

- [1] H. W. Schmalle, K. Hegetschweiler, M. Ghisletta, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1991**, *47*, 2047–2052.
- [2] K. Hegetschweiler, V. Gramlich, M. Ghisletta, H. Samaras, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 2341–2346.
- [3] K. Hegetschweiler, M. Ghisletta, T. F. Fässler, R. Nesper, H. W. Schmalle, G. Rihs, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 2032–2041.
- [4] K. Hegetschweiler, M. Ghisletta, V. Gramlich, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 2699–2704.
- [5] $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O): $\delta = 4.00$ (t , $J = 3.2 \text{ Hz}$, 12 H), 3.17 (t , $J = 3.2 \text{ Hz}$, 12 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (50.4 MHz, D_2O , TSP): $\delta = 74.3$, 53.0.
- [6] FAB $^+$ -Massenspektren wurden mit einem doppelfokussierenden VG-ZAB-VSEQ-Massenspektrometer aufgenommen. Die wäßrige Probelösung wurde dazu in eine Glycerinmatrix eingetragen. Zuordnungen im Bereich $1000 \leq m/z \leq 1500$: 1398.6 (100%) $[\text{IOIn}_6(\text{taci})_4 - 15\text{H}]^+$, 1461.6 (36%) $[\text{IOIn}_6(\text{taci})_4](\text{NO}_3^- - 14\text{H}]^+$, 1524.8 (12%) $[\text{IOIn}_6(\text{taci})_4](\text{NO}_3^- - 13\text{H}]^+$.
- [7] Die Zusammensetzung $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{In}_6\text{N}_6\text{O}_{25} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ wurde durch C,H,N-Analyse bestätigt. Die Verbindung kristallisiert in der monoklinen Raumgruppe $C2/c$ (Nr. 15) mit $a = 2130(3)$, $b = 1251(2)$, $c = 2295(3)$ pm, $\beta = 125.28(9)^\circ$, $Z = 4$, $V = 4992(12) \times 10^6 \text{ pm}^3$, $\text{Mo}_{\text{K}\alpha}$ -Strahlung, Graphitmonochromator, Vierkreisdiffraktometer STOE STADI4, Reflexe: 6474 beobachtet, 6322 unabhängig, davon 5141 mit $I > 2.5\sigma(I)$ zur Verfeinerung von 358 Parametern verwendet; Strukturlösung mit Direkten Methoden, keine Absorptionskorrektur, $R = 0.0328$, $R_w = 0.0409$, Restelektronendichte +0.99/-1.2 e $_\text{o}/\text{\AA}^3$. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Direktor des Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, GB-Cambridge CB2 1EZ, unter Angabe des vollständigen Literaturzitats angefordert werden.
- [8] Wir schließen OH^- statt O^{2-} im Zentrum aus folgenden Gründen aus: 1) die daraus resultierende Abweichung von der Ladungsbilanz $\text{O}^{2-} + 6\text{In}^{3+} + 4(\text{taci} - 3\text{H})^{3-} + 4\text{NO}_3^-$ müßte durch eine niedrigere Oxidationsstufe eines In-Atoms, eine zusätzliche Deprotonierung eines Liganden oder die Besetzung einer nicht koordinierenden H_2O -Position durch OH^- kompensiert werden. Der NMR-spektroskopische Nachweis von vier symmetriekivalenten Liganden, die In-O- und In-N-Abstände und die Tatsache, daß die wäßrige Komplexlösung kaum alkalisch reagiert, sprechen gegen solche Kompensationen. 2) Ein fehlgeordnetes Hydroxid-Ion im Zentrum des angenähert oktaedrischen Komplexes sollte sich durch einen größeren Temperaturfaktor bemerkbar machen. Auch dies ist nicht der Fall.
- [9] A. Riesen, T. A. Kaden, W. Ritter, H. R. Macke, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 460–462.
- [10] M. Marezio, *Acta Crystallogr.* **1966**, *20*, 723–728.
- [11] a) P. Miele, J. D. Foulon, N. Hovnanian, L. Cot, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 29–31; b) K. G. Caulton, M. H. Chisholm, S. R. Drake, J. C. Huffman, *ibid.* **1990**, 1498–1499; c) R. Schmid, A. Mosset, J. Galy, *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *179*, 167–170.
- [12] Q. Chen, J. Zubietta, *Coord. Chem. Rev.* **1992**, *114*, 107–167.
- [13] a) M. I. Khan, Q. Chen, D. P. Goshorn, J. Zubietta, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 672–680; b) M. Cavaluzzo, Q. Chen, J. Zubietta, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 131–133; c) K. Hegetschweiler, H. Schmalle, H. M. Streit, W. Schneider, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 3625–3627; d) K. Hegetschweiler, H. W. Schmalle, H. M. Streit, V. Gramlich, H.-U. Hund, I. Erni, *ibid.* **1992**, *31*, 1299–1302.

