce specyficzne środki diagnostyczne lub nośniki leków przez wiązanie antygenów powierzchniowych specyficznych dla danego typu komórek. Aptamery mogą być wytwarzane za pomocą metody SELEX [7]. Aptamery znajdują zastosowanie terapeutyczne oraz diagnostyczne, między innymi w leczeniu zwyrodnienia płamki żółtej, cukrzycy, przewlekłej białaczki limfocytowej oraz w wielu innych chorobach [34]. Dotychczas tylko jeden lek aptamerowy *Macugen* (służący do leczenia zwyrodnienia płamki żółtej) został zatwierdzony przez FDA, natomiast kilka innych jest na etapie zaawansowanych badań klinicznych [35]. Do zalet aptamerów należą: kompatybilność z wieloma celami molekularnymi zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowymi, wysoka stabilność oraz możliwość ich chemicznej modyfikacji [36]. Natomiast głównym ograniczeniem tej metody jest wciąż niewielka ilość dostępnych modyfikacji nukleotydydów, które mogłyby być w niej efektywnie wykorzystywane.

Z przeprowadzonych do tej pory badań wynika, że rybonukleotydydowe analogi, takie jak guanozyna 5'- α -P-boranotrifosforan i urydyna 5'- α -P-boranotrifosforan są w pełni kompatybilne z metodą SELEX oraz mogą być wykorzystywane w syntezie aptamerów [7], ponieważ grupa boranowa odgrywa ważną rolę w rozpoznaniu celu molekularnego [1]. Dodatkowo, aptamery zawierające nukleozydy boranofosfonianowe są trwalsze niż niemodyfikowane, natomiast ich specyficzność względem wybranego celu molekularnego jest porównywalna. Zostało udowodnione, że jeśli analogi boranowanych nukleotydydów są obecne w aptamerach w trakcie procesu selekcji, to ich właściwości fizykochemiczne zostają zintegrowane z architekturą wybra-

nych cząsteczek, dając funkcjonalne boranowane aptamery. Nukleozydo boranofosfoniany mogą być również wykorzystywane do syntezy aptamerów w celu specyficznego dostarczenia cząsteczek zawierających atom boru do komórek nowotworowych w terapii Borowo-Neutronowej (BNCT, patrz niżej) [7].

TERAPIA BOROWO-NEUTRONOWA

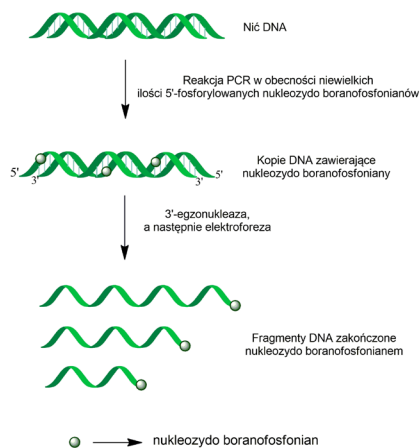
Terapia Borowo-Neutronowa (ang. *Boron Neutron-Capture Therapy*; BNCT) – to technika eksperymentalna polegająca na dostarczeniu do zmienionych nowotworowo tkanek izotopu boru ^{10}B [37] i jest wykorzystywana do leczenia nowotworów, głównie mózgu i skóry, w tym glejaków i czerniaków, a także innych chorób [38]. Naturalnie występujący bor zawiera około 20% izotopu ^{10}B oraz 80% ^{11}B . Związki zawierające izotop ^{10}B są dostarczane do zmienionych nowotworowo tkanek, gdzie pod wpływem promieniowania neutronowego następuje wzbudzenie jąder atomu boru, które rozpadają się generując cząsteczki α (atomy helu). Promieniowanie α jest silnie destrukcyjne dla komórek, ale ze względu na krótki zasięg, zniszczeniu ulegają tylko znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie komórki nowotworowe. Z tych powodów terapia BNCT praktycznie nie uszkadza zdrowych tkanek i nie wykazuje ogólnoustrojowej toksyczności tak jak większość form chemio- i radioterapii [2,7].



