

Stereokontrollierte Synthese von Oligonucleosidphosphorothioaten

Wojciech J. Stec* und Andrzej Wilk

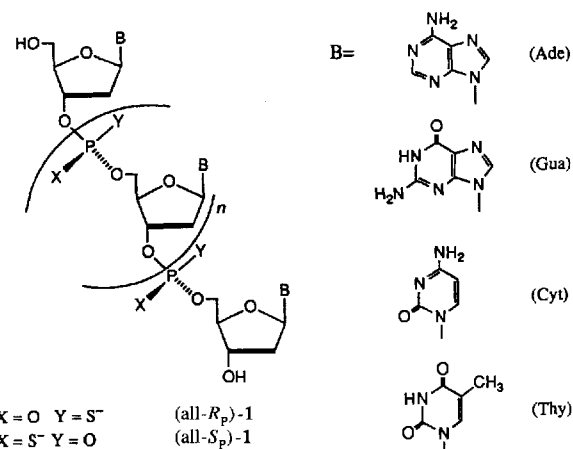
Bei der Modulation der Genexpression durch Antisense-Oligonucleotide oder deren Analoga wurden Ergebnisse erzielt, die auf eine neue Generation von Therapeutica gegen virale Infektionen, Krebs und andere Krankheiten hoffen lassen. Oligonucleosidphosphorothioate (Oligo-S) sind die wirksamsten Analoga bei der Unterdrückung der Biosynthese „ungewollter“ Proteine. Erste klinische Untersuchungen von Oligo-S als Antisense-Präparate gegen Warzen im Genitalbereich und akute myeloische Leukämie werden zur Zeit durchgeführt; auch gegen Aids sollen Oligo-S getestet werden. Details des Wirkungsmechanismus, der Aufnahme in die Zelle, des Zelltransports, der subzellulären Lokalisierung und der Wechselwirkung mit

zellulären Proteinen sind noch nicht bekannt. A priori wird bei der Applikation angenommen, daß eine rasche und effiziente molekulare Erkennung der Ziel-RNA durch Oligo-S erfolgt. Der Einfluß der Chiralität als Eigenschaft des Oligo-S-Gesamtmoleküls konnte bislang nicht geklärt werden, da diese Verbindungen nicht stereokontrolliert herstellbar sind. Aufgrund fehlender analytischer Methoden wurde die Diastereomerenzusammensetzung nie bestimmt. Da jedes Diastereomer eine eindeutig definierte stereochemische Einheit ist, stellt sich die Frage, welche Diastereomere die beobachtete biologische Antwort, die positive (heilende) Wirkung und die mögliche negative (toxische) Nebenwirkung, bewirken. Das Ziel dieser Übersicht ist,

eine (zum Teil auch spekulative) Abschätzung der Probleme, die mit einer stereokontrollierten Synthese von Oligo-S verbunden sind, zu liefern sowie den Forschungsstand zu referieren, wobei auch auf Strategien eingegangen werden soll, die zu Oligo-S mit vorbestimmter Chiralität führen könnten. Dieser Ansatz soll keinesfalls Wissenschaftler von Untersuchungen mit Oligo-S-Diastereomergemischen als Pharmaca abhalten, denn in der medizinischen Chemie wurden viele nützliche Medikamente ohne die genaue Kenntnis der Struktur entwickelt und angewandt. So ist z. B. heute noch die Struktur von Impfstoffen, die Pasteur entdeckte, nicht geklärt.

1. Einleitung

Seit der Entdeckung, daß Oligo-S **1** (Schema 1) Zellen wirksam gegen den zum Tode führenden HIV-Virus^[1] schützt, erschienen einige Publikationen, die sich mit der Syntheseoptimierung^[2], der Aufreinigung und Analytik^[3], der Aufnahme durch die Zelle, der Pharmakokinetik und Toxizität^[4], dem Wirkungsmechanismus^[5] und potentiellen Anwendungen^[6] befassen. Schon bei den ersten enzymatischen^[7] und chemischen^[8] Synthesen wurde erkannt, daß das Phosphoratom jeder Phosphorothioateinheit von 3'-O-Desoxyribosyl- und 5'-O-Desoxyribosyleinheiten mit definierter Konfiguration umgeben ist, und in jedem Molekül **1** aufgrund der chiralen Phosphoratome neue chirale Zentren gebildet werden. Jedoch wurde den strukturellen und biochemischen Folgen dieser Diastereomerie wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Wir wollen nun Wissenschaftlern, die Oligo-S bei der Antisense-^[9] und/oder der Ribozym-Technologie^[10] einsetzen,



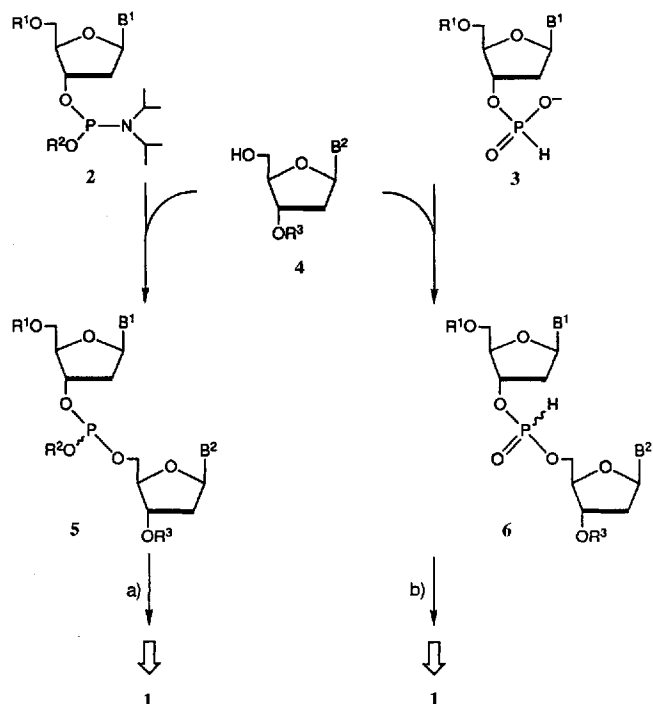
Schema 1. Oligonucleosidphosphorothioate **1** und Basen B.

auf das Problem der „Polydiastereomerie“ der Verbindungen **1** aufmerksam machen und kritisch mögliche Strategien der stereokontrollierten Oligo-S-Synthese diskutieren, die zu reinen Produkten mit einer definierten Chiralität an jedem Phosphoratom in **1** führen.