Synthese und Paarungseigenschaften von Decanucleotiden aus (3'S,5'R)-2'-Desoxy-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyladenin und -thymin**

Von Markus Tarköy und Christian Leumann*

Die sequenzspezifische Komplexierung von RNA-Einzelsträngen und DNA-Duplexen durch Oligonukleotide bietet sich als Methode zur selektiven Inhibition der Proteinbiosynthese an^[1]. Die Spezifität im Erkennungsprozeß ist dabei mit den Basenpaarungsregeln von Watson und Crick^[2] und den entsprechenden Regeln zur Triplexbildung^[3] erklärbar und durch die Basensequenz und die Länge des Oligonukleo-

[*] Dr. C. Leumann^{†,‡}, M. Tarköy

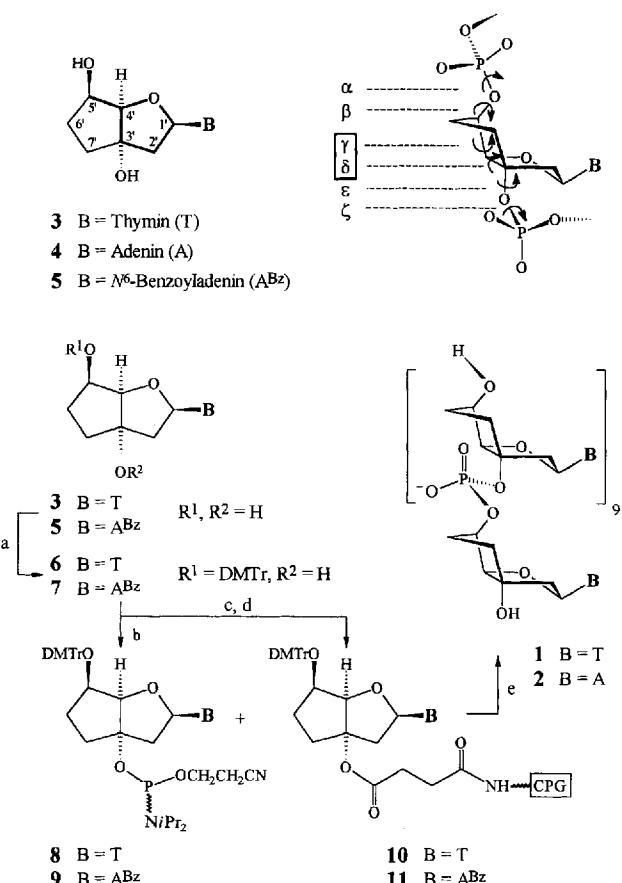
Laboratorium für Organische Chemie der ETH
Universitätstrasse 16, CH-8092 Zürich (Schweiz)

[+] Neue Adresse: Institut für Organische Chemie der Universität
Freiestrasse 3, CH-3012 Bern (Schweiz)

[**] Nucleinsäure-Analoga mit konformativ eingeschränktem Zuckerphosphatrückgrat („Bicyclo-DNA“), 2. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der ETH Zürich sowie vom Stipendienfonds der Basler Chemischen Industrie gefördert. – 1. Mitteilung: [5].

tids gegeben. Vor dem Hintergrund einer therapeutischen Anwendung sind in neuerer Zeit eine ganze Anzahl von Oligonukleotid-Analoga hergestellt worden mit dem Ziel, die Stabilität von Komplexen mit komplementärer DNA und RNA, die Resistenz gegenüber Nucleasen und die Durchdringungseigenschaften bezüglich biologischer Membranen zu verbessern^[4].