Do tej pory w terapii borowo-neutronowej były stosowane głównie związki określane jako karborany (ang. *carborane*) [39]. Karborany są to klastery zawierające cząsteczki węgla, boru i wodoru o wzorze $\text{C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{12}$. W poszukiwaniu nowych czynników dla terapii BNCT zaczęto modyfikować karborany, łącząc je np. z peptydami lub cząsteczkami cukrów [39]. Badania te trwają nadal i nukleozydo boranofosfoniany należą właśnie do związków, które w formie aptamerów zaczęły być badane pod kątem możliwości ich wykorzystania jako nowych struktur mogących być źródłem boru w BNCT [7].

SEKWENCJONOWANIE DNA Z WYKORZYSTANIEM NUKLEOZYDO BORANOFOSFONIANÓW

W biologii molekularnej sekwencjonowaniem DNA nazywa się technikę odczytywania kolejności nukleotydów w danym fragmencie DNA. Istnieje wiele, efektywnych metod sekwencjonowania DNA, a jednymi z klasycznych przykładów są metody Sangera i Maxama-Gilberta [40]. Najnowszą z propozycji w tym względzie jest metoda sekwencjonowania kwasów nukleinowych z użyciem nukleozydo boranofosfonianów (Ryc. 9), która wykorzystuje ich zwiększoną odporność na działanie egzonukleaz [6]. Dla oznaczenia sekwencji, badany fragment DNA powiela się za pomocą techniki PCR, używając jednego z nukleozydo 5'- α -P-trifosforanów zmodyfikowanego grupą boranową w pozycji 5'. W ten sposób uzyskuje się fragmenty DNA, w których w różnych miejscach znajdują się cząsteczki nukleozydo boranofosfonianów. Następnie taką pulę DNA poddaje się działaniu 3'-egzonukleazy i otrzymuje fragmenty o różnej długości, ale zawsze zakończone nukleotydem



Rycina 9. Schemat sekwencjonowania DNA z wykorzystaniem nukleozydo boranofosfonianów [2].

z modyfikacją boranową, które poddaje się elektroforezie i po analizie danych ustala się sekwencję całej nici DNA [6]. Do zalet sekwencjonowania DNA z wykorzystaniem nukleozydo boranofosfonianów można zaliczyć prostotę eksperymentalną, dokładność oraz fakt, że można odczytywać sekwencję produktów otrzymanych bezpośrednio stosując technikę PCR, bez konieczności ich oczyszczania. Ta technika sekwencjonowania kwasów nukleinowych z użyciem nukleozydo boranofosfonianów stanowi korzystną alternatywę do innych, znanych już metod [2].

PODSUMOWANIE

Nukleozydo boranofosfoniany to nowa klasa analogów nukleotydów. Pomimo modyfikacji funkcją $-\text{BH}_2$, struktura tych związków przypomina naturalne nukleotydy, ponieważ grupa boranowa jest izoelektronowa względem tlenu i również posiada 6 elektronów walencyjnych. Dodatkowo, boranofosfoniany zachowują ładunek ujemny w cząsteczce podobnie do naturalnych fosforanów [4]. To duże podobieństwo do naturalnych nukleotydów sprawia, że boranofosfoniany mogą być efektywnie wykorzystywane jako nowy substytut nukleotydów w badaniach nad środkami terapeutycznymi i w diagnostyce medycznej. Ze względu na atrakcyjny potencjał nukleozydo boranofosfonianów aktualnie trwają intensywne badania nad opracowaniem nowych, efektywnych i wydajnych metod syntezy tych związków i oceny ich potencjału biologicznego oraz przydatności jako narzędzia badawczego w biologii molekularnej.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękujemy prof. dr hab. Jackowi Stawińskiemu za cenne wskazówki oraz merytoryczną pomoc w pisaniu tej pracy.