[*] Prof. Dr. W. J. Stec, Dr. A. Wilk
 Polish Academy of Sciences
 Centre of Molecular and Macromolecular Studies
 Department of Bioorganic Chemistry
 Sienkiewicza 112, PL-90-363 Lodz (Polen)
 Telefax: Int. + 42/81-5483

2. Nichtstereokontrollierte Synthese von Oligonucleosidphosphorothioaten

Antisense-Oligo S 1 sind relativ kurze Oligonucleotide (ca. 15- bis 30-mere) mit einer definierten, zur RNA (Ribonucleinsäure) oder ssDNA (ssDesoxyribonucleinsäure) komplementären Nucleobasensequenz bei der jede Phosphatgruppe zwischen den Nucleotideinheiten durch eine Phosphorothioatgruppe ersetzt ist. Die Nucleobasensequenz zwischen den terminalen 5'-OH- und 3'-OH-Substituenten dieser Moleküle ist für die Erkennung



Schema 2. Synthese von 1 mit der Phosphoramidit- (a) oder H-Phosphonat-Methode (b). a) 1. Sulfurierung, 2. Blockierung von nicht abreagiertem 5'-OH, 3. Abspaltung der 5'-Tritylgruppe, 4. Kondensation von 2/Tetrazol, 5. die Reaktionsschritte werden n -mal wiederholt. b) 1. Abspaltung der 5'-Tritylgruppe, 2. Kondensation von 3/Pivaloyl(Adamantoyl)chlorid, 3. (Blockierung von nicht abreagiertem 5'-OH), 4. die Reaktionsschritte 1–3 werden n -mal wiederholt, 5. abschließende Sulfurierung. Danach wird bei beiden Methoden der Träger und die Schutzgruppen abgespalten, danach gereinigt. $R^1 = 4,4'$ -Dimethoxytrityl (DMT); $R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, Me; $R^3 = \text{LCA-CPG}$ (long chain amine controlled pore glass); $B^1, B^2 = \text{AdeBz}$, GuaiBu, CytBz, Thy.

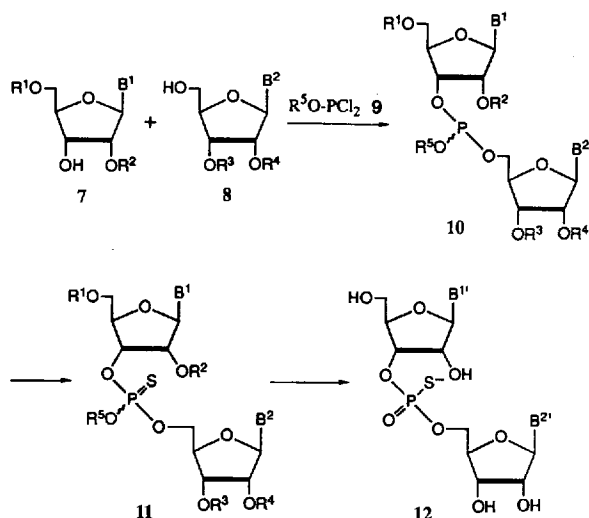
einer komplementären Ziel-RNA (target RNA) und eine spezifische Anlagerung verantwortlich, die durch die Bildung von Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen kontrolliert wird^[11].

Oligo-S werden bislang hauptsächlich nach zwei Methoden hergestellt: a) durch schrittweise Phosphoramidit-Kupplung^[12] mit anschließender Sulfurierung^[18, 13] des intermediären *O*-Alkylphosphits 5 (Schema 2) oder b) durch Tandem-Sulfurierung eines Träger-gebundenen Oligonucleosid-*H*-phosphonats^[2b, 14] (Schema 2). Die Sulfurierung von *O,O,O*-Trialkylphosphiten oder *O,O*-Dialkyl-*H*-phosphonaten verläuft unter Beibehaltung der Stereochemie^[15]. Unter der Annahme, daß beide Methoden weder stereoselektiv noch stereospezifisch sind und jede Bindung zwischen den Nucleotid- und Phosphit- (5) bzw. *H*-Phosphonatbausteinen (6) nicht stereoselektiv gebildet wird, bestehen Oligo-S aus einem Gemisch von 2^n -Diastereomeren, wobei n die Zahl der Phosphorothioateinheiten angibt. Der Gehalt eines einzelnen Diastereomers im Gemisch sollte demnach 2^{-n} sein. Jedoch war schon aus Pionierarbeiten von Burgers und Eckstein^[16] sowie Marlier und Benkovic^[17] zur Synthese der Stereoisomere 12 $\text{U}_{\text{PS}}\text{A}$ bzw. $\text{A}_{\text{PS}}\text{A}$ bekannt, daß die (R_p)- und (S_p)-Diastereomere nicht äquimolar vorliegen. Durch eine Phosphorodichloridit-Kupplung (9) mit anschließender Sulfurierung des Phosphits 10 erhielten beide Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Diastereomere des Diribonucleosid-3',5'-phosphorothioats 12 (Schema 3) und bestimmten dessen Konfiguration am Phosphoratom. Darüber hinaus zeigten jüngste Studien, daß die Kondensation von 5'-*O*-DMT-nucleosid-3'-*O*-(*O*-2-cyanoethyl-*N,N'*-diisopropylphosphoramiditen mit 5'-OH-Nucleosiden, die über das 3'-*O*-Atom an einen Träger gebunden sind, nach der Abspaltung der Schutzgruppen die in Tabelle 1 gezeigte Diastereomerenzusammensetzung von (R_p)- und (S_p)-Dinucleosid-3',5'-phosphorothioaten ergeben. Dabei wurden die 5'-OH-Nucleoside nach einer üblichen Synthesemethode für Oligonucleotide hergestellt, wobei der Oxidationsschritt mit Iod durch eine Sulfurierung^[8, 12g] ersetzt wurde. Schon früher wurde gezeigt^[8c], daß die Diastereomerenzusammensetzung der Ausgangsverbindung 5'-*O*-DMT-*N*-benzoylcytidin-3'-*O*-(*O*-methyl-*N,N'*-diisopropylphosphoramidit) das Diastereomerenverhältnis des Dicytidin-3',5'-phosphorothioats nicht beeinflusst.