Kürzlich haben wir einen neuen Nucleosidtyp vorgestellt („Bicyclodesoxynucleoside“), der sich von den natürlichen Desoxyribonucleosiden durch eine zusätzliche C_2 -Brücke zwischen den Zentren $C3'$ und $C5'$ unterscheidet (Schema 1)^[5]. Diese Bicyclonucleoside sind im Furanoegerüst



Schema 1. Synthese der Deca((3'S,5'R)-2'-desoxy-3',5'-ethano- β -D-ribonucleotide) **1** und **2** der Nucleobasen Thymin bzw. Adenin. a) $\text{DMTr}^+\text{CF}_3\text{SO}_3^-$, Pyridin, 3 h, Raumtemperatur (RT), 88% **6** (85% **7**); b) $(\text{NCCH}_2\text{CH}_2\text{O})(i\text{Pr}_2\text{N})\text{PCl}$, $i\text{Pr}_2\text{EtN}$, THF, RT, 1 h, 63% **8** (76% **9**); c) Bernsteinsäureanhydrid, Pyridin, 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP), RT, 70 h, dann ρ -Nitrophenol, THF, N,N' -Dicyclohexylcarbodiimid, RT, 2 h, 73%, B = T, (63%, B = ABz); d) LCAA-CPG (Sigma), Dioxan, Dimethylformamid (DMF), Et_3N , RT, 2 d, dann Ac_2O , Pyridin, DMAP, RT, 30 min; e) siehe [9].

konformativ weniger flexibel als natürliche Nucleoside. Von ihnen aufgebauten Oligonukleotiden ist daher ein höherer Grad an Präorganisation eines Einzelstrangs für die Duplexierung zu erwarten, was zu einem entropischen Vorteil für den Paarungsprozeß und zu thermodynamisch stabileren Komplexen führen kann. Außerdem ist von Oligo(bicyclonucleotiden) mit sekundären und tertiären Phosphodiesterfunktionen eine höhere Resistenz gegenüber Phosphodiesterasen zu erwarten. Wir berichten nun über die Synthese der beiden Bicyclo-DNA-Decamere **1** und **2** sowie deren Paarungsverhalten mit komplementärer DNA und RNA.

Für die automatisierte Oligonukleotidsynthese nach der Phosphoramiditmethode^[6] wurden die bicyclischen Nucleosidderivate **3** und **5** zuerst mit 4,4'-Dimethoxytriphenylme-

thyl(DMTr)-trifluormethansulfonat^[7] zu den entsprechenden Tritylderivaten **6** bzw. **7** umgesetzt und diese mit Chlor(β -cyanethoxy)(diisopropylamino)phosphan in die Phosphoramidit-Bausteine **8** bzw. **9** überführt. Die mit Nucleosid beladenen Trägermaterialien (long chain alkylamine controlled pore glass, LCAA-CPG), **10** und **11**, wurden in Analogie zu bekannten Verfahren in der Nucleinsäurechemie^[8] über die Bernsteinsäurenitrophenylester von **6** bzw. **7** hergestellt, wobei Beladungsdichten von 22–39 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Trityl-Assay) erzielt wurden. Die Synthese der Deca(bicyclonucleotide) **1** und **2** erfolgte an einem DNA-Synthesegerät unter Verwendung eines modifizierten Syntheseprotokolls^[9] in Ausbeuten von > 98 % pro Kupplungsschritt (Trityl-Assay). Nach Entfernen der Schutzgruppen und Ablösen vom Trägermaterial gemäß Standardverfahren (konz. NH₃, 55 °C, 10–16 h) wurden die Rohprodukte hochdruckflüssigkeitschromatographisch getrennt und die reinen Oligonukleotide massenspektrometrisch^[10] sowie durch enzymatische Spaltung (Phosphodiesterase aus Schlangengift/alkalische Phosphatase) und Identifizierung der Nucleoside **3** bzw. **4** durch HPLC (Coinjektion mit authentischem Material) charakterisiert.