PIŚMIENNICTWO

- Shaw BR, Dobrikov M, Wang X, Wan J, He K, Lin J-L, et al. (2003) Reading, Writing and Modulating Genetic Information with Boranophosphate Mimics of Nucleotides, DNA and RNA. *Ann NY Acad Sci* 1002: 12-29
- Summers JS, Shaw BR (2001) Boranophosphates as Mimics of Natural Phosphodiester in DNA. *Curr Med Chem* 8: 1147-55

3. Golebiewska J (2020) Nukleozydy i oligonukleozydy boranofosfoniany – metody syntezy i wybrane właściwości biologiczne. *Wiadomości Chemiczne* 74: 477-506
4. Li P, Sergueeva ZA, Dobrikov M, Shaw BR (2007) Nucleoside and oligonucleoside boranophosphates: chemistry and properties. *Chem Rev* 107: 4746-4796
5. Hall AH, Wan J, Spesock A, Sergueeva Z, Shaw BR, Alexander KA (2006) High potency silencing by single-stranded boranophosphate siRNA. *Nucleic Acids Res* 34: 2773-2781
6. Porter KW, Briley JD, Shaw BR (1997) Direct PCR sequencing with boronated nucleotides. *Nucleic Acids Res* 25: 1611-1617
7. Lato SM, Ozerova NDS, He K, Sergueeva Z, Shaw BR, Burke DH (2002) Boron-containing aptamers to ATP. *Nucleic Acids Res* 30: 1401-1407
8. Rait VR, Shaw BR (1999) Boranophosphates Support the RNase H Cleavage of Polyribonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9: 53-60
9. Sergueev D, Shaw BR (1998) H-Phosphonate Approach for Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleoside Boranophosphates and Their Characterization. *J Am Chem Soc* 120: 9417-9427
10. Goyal N, Narayanaswami P (2018) Making sense of antisense oligonucleotides: A narrative review. *Muscle Nerve* 57: 356-370
11. Lebedeva I, Stein CA (2001) Antisense oligonucleotides: promise and reality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 403-419
12. Stein CA, Cheng Y-C (1993) Antisense oligonucleotides as therapeutic agents – Is the bullet really magical? *Science* 261: 1004-1012
13. Sharad S. Antisense Therapy: An Overview, In *Antisense Therapy*, Sharad S, Kapur S, London: IntechOpen; 2019.
14. Stein CA, Castanotto D (2017) FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol Ther* 25: 1069-1075
15. Li P, Shaw BR (2005) Synthesis of Nucleoside Boranophosphoramidate Prodrugs Conjugated with Amino Acids. *J Org Chem* 70: 2171-2183
16. De Clercq E (2002) Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* 1: 13-25
17. Schulz T, Balzarini J, Meier C (2014) The DiPPro approach: synthesis, hydrolysis, and antiviral activity of lipophilic d4T diphosphate prodrugs. *ChemMedChem* 9: 762-775
18. Pertusati F, Serpi M, McGuigan C (2012) Medicinal chemistry of nucleoside phosphonate prodrugs for antiviral therapy. *Antivir Chem Chemother* 22: 181-203
19. Peyrottes S, Egron D, Lefebvre I, Gosselin G, Imbach J-L, Périgaud C (2004) SATE Pronucleotide Approaches: An Overview. *Mini Rev Med Chem* 4: 395-408
20. Chang S, Griesgraber GW, Southern PJ, Wagner CR (2001) Amino Acid Phosphoramidate Monoesters of 3'-Azido-3'-deoxythymidine: Relationship between Antiviral Potency and Intracellular Metabolism. *J Med Chem* 44: 223-231
21. Romanowska J, Sobkowski M, Szymanska-Michalak A, Kolodziej K, Dabrowska A, Lipniacki A, et al. (2011) Aryl H-phosphonates 17: (N-aryl)phosphoramidates of pyrimidine nucleoside analogues and their synthesis, selected properties, and anti-HIV activity. *J Med Chem* 54: 6482-6491
22. Romanowska J, Kolodziej K, Sobkowski M, Rachwalak M, Jakubowski T, Golebiewska J, et al. (2019) Aryl H-phosphonates. 19. New anti-HIV pronucleotide phosphoramidate diesters containing amino- and hydroxypyridine auxiliaries. *Eur J Med Chem* 164: 47-58