Die Zusammensetzung eines mit einer bei jeder der n Kupplungen beibehaltenen Diastereoselektivität x für (R_p) und y ($y = 1 - x$) für (S_p) erhaltenen Diastereomergemischs kann



Wojciech J. Stec, geb. 1940 in Warschau, erhielt sein Diplom 1963 und promovierte 1968 an der Technischen Universität Lodz. Nach seinem Postdoc-Aufenthalt an der Vanderbilt University, Nashville, USA, im Jahre 1970 ging er zurück nach Lodz und wurde dort 1974 Associate Professor am Zentrum für molekulare und makromolekulare Studien der polnischen Akademie der Wissenschaften. 1979 wurde er ordentlicher Professor und Direktor des Instituts für bioorganische Chemie. Seine Forschungsschwerpunkte sind die Synthese und Stereochemie von Organophosphaten, die stereochemische Analyse von cyclischen Phosphaten, die Isotopenmarkierung, der Wirkungsmechanismus von alkylierenden Antitumorwirkstoffen und die stereoselektive Aktivität von Enzymen. Seit kurzem beschäftigt er sich mit Protein-Bioengineering und „Antisense“-Technik. 1983 und 1984 arbeitete er als Senior Visiting Scientist bei der Food and Drug Administration, 1992 und 1993 als Scholar-in-Residence an den National Institutes of Health (beides in Bethesda). Er ist seit 1981 ein gewähltes Mitglied der Societas Scientiarum ac Litterarum Varsoviensis.



Schema 3. Die von Eckstein (a) und Benkovic (b) für die Synthese von Diribonucleosid-3',5'-phosphorothioaten angewandte Phosphit-Methode [16, 17]. a) $R^1 = p$ -Chlorphenoxycetyl; $R^2 =$ Methoxytetrahydropyranyl; $R^3, R^4 = O$ -Methoxymethyliden; $R^5 =$ Phenyl; $B^1 = B^1' =$ Ura; $B^2 = N^6$ -Benzoyl-Ade; $B^{2'} =$ Ade. b) $R^1 =$ Methoxytrityl; $R^2 = O$ -Nitrobenzyl; $R^3, R^4 =$ Benzoyl; $R^5 =$ Methyl; $B^1 = N^6$ -Benzoyl-Ade; $B^2 = N^6, N^6$ -Dibenzoyl-Ade; $B^{1'} = B^{2'} =$ Ade.

Tabelle 1. Anteil an (R_p)-Isomer in Dinucleosid-3',5'-phosphorothioaten ($N_p N'$) [a].

N'/N	dA	dG	dC	dT
dA	51.7	42.6	53.4	53.8
dG	55.3	51.0	55.2	56.0
dC	57.0	48.6	59.7	62.7
dT	58.6	50.8	60.0	59.6

[a] Dinucleosid-5',3'-phosphorothioate ($N_p N'$ mit 5'-terminalem N) wurden nach Standard-Methoden gekuppelt (DNA-Synthesizer, Applied Biosystems Modell 380 B) und anschließend mit einer Lösung von 0.08 M Bis(diisopropoxyphosphinothioyl)disulfid in Acetonitril/Pyridin (2:1 v/v) (ca. 400 μ L) für 45 s umgesetzt (Sulfurierung). Zuletzt wird die Dimethoxytritylgruppe abgespalten. Das Rohprodukt wurde mit HPLC (Supelcosil-RP-18-Säule (5 μ , 2.3 mm \times 250 mm), Acetonitril-Gradient (0.5% CH_3CN min^{-1} ; Flußrate 1 mL min^{-1}) in 0.1 M TEAB ausgehend von 0%) analysiert. Die angegebenen Anteile an (R_p)-Isomer wurden durch Integration der Signale ermittelt. Die Kupplungsausbeute betrug >98%.

($y = 1 - x$) für (S_p) erhaltenen Diastereomergemischs kann anhand der polynomen Gleichung (a) berechnet werden. Für ein

$$(x + y)^n = x^n + \binom{n}{1} x^{n-1} y + \dots + \binom{n}{n-1} x y^{n-1} + y^n \quad (a)$$

mit einer Diastereoselektivität von $x = 0.6$ erhaltenes Pentamer (z.B. $d[(C_{PS})_4 C]$) ergibt sich damit zum Beispiel $(x + y)^4 = x^4 + 4x^3y + 6x^2y^2 + 4xy^3 + y^4 = 0.1296 + (4 \times 0.0864) + (6 \times 0.0576) + (4 \times 0.0384) + 0.0256$. Somit enthält das Gemisch aus sechzehn (2^4) Diastereomeren: 12.96% (all- R_p), 2.56% (all- S_p), vier mögliche „(all- R_p)-minus-eins“-Diastereomere, die je mit einer Ausbeute von 8.64% gebildet werden, sechs mit gleicher Anzahl an (R_p)- und (S_p)-Internucleotidbindungen, jeweils mit einer Ausbeute von 5.76%, und vier mögliche „(all- S_p)-minus-eins“-Diastereomere, die mit je 3.48% Ausbeute gebildet werden. Bemerkenswert an diesem Beispiel ist das Diastereomerenverhältnis von (all- R_p) zu (all- S_p) von ca. 5:1.