T_m -Werte aus UV-Schmelzkurven von Komplexen von **1** und **2** mit natürlichen DNA- und RNA-Komplementen sowie mit sich selbst bei ähnlichen Oligonukleotidkonzentrationen sind in Tabelle 1 angegeben. Bei neutralem pH-Wert

Tabelle 1. T_m -Werte [°C] (Hyperchromic [%]) von Schmelzkurven (260 nm) in 10 mM Tris · HCl (Tris = 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol), pH 7.0, 0.15 M NaCl (Basenpaarkonzentration 44 $\mu\text{M} \pm 10\%$).

	2	d(A ₁₀)	poly(dA)	poly(A)
1	33 (45) [a]	10 (20)	7 (30)	20 (37)
d(T) ₁₀	25 (35)	23 (27)	27 (45)	24 (40)
poly(U)	45 (50) [a]	32 (42) [a]	45 [b]	57 [b]

[a] Basenpaarkonzentration 26 μM . [b] Entnommen aus der Arbeit von M. Riley et al. [11].

ist der Duplex **2** · poly(U) deutlich stabiler als das natürliche Hybrid d(A₁₀) · poly(U) ($\Delta T_m = 13$ K, Abb. 1)^[11], während zwischen **1** · poly(A) und seinem natürlichen Äquivalent d(T₁₀) · poly(A) der Unterschied geringer ist ($\Delta T_m = -4$ K). Mit DNA als Paarungspartner verringern sich die Duplexstabilitäten in der Reihenfolge **2** · d(T₁₀) ≈ d(A₁₀) · d(T₁₀) > **1** · d(A₁₀). Unter allen möglichen Paarungen in der Reihe der Decamere steht der vollständig aus Bicyclo-DNA bestehende Duplex **1** · **2** in punkto Stabilität an erster Stelle. Das Thymidylat **1** bindet poly(A) stärker als poly(dA) ($\Delta T_m = 13$ K), was im Gegensatz zu den Bindungseigenschaften von d(T₁₀) steht, welches nahezu keine Präferenz

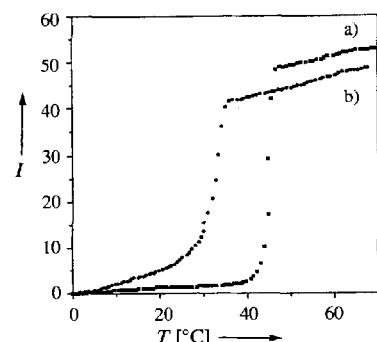


Abb. 1. UV-Schmelzkurven (260 nm) von a) **2** · poly(U) und b) d(A₁₀) · poly(U) in 10 mM Tris · HCl pH 7.0, 0.15 M NaCl (Basenpaarkonzentration 26 μM). I = % Hyperchromie bei 260 nm.

für poly(A) oder poly(dA) als Komplement zeigt ($\Delta T_m = -3$ K). Die Paarungsstöchiometrie in den Hybridsystemen **2**/d(T₁₀) und **1**/**2** haben wir UV-spektroskopisch mit der Methode der Konzentrationsvariation nach Job bestimmt^[12]. Dabei ist in beiden Systemen bei den entsprechenden stöchiometrischen Verhältnissen Triplexbildung des (T-A-T)-Typs, nicht aber des (A-A-T)-Typs beobachtbar – dies unter Bedingungen (0.15 M NaCl), bei welchen im natürlichen System d(A₁₀)/d(T₁₀) nur Duplexbildung erkennbar ist^[13] (Abb. 2, Mischkurve von **1**/**2** nicht abgebildet). Oligo(-bicyclonucleotide) der Basen Adenin und Thymin zeigen somit eine höhere Bereitschaft zur Triplexbildung.

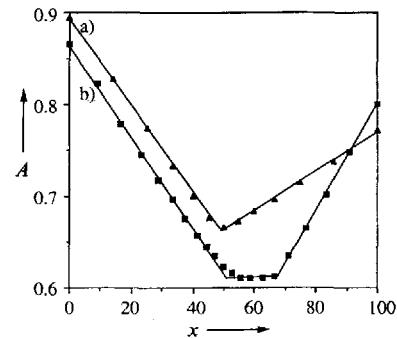


Abb. 2. UV-Mischkurve (260 nm, 8 °C) von a) d(A₁₀)/d(T₁₀) (Gesamtstrangkonzentration $c_T = 8.4 \mu\text{M}$) und b) 2/d(T₁₀) ($c_T = 8.3 \mu\text{M}$) in 10 mM Tris · HCl, pH 7.0, 0.15 M NaCl. A = Absorption bei 260 nm, x = Konzentration von T in Mol-%.