23. Roy S, Caruthers M (2013) Synthesis of DNA/RNA and their analogs via phosphoramidite and H-phosphonate chemistries. *Molecules* 18: 14268-14284
24. Higson AP, Sierzchala A, Brummel H, Zhao Z, Caruthers MH (1998) Synthesis of an Oligothymidylate Containing Boranophosphate Linkages. *Tetrahedron Lett* 39: 3899-3902
25. Li H, Porter KW, Huang F, R. SB (1995) Boron-containing oligodeoxyribonucleotide 14mer duplexes: enzymatic synthesis and melting studies. *Nucleic Acids Res* 23: 4495-4501
26. Sergueev D, Shaw BR (1998) H-Phosphonate Approach for Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleoside Boranophosphates and Their Characterization. *J Am Chem Soc* 120: 9417-9427
27. Cerritelli SM, Crouch RJ (2009) Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J* 276: 1494-1505
28. Meister G, Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343-349
29. Alshaer W, Zureigat H, Al Karaki A, Al-Kadash A, Gharaibeh L, Hatmal MM, et al. (2021) siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *Eur J Pharmacol* 905: 174178-17495
30. Hall AH, Wan J, Shaughnessy EE, Ramsay Shaw B, Alexander KA (2004) RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships. *Nucleic Acids Res* 32: 5991-6000
31. Zhuo Z, Yu Y, Wang M, Li J, Zhang Z, Liu J, et al. (2017) Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *Int J Mol Sci* 18: 2142-2161
32. Kaur H (2018) Recent developments in cell-SELEX technology for aptamer selection. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862: 2323-2329
33. Zhou J, Rossi J (2017) Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 16: 181-202
34. Kaur H, Bruno JG, Kumar A, Sharma TK (2018) Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines. *Theranostics* 8: 4016-4032
35. Parashar A (2016) Aptamers in Therapeutics. *J Clin Diagn Res* 10: BE01-BE06
36. Guan B, Zhang X (2020) Aptamers as Versatile Ligands for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Int J Nanomedicine* 15: 1059-1071
37. Barth B, Soloway A, Goodman J, Gahbauer R, Gupta N, Blue T, et al. (1999) Boron neutron capture therapy of brain tumors: an emerging therapeutic modality. *Neurosurg* 44: 433-451
38. Hawthorne MF (1998) New horizons for therapy based on the boron neutron capture reaction. *Mol Med Today April*: 174-181
39. Valliant JF, Guenther KJ, King AS, Morel P, Schaffer P, Sogbein OO, et al. (2002) The medicinal chemistry of carboranes. *Coord Chem Rev* 232: 173-230
40. Franca LT, Carrilho E, Kist TB (2002) A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys* 35: 169-200

Nucleoside boranephosphonates as potential therapeutic agents

Eliza Filipiak, Justyna Gołębiewska✉

Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznań

✉corresponding author: jgolebiewska@ibch.poznan.pl

Keywords: Nucleoside boranephosphonates, biological applications, therapeutic agents, antisense therapy, siRNA, aptamers

ABSTRACT

Nucleoside boranephosphonates are nucleotide analogues in which one of the non-bridging oxygen atom of the phosphate part has been replaced by a borane group (-BH₃). This modification imparts a wide spectrum of biological activity, e.g., activation of ribonuclease H, resistance to endo- and exonucleases, and their respective triphosphates are good substrates for DNA and RNA polymerases. Nucleoside boranephosphonate derivatives are used in antisense therapy, silencing gene expression using siRNA strategies, and as potential antiviral and anti-cancer prodrugs. Boranephosphonates find also applications as aptamers and as substrates in a new method of DNA sequencing. This review briefly presents potential biological applications of nucleoside boranephosphonates.