Tatsächlich stimmt das Diastereomerenverhältnis von $d(C_{PS}C_{PS}C)$ mit den berechneten Werten: (R_p, R_p):(S_p, R_p):(R_p, S_p):(S_p, S_p) = $(0.6 \times 0.6):(0.6 \times 0.4):(0.4 \times 0.6):(0.4 \times 0.4)$ überein (Abb. 1)^[18]. Diese Zuordnung zeigt auch, daß die Dia-

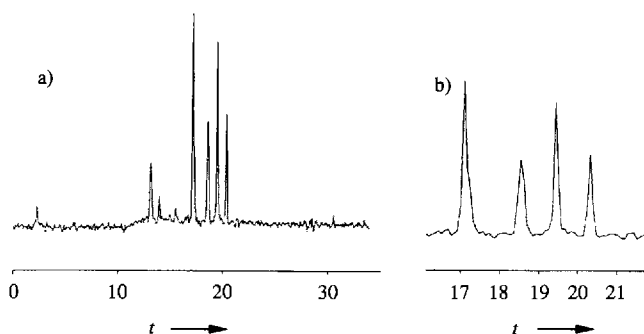


Abb. 1. Chromatogramm einer RP-HPLC-Trennung der vier Diastereomere des nach der Phosphoramidit-Methode synthetisierten Trimers $d(C_{PS}C_{PS}C)$. Die experimentellen Details sind in Tabelle 1 angegeben. a) Gesamtchromatogramm des Rohprodukts; b) gespreizter Ausschnitt, der die Basislinien-getrennten Peaks der Diastereomere zeigt. Retentionszeit t in min.

stereoselektivität aufeinanderfolgender Kupplungsschritte bei Cytidinkomponenten nahezu gleich ist. Dies bedeutet, daß in Oligocytidinphosphorothioaten das relative Verhältnis von Phosphorothioateinheiten mit (R_p)- oder (S_p)-Konfiguration in jeder Kettenposition ca. 60:40 sein wird. Weitere experimentelle Daten zeigen, daß bei der Dimerbildung von Oligodesoxyadenosinphosphorothioaten das relative Verhältnis von (R_p):(S_p) = 52:48 vorliegt (siehe Tabelle 1), das jedoch um ca. 1% pro Kupplungsschritt zunimmt. Somit beträgt die (R_p)-Selektivität des zweiten Kupplungsschritts 53%, des dritten 54% etc. Falls diese Tendenz extrapoliert werden kann, sollte der 49. Kupplungsschritt (R_p)-diastereoselektiv mit 100% *de* verlaufen. Den Einfluß einer sich ändernden Diastereoselektivität während eines mehrstufigen Kupplungsprozesses auf die am Ende vorliegende Diastereomerenzusammensetzung zeigt Abbildung 2 anschau-

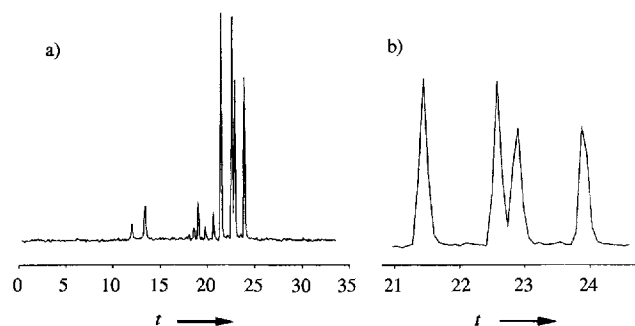


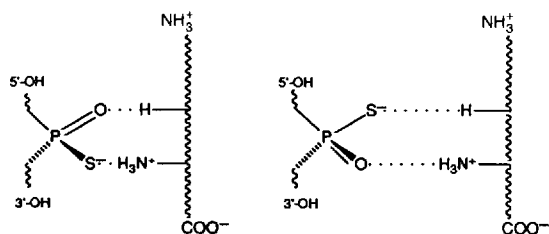
Abb. 2. RP-HPLC-Trennung des Rohprodukts von Trimer $d(A_{PS}A_{PS}A)$, hergestellt und analysiert wie in Abb. 1 beschrieben. Die (R_p, S_p)- und (S_p, R_p)-Diastereomere (Peaks in der Mitte von Abb. 2b) konnten nicht vollständig getrennt werden (keine Basislinientrennung). Retentionszeit t in min.

lich, aus der ersichtlich wird, daß selbst während der Synthese des Trimers $d(A_{PS}A_{PS}A)$ das Verhältnis der erhaltenen Diastereomere mit den Konfigurationen (R_p, R_p):(R_p, S_p):(S_p, R_p):(S_p, S_p) sich wie 29.1:26.1:22.7:22.1 verhält^[18].

3. Biologische Bedeutung der Chiralität von Oligonucleosidphosphorothioaten

Welche Konsequenzen resultieren aus der nichtstatistischen Verteilung der einzelnen diastereomeren Einheiten in Konstruk-