Um die Frage nach der Beeinflussung der Paarungsentropie durch die strukturellen Modifikationen im Zuckergerüst der Oligo(bicyclonucleotide) zu beantworten, haben wir die thermodynamischen Daten (ΔH , ΔS) der Duplexierung in der Reihe der hier betrachteten Decamere aus den UV-Schmelzkurven (Abb. 3) nach einem Kurvenanpassungsverfahren sowie aus einer Auftragung von T_m^{-1} gegen den Logarithmus der Oligonukleotidkonzentration nach Marky und Breslauer^[14] (Tabelle 2) bestimmt. Aus den Daten ist zu ent-

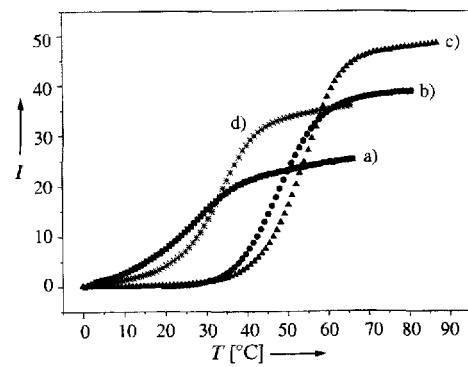


Abb. 3. UV-Schmelzkurven der Duplexe a) **1** · d(A₁₀) ($c_T = 12.8 \mu\text{M}$), b) **2** · d(T₁₀) (11.9 μM), c) **1** · **2** (11.9 μM) und d) d(A₁₀) · d(T₁₀) (12.2 μM) in 10 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl, pH 7.0.

nehmen, daß für beide Hybridduplexe, **2** · d(T₁₀) und **1** · d(A₁₀), sowie für den nur aus Bicyclo-DNA bestehende Duplex **1** · **2** ein gegenüber natürlichem d(A₁₀) · d(T₁₀) betragsmäßig reduzierter Paarungsentropieterm (ΔS) resultiert^[15]. Der verringerte Paarungsenthalpieterm (ΔH) trägt dabei zu einer Destabilisierung der Duplexe in den betrachteten Fällen bei. Die Abweichung der Daten aus den beiden Meßmethoden für den Fall **2** · d(T₁₀) (Tabelle 2) könnte ein

Tabelle 2. Thermodynamische Daten der Duplexierung aus UV-Schmelzkurven (aus Kurvenanpassung und Auftragung von T_m^{-1} gegen $\ln c$ [14]) in 10 mM Na₂PO₄, pH 7.0, 1 M NaCl; geschätzte Fehler $\leq \pm 5\%$.

	Kurvenanpassung [a]		T_m^{-1} gegen $\ln c$	
	ΔH [kcal mol ⁻¹]	ΔS [cal K ⁻¹ mol ⁻¹]	ΔH [kcal mol ⁻¹]	ΔS [cal K ⁻¹ mol ⁻¹]
1 · d(A ₁₀)	-55.7	-160	-56.1	-161
2 · d(T ₁₀)	-64.9	-177	-53.3	-141
1 · 2	-63.2	-169	-61.1	-164
d(A ₁₀) · d(T ₁₀)	-66.3	-191	-61.8	-176

[a] Mittel aus sechs Messungen bei sechs verschiedenen Konzentrationen im Bereich von $c_T = 1-30 \mu\text{M}$.

Hinweis darauf sein, daß das „Alles-oder-Nichts“-Paarungsmodell, auf welchem die Ermittlung der thermodynamischen Daten beruht, in diesem Fall nicht zutrifft. Die Verringerung des Enthalpieterms in den Hybridduplexen kann durch teilweise nicht komplementäre Paarungsgeometrie oder durch Spannung innerhalb des Bicyclo-DNA-Stranges erklärt werden. Die Reduktion des Entropieterms dürfte dem weniger flexiblen Zuckerphosphatrückgrat des DNA-Analogs zuzuschreiben sein, wobei jedoch Beiträge anderer Art, insbesondere Unterschiede in Duplex- oder Einzelstrangsolvation, ebenfalls eine wichtige Rolle spielen können.

Zur Überprüfung des Resistenzverhaltens von Oligo(bicyclonucleotiden) gegenüber Phosphodiesterasen wurde das Decamer **1** mit Phosphodiesterase aus Schlangengift (SVP), Nuclease S1 und Phosphodiesterase aus Kalbsmilz (CSP) behandelt und seine Stabilität im Vergleich zu denjenigen von natürlichem d(T₁₀) bestimmt^[16]. Während **1** gegenüber SVP (3'-Exonuclease) eine dreifach höhere Stabilität aufweist, wurde gegenüber CSP (5'-Exonuclease) ein Stabilitätsfaktor von 1.4×10^3 und gegenüber Nuclease S1 (Endo- und Exonuclease) einer von 100 ermittelt.

Das Konzept der Verringerung der Paarungsentropie in bimolekularen Duplexierungen durch Reduktion der konformativen Flexibilität des Zuckerphosphatrückgrats, welches sich aus den Beobachtungen von Eschenmoser et al.^[17] über die Paarungseigenschaften von Oligo-2'-3'-didesoxy- β -D-glucopyranonucleotiden (Homo-DNA) ableiten läßt, kann auch auf Oligonucleotidstrukturen übertragen werden, die gezielt auf die Komplexierung komplementärer natürlicher DNA ausgerichtet sind und somit neue Wege in der „Antisense“-Forschung eröffnen.

Eingegangen am 12. März,
ergänzte Fassung am 1. Juli 1993 [Z 5915]

- [1] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 280–284; M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, *ibid.* **1978**, *75*, 285–288.
- [2] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [3] G. Felsenfeld, D. R. Davies, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2023–2024; H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645–650; J.-C. François, T. Saison-Behmoaras, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11431–11440; N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 697–723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 666–690; M. Cooney, G. Czernuszewicz, E. H. Postel, S. J. Flint, M. E. Hogan, *Science* **1988**, *241*, 456–459; P. A. Beal, P. B. Dervan, *ibid.* **1991**, *251*, 1360–1363.
- [4] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543–584; J. Goodchild, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 165–187; J. Engels, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, *39*, 1250–1254. U. Englich, D. Gauss, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 629–646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 613–629.
- [5] M. Tarköy, M. Bolli, B. Schweizer, C. Leumann, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 481–510.
- [6] M. H. Caruthers, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 278–284.
- [7] Kristallines DMTr- CF_3SO_3^- (82%) wurde durch Reaktion des entsprechenden Chlorids mit $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Ag}$ in THF erhalten; befriedigende C,H,F,S-Analyse für $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{F}_3\text{S}$.
- [8] M. J. Gait, *Oligonucleotide Synthesis – a Practical Approach*, IRL Press, Oxford, **1984**.
- [9] Die Oligonucleotidsynthese erfolgte an einem Pharmacia Gene Assembler Plus® in Ansätzen von 0.6–1.3 μmol . Gegenüber der Synthese natürlicher

Oligonucleotide wurden im Syntheseprotokoll als einzige Parameter die Detritylierungszeit (60 s) und die Kupplungszeit (6 min) geändert. Alle Synthesen wurden mit der Entfernung der 5'-terminalen Tritylschutzgruppe beendet (trityl off mode).