ten wie **1**? Werden Antisense-Oligonucleotide **1** als potentielle Therapeutica eingesetzt, so ist deren Wechselwirkung mit Proteinen nach der Einschleusung in den Körper unvermeidbar. So können beispielsweise Oligo-S wie $d[(C_{PS})_n C]$ mit $n > 14$ die Aktivität von humanen DNA-Polymerasen und RNasen inhibieren^[5a]. Variiert man die Verteilung spezieller Diastereomere, könnten schlimmstenfalls von Ansatz zu Ansatz die biologischen Effekte von **1**, die aus der unterschiedlichen Wirkung der einzelnen Diastereomere von **1** auf die Vielzahl von Proteinen im inter- und intrazellulären Medium resultieren, nicht reproduzierbar sein. Aus durch Untersuchungen von Eckstein^[19], Benkovic et al.^[20] und Frey^[21] initiierten Arbeiten ist bekannt, daß funktionelle Proteine wie Polymerasen und Nucleasen mit Phosphorothioat-Analoga von Biophosphaten diastereoselektiv wechselwirken^[22]. Diese Diastereoselektivität ist jedoch nicht vorhersagbar, da sie für jedes Enzym aus der unterschiedlichen räumlichen Anordnung funktioneller Gruppen (auch der Orientierung von Peptidbindungen) in Proteinen resultiert, die mit den Sauerstoffatomen der Phosphatgruppe über Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken wechselwirken^[23]. Vor kurzem wurde vermutet, daß die Diastereoselektivität Enzym-katalysierter Prozesse beim Abbau von Oligonucleotiden mit Phosphorothioateinheiten auf einer gerichteten Zwei-Zentren-Wechselwirkung zwischen Phosphorothioateinheit und Protein beruht (Schema 4)^[22f]. Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwi-



Schema 4. Darstellung der hypothetischen gerichteten Zwei-Zentren-Wechselwirkung zwischen der Phosphorothioatgruppe und Proteinen, die die Diastereoselektivität einiger Nucleasen bewirken könnte. Im Schema links ist die „produktive“ Anordnung einer Phosphorothioatfunktion relativ zum Protein (wie im natürlichen Oligonucleotid) dargestellt, im Schema rechts die „unproduktive“ Wechselwirkung.

schen Oligonucleotiden mit 5'-OH...GAATTC...3'-OH-Sequenz und dem Restriktionsenzym *EcoRI* unterstützten diese Hypothese. Wird die ...A_{PS}T... Internucleotidgruppe durch ...A_{PS}T... mit (S_P)-Konfiguration ersetzt, verbessert dies die Bindung zwischen Oligonucleotid und diesem speziellen Enzym^[22g]. Darüber hinaus legt der Vorschlag, daß die Aufnahme von Oligonucleotiden in die Zelle einen speziellen Rezeptor oder ein Transportprotein^[4b, 24] erfordert, die Vermutung nahe, daß deren Durchschleusung durch die Zellmembran (entweder in oder aus der Zelle) aufgrund der Chiralität sowohl der Rezeptoren als auch der Transportproteine diastereoselektiv sein sollte. Diese Diastereoselektivität könnte Zell- oder Spezies-abhängig sein und sich sowohl auf die Pharmakokinetik als auch die Verteilung im Organismus auswirken.

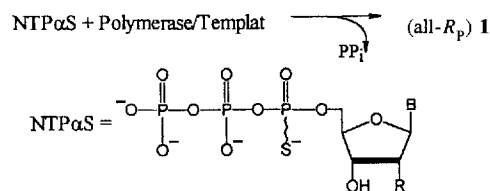
Das Prinzip der Antisense-Aktivität von **1** läßt darauf schließen, daß eine Affinität von **1** gegenüber der Ziel-RNA (oder DNA) vorhanden ist^[9]. Selbst auf der Basis sehr vereinfachender Modellstudien^[25] könnte man eine Abhängigkeit dieser Affinität von der Stereokonfiguration am Phosphoratom postulie-

ren. Da selbst der Einfluß von Oligo-S mit optimaler Anordnung der chiralen Gruppen in bezug auf die Wechselwirkungen mit Proteinen und/oder RNA nicht vorhersehbar ist, erscheint der zuverlässigste Ansatz um biologische Aktivität zu erhalten, dem lebenden Organismus eine Mischung aller Diastereomere von **1** anzubieten. Die kompetitive, natürliche Auslese wirksamer Diastereomere in jedem Schritt des Gesamtprozesses würde zur biologischen Aktivität führen. Dabei wird vorausgesetzt, daß zusätzlich vorhandene, „falsche“ Komponenten dieses Diastereomergemischs weder die Wirksamkeit verhindern, noch für das biologische System schädlich sind. Es sei nochmals betont, daß alle bisher berichteten biologischen Ergebnisse, auch über die inhibitorische Wirkung von Oligo-S auf die Proteinbiosynthese, mit Diastereomergemischen von **1** erhalten wurden^[4-6]. Diese Gemische genügen jedoch nicht den gesetzlichen Vorschriften^[26] für neue potentielle Wirkstoffe, die eine präzise stereochemische Beschreibung der Wirkstoffmoleküle zwingend vorschreiben, falls dies möglich ist. Diese Haltung fordert Chemiker auf, eine ideale Lösung auszuarbeiten, d.h. eine stereo-kontrollierte Synthesemethode für **1** zu entwickeln, die zu einem einzelnen gewünschten Diastereomer von **1** führt.

4. Stereokontrollierte chemische Synthese von Oligonucleosidphosphorothioaten

Organische Verbindungen können mit Enzymen stereokontrolliert hergestellt werden. Für die Synthese von **1** könnten Polymerasen, Transferasen und Nucleasen nützlich sein^[27], da diese die Synthese und den Abbau von Phosphorothioateinheiten unterstützen.

Die erste Synthese von **1**, die sich später als (R_P)-stereoselektiv erwies, wurde enzymatisch (mit Polymerase) durchgeführt (Schema 5)^[7]. Endonucleasen für den diastereoselektiven Abbau von



Schema 5. Enzymatische Synthese von (all-R_P)-Polynucleosidphosphorothioaten. Templat = DNA; R = H, B = Ade, Gua, Cyt, Thy oder R = OH, B = Ade, Gua, Cyt, Ura.

1 mit ungewollter (R_P)- oder (S_P)-Konfiguration können in der Praxis nur für kurze Homopolymere wie Pentacytidinphosphorothioate $d[(C_{PS})_4 C]$ eingesetzt werden^[18, 28]. Ein Diastereomergemisch von $d[(C_{PS})_4 C]$ wurde mit Endonuclease P1 verdaut, die selektiv sämtliche (S_P)-konfigurierten Phosphorothioatester spaltet^[22k]. Neben intaktem (all-R_P)- $d[(C_{PS})_4 C]$ wurden die zusätzlich vorliegenden optisch reinen 5'-phosphorothioylierten Einheiten mit basischer Phosphatase in die entsprechenden 5'-OH-Dimere, -Trimere und -Tetramere mit (all-R_P)-konfigurierten Internucleotidphosphorothioatgruppen überführt (Abb. 3).

Der diastereoselektive Abbau von Oligo-S mit ungewollter Konfiguration am Phosphoratom ist auf solche Phosphorothioate beschränkt, die diastereoselektiv hergestellt wurden,

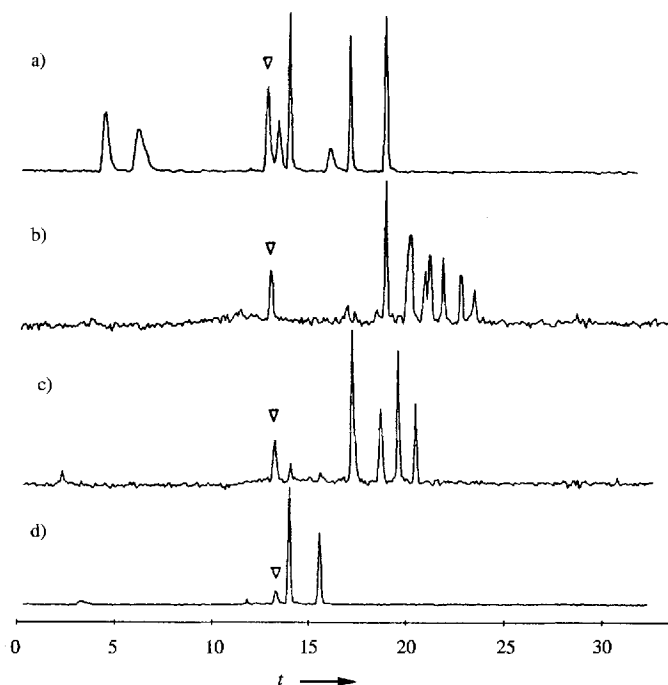


Abb. 3. RP-HPLC-Chromatogramme a) des Stamm-Tetramers $d(C_{PS}C_{PS}C_{PS}C)$, das nach Nuclease P1/basischem Phosphatase-Verdau erhalten wird, b) des Rohprodukts von Tetramer $d(C_{PS}C_{PS}C_{PS}C)$, c) des Trimers $d(C_{PS}C_{PS}C)$, d) des Dimers $d(C_{PS}C)$. Oligo-S wurden nach der Phosphoramidit/Sulfurierungs-Methode hergestellt und, wie in Tabelle 1 beschrieben, analysiert. Ein Gradient von $0.66\% \text{ min}^{-1}$ wurde benutzt. Retentionszeit *t* in min. Die mit Dreiecken markierten Signale entsprechen Benzamid.

d. h. Oligo-S mit angereicherter (R_p)- oder (S_p)-Konfiguration. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, so ist ein enzymatischer Abbau in den meisten Fällen nicht möglich, da das gewünschte Produkt selbst im statistisch einfachsten Fall nur einen kleinen Bestandteil (2^{-n}) des Ausgangsgemischs darstellt. Darüber hinaus wurde bis jetzt noch keine Endonuclease gefunden, die die entgegengesetzte Diastereoselektivität von Nuclease P1 aufweist, so daß die Gewinnung von (all- S_p)-konfigurierten Oligonucleotiden **1** selbst aus einem Diastereomerengemisch mit überwiegender (S_p)-Konfiguration bis jetzt noch nicht möglich ist. Deshalb ist der einzig vernünftige Ansatz zur Synthese von Oligo-S mit bestimmter Nucleobasensequenz und definierter Chiralität an jedem Phosphoratom eine stereokontrollierte, hochstereoselektive chemische Methode.

Welche Synthesestrategien können zu Oligo-S mit definierter Stereochemie an den Phosphoratomen führen? Unter den zahlreichen Methoden, die in 100 Jahren Phosphorchemie erarbeitet wurden^[29], könnten folgende Strategien zu stereokontrollierten Synthesen von diastereomerenreinen Oligo-S führen: a) die stereoselektive oder stereospezifische nucleophile Substitution am trikoordinierten Phosphoratom, b) die stereoselektive Synthese oder stereoselektive Sulfurierung von Intermediaten mit Internucleotid-*H*-phosphonateinheiten; c) die stereoselektive oder stereospezifische nucleophile Substitution am tetrakoordinierten Phosphoratom.

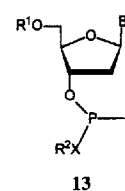
Bei der Wahl einer möglichen Strategie muß beachtet werden, daß die Diastereomerenreinheit (diastereomeric purity *dp*) von **1** nach Gleichung (b) definiert ist. Falls $p_1 = p_2 = \dots = p_n$,

$$dp = p_1 \cdot p_2 \cdot p_3 \cdot \dots \cdot p_n \quad (b)$$

dann gilt $dp = p^n$, wobei *n* die Anzahl an Phosphorothioateinheiten und p_1, p_2, \dots, p_n die Diastereoselektivität der entsprechenden Kupplungsschritte bezeichnet. Hieraus folgt eindeutig, daß eine Diastereoselektivität von weniger als 0.95 bei einem beliebigen Kupplungsschritt gegen diese Strategie spricht.

4.1. Nucleophile Substitution an trikoordinierten Phosphoratomen

Stereoselektive/stereospezifische Synthesen von **1** mit dem Substrat **13** (Schema 6), das ein trikoordiniertes Phosphoratom (P^{III}) enthält, unterliegen folgenden Beschränkungen: Substrat **13** muß in seine *P*-Enantiomere trennbar sein, der Rest R^1 muß eine säurelabile Schutzgruppe sowie *X* entweder ein Sauerstoff- oder Schwefelatom sein, und R^2 sollte durch die Spaltung der $X-R^2$ -Bindung entfernt werden können. Falls $R^2X = L$, ermöglichen die prochiralen Substrate **13** den diastereoselektiven Austausch (Ersatz) von (*pro-R*) oder (*pro-S*)-Gruppen.