- [10] Rohes **1** und **2** wurden durch Anionenaustausch-Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigt (Säule: Nucleogen 60 DEAE von Macherey-Nagel; Elution mit einem linearen Gradienten von KCl in 20 mM KH₂PO₄, pH 6.0, H₂O:CH₃CN 4:1). Die Einheitlichkeit der so erhaltenen Produktfraktionen wurde durch Umkehrphasen-HPLC überprüft (Säule: Aquapore Rp 300 von Brownlee; Elution mit einem linearen Gradienten von CH₃CN in 0.1 M wäßriger Et₃NHOAc, pH 7.0). Zur Massenanalyse von **1** und **2** (NH_4^+ -Form) diente ein Laser-Desorptions-Flugzeit-Massenpektrum von Matrix-gebettetem **1** bzw. **2** (*m/z* 3240.8 (**1**), 3330.8 (**2**)).
- [11] Während **2** · poly(U) bei einem Basenverhältnis von 1:1 unter den Pufferbedingungen bei der Aufnahme der UV-Schmelzkurven als Duplex vorliegt, disproportioniert d(A₁₀) · poly(U) zum (U-dA-U)-Triplex und zu ungepaartem d(A)₁₀. Dieser Befund ist im Einklang mit früheren Beobachtungen über die Komplexierung von poly(dA) mit poly(U) (M. Riley, B. Maling, M. J. Chamberlin, *J. Mol. Biol.* **1966**, *20*, 359–389).
- [12] P. Job, *Anal. Chim. Acta* **1928**, *9*, 113–134.
- [13] D. S. Pilch, C. Levenson, R. H. Shafer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1942–1946.
- [14] L. A. Marky, K. J. Breslauer, *Biopolymers* **1987**, *26*, 1601–1620.
- [15] Thermodynamische Daten zur Duplexierung von **2** und d(T₁₀) sowie von d(A₁₀) und d(T₁₀) wurden auch durch Differentialkalorimetrie (DSC) an einem Microcal MC-2D-Instrument (1 M NaCl) ermittelt. Auch hier tritt eine (betragsmäßige) Reduktion des Entropieterms um 23% im Falle des ersten relativ zum zweiten Duplex auf.
- [16] Die relativen Hydrolysegeschwindigkeiten von **1** und d(T₁₀) wurden durch partielle Verdauung mit dem entsprechenden Enzym abgeschätzt. Das Verhältnis von nicht umgesetztem Oligomer zur Summe aller Spaltprodukte wurde durch Umkehrphasen-HPLC (Quantifizierung durch Peakintegration) ermittelt. Stabilitätsfaktoren wurden als Quotienten der beschriebenen Edukt/Produkt-Verhältnisse für **1** und für d(T₁₀) errechnet.
- [17] A. Eschenmoser, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, *39*, 795–806; *Nova Acta Leopold.* **1992**, *67*, 201–233; A. Eschenmoser, E. Loewenthal, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21*, 1–16; A. Eschenmoser, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 218–259; M. Böhringer, H.-J. Roth, J. Hunziker, M. Göbel, R. Krishnan, A. Giger, B. Schweizer, J. Schreiber, C. Leumann, A. Eschenmoser, *ibid.* **1992**, *75*, 1416–1477; J. Hunziker, H.-J. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Göbel, R. Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *ibid.* **1993**, *76*, 259–352.

Kohärenzselektion durch Gradienten ohne Empfindlichkeitsverlust; Anwendung auf 3D-HNCO-Experimente**

Von Jürgen Schleucher, Michael Sattler und Christian Griesinger*

Gepulste Feldgradienten, d.h. definierte, kurzzeitige Inhomogenitäten des statischen Magnetfeldes B_0 , werden seit einiger Zeit in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie eingesetzt^[1]. In mehrdimensionalen NMR-Experimenten führen sie im allgemeinen zu einer Reduktion von Artefakten und können Phasencyclen ersetzen. Somit können Spektren immer dann schneller aufgenommen werden, wenn nicht das Signal/Rausch-Verhältnis, sondern die Auflösung und/oder die Unterdrückung unerwünschter Kohärenztransferwege die Dauer des Experiments bestimmen. In heteronuclearen Experimenten kann man durch Anwendung

[*] Prof. Dr. C. Griesinger, Dipl.-Chem. J. Schleucher, Dipl.-Chem. M. Sattler Institut für Organische Chemie der Universität Marie-Curie-Straße 11, D-60439 Frankfurt Telefax: Int. + 69/5800-9128

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie, vom Graduiertenkolleg Gk Eg 52/3-3, vom Land Hessen und vom Bundesministerium für Bildung und Wissenschaft gefördert. Die Autoren danken Prof. Dr. E. Carafoli, Dr. J. Krebs (ETH Zürich), Dr. T. Vorherr (Hofmann-La Roche, Basel) und P. Schulte (Frankfurt) für die Überlassung des Calmodulin/C20W-Komplexes sowie Dr. R. Kerssebaum und Dr. W. Bermel, BRUKER Analytische Meßtechnik, für die Unterstützung in der Anfangsphase des Projekts.