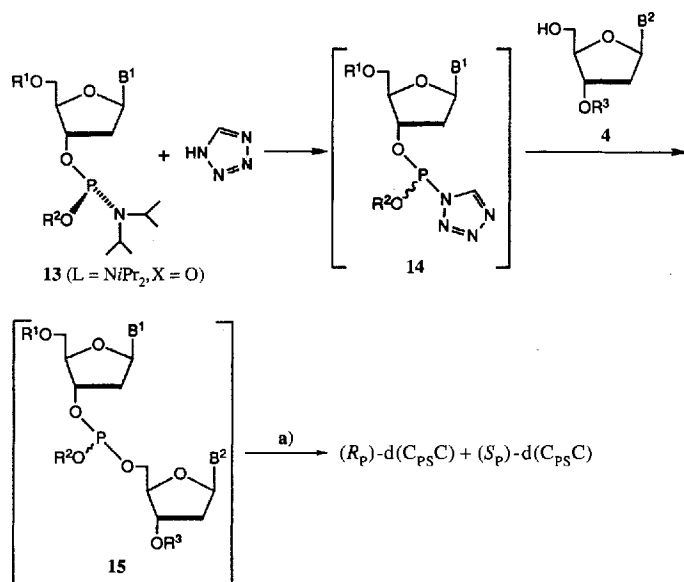


Schema 6. $R^1 = \text{DMT, Pixyl etc.}$; $R^2 = \text{Alkyl, Aryl}$; $X = \text{S, O}$ oder $R^2X = \text{Me}$; $B^1 = \text{geschütztes Ade, Gua, Cyt, Thy}$; $L = \text{Abgangsgruppe}$.

In ersten Versuchen zur diastereoselektiven Synthese von **1**^[8e] wurden die Substrate **13** ($R^1 = \text{DMT}$, $R^2X = \text{MeO}$, $L = iPr_2N$, $B^1 = \text{CytBz}$) diastereomerenrein erhalten, jedoch schien deren Aktivierung mit Tetrazol eine Epimerisierung am Phosphoratom zu verursachen. Neben der Protonierung kommt es bei der Aktivierung von **13** mit Tetrazol auch zur Substitution der $NiPr_2$ -Gruppe durch Tetrazol. Die Intermediate **14** epimerisieren rasch in Gegenwart von überschüssigem Tetrazol, höchstwahrscheinlich durch einen schnellen Substituenten-Substituenten-Austausch (Schema 7).

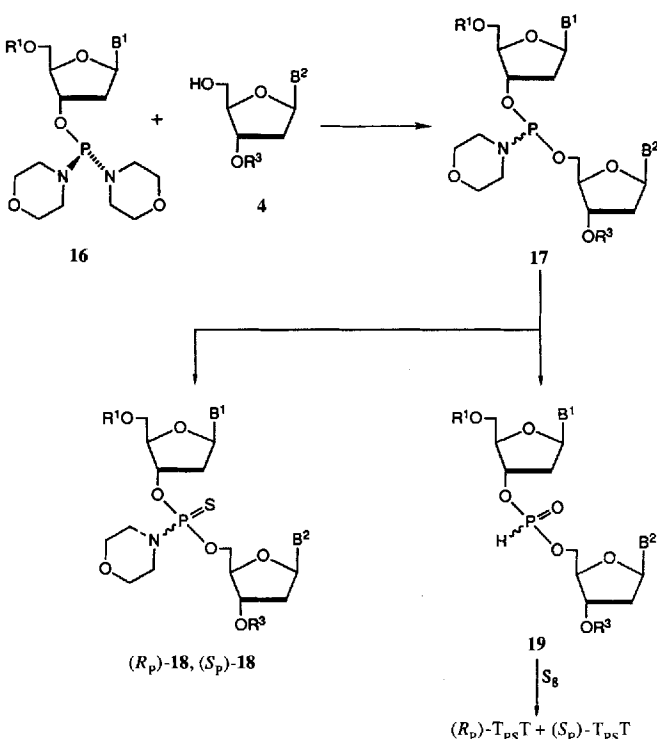
Detaillierte mechanistische Untersuchungen bestätigen diese frühe Hypothese^[30]. Demnach fällt die Zwischenstufe Dinucleosid-3',5'-*O*-methylphosphit **15** als Diastereomerengemisch an. Die Umsetzung von **15** mit Schwefel unter Erhalt der Stereoconfiguration und die anschließende Abspaltung der Schutzgruppen von den Amino- und Hydroxygruppen sowie die vom Trägermaterial ergab Dicytidin-3',5'-phosphorothioate in einem Diastereomerenverhältnis (R_p):(S_p) = 60:40. In ähnlichen Studien zur diastereoselektiven Synthese von Dinucleosid-3',5'-methanphosphonaten nutzten Lebedev et al.^[31] die Substrate **13** ($R^2X = \text{Me}$, $L = iPr_2N$). Als Nucleosidkomponente wurde 5'-*O*-Trifluoracetyl-3-*O*-acetylthymidin und als Katalysator 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) eingesetzt. Nach einer milden Oxidation und der Abspaltung der Schutzgruppen schien das entstandene Dinucleosid-3',5'-methanphosphonat als nahezu 1:1-Diastereomerengemisch vorzuliegen.

Diese entmutigenden Versuche schließen natürlich Erfolge mit anderen P^{III} -Verbindungen nicht aus. Vielleicht gelingt eine diastereoselektive Synthese mit Substraten **13**, die große und/oder chirale Reste R^2 (die trotzdem eine selektive R^2-X -Bindungs-



Schema 7. Die diastereomerenreinen Substrate **13** epimerisieren in Gegenwart von Tetrazol. Dadurch ist die stereokontrollierte Synthese von **1** mit der Phosphoramidit-Methode nicht möglich. a) 1. S_8 , 2. Abspaltung der Schutzgruppen. $\text{R}^1 = \text{DMT}$; $\text{R}^2 = \text{Me}$; $\text{R}^3 = \text{LCA-CPG}$; $\text{B}^1 = \text{B}^2 = \text{CytBz}$.

spaltung ermöglichen) enthalten. Die Abgangsgruppe L erfordert möglicherweise eine andere Art der Aktivierung als die für $L = \text{NR}_2$ genutzte, oder man muß NR_2 -Gruppen einsetzen, die nicht einem schnellen Substituent-Substituent-Austausch unterliegen. Eine potentielle gute Abgangsgruppe L ist der 4-Nitrophenoxyst^[32], falls das entstehende 4-Nitrophenoxid-Ion so-



Schema 8. Die Synthesen von Oligo-S mit der Phosphoramidit-Methode konnten nicht diastereoselektiv durchgeführt werden. $\text{R}^1 = \text{DMT}$; $\text{R}^3 = \text{Ac}$; $\text{B}^1 = \text{B}^2 = \text{Thy}$. $(R_p)\text{-}$ und $(S_p)\text{-18}$ sowie $(R_p)\text{-}$ und $(S_p)\text{-T}_{\text{PS}}\text{T}$ entstehen jeweils im Verhältnis von ca. 1:1.

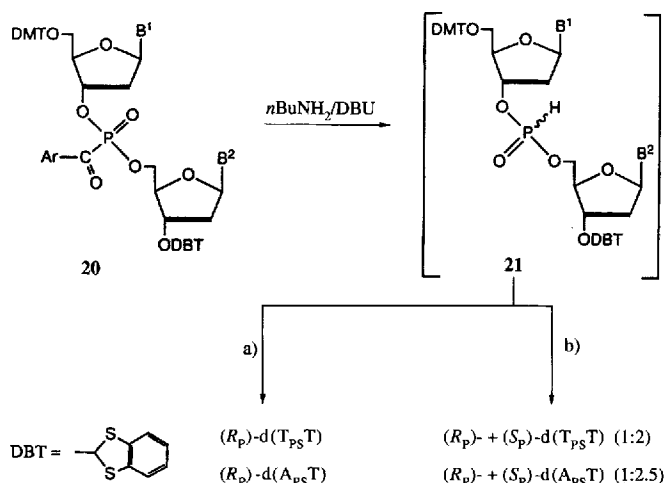
fort nach der Freisetzung aus dem Reaktionsgemisch entfernt wird, da es sonst die Epimerisierung von **13** bewirkt.

Selektivität konnte auch bei der diastereoselektiven Reaktion von P-prochiralen P^{III} -Verbindungen (**13**, $\text{R}^2\text{X} = \text{L}$) mit der 5'-OH-Funktion der Nucleosidkomponenten erzielt werden. Eine Diastereoselektion während dieser Kupplung ist aufgrund der chiralen Hilfsgruppen (2'-Desoxyribosyleinheiten) beider Reagentien (3'-O-phosphityliertes Nucleosid und 5'-OH-Nucleosid) möglich, da einer der beiden konkurrierenden Reaktionswege, die zu $(S_p)\text{-}$ bzw. $(R_p)\text{-}$ Diastereomeren führen, kinetisch begünstigt sein könnte. Beim Entwickeln der Phosphordiamidit-Methode zur Synthese von Oligonucleotiden^[33] wurde 5'-O-DMT-thymidin-3'-O-phosphorodimorpholidit **16** synthetisiert und Tetrazol-katalysiert mit 3'-O-Acetylthymidin **4** umgesetzt (Schema 8). Leider waren weder beim Phosphorothioat **18** noch beim H-Phosphonat **19** eines der Diastereomeren nennenswert angereichert^[34]. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß Phosphoramiditsubstrate wie **13** bei der Aktivierung durch einen sauren nucleophilen Katalysator zur Epimerisierung am Phosphorzentrum neigen.

4.2. Stereoselektive Bildung und Sulfurierung von Oligonucleosid-H-phosphonaten

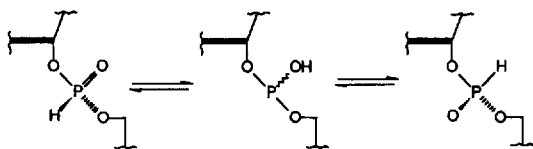
Der H-Phosphonat-Ansatz zur Synthese von Oligonucleotiden geht von 5'-O-DMT-nucleosid-3'-O-H-phosphonaten als P-prochiralen Phosphonatsubstraten **3** aus. Im Prinzip können die Verbindungen **3** mit sterisch anspruchsvollen Pivaloyl-^[35a] oder Adamantoylchloriden^[35c] stereoselektiv aktiviert werden und zu chiralen Träger-gebundenen Oligonucleosid-H-phosphonaten reagieren. Aus diesen entstehen nach einer Tandemsulfurierung, der Abspaltung vom Träger und der Nucleobasenschutzgruppen Oligo-S^[36]. Jedoch ist bekannt, daß das Diastereomerenverhältnis von Didesoxyribonucleosid-3',5'-H-phosphonaten **6** nahezu 1:1 beträgt^[37], so daß ein ähnliches Verhältnis für die entsprechenden, durch eine anschließende Sulfurierung entstehenden Dinucleosid-3',5'-phosphorothioate^[36b] bestimmt ist. Vor kurzem berichteten Stawinski et al., daß nach seiner Methode^[35] hergestellte Diribonucleosid-3',5'-H-phosphonate $\text{C}_{\text{PH}}\text{U}$ im Diastereomerenverhältnis von 6:1 vorliegen^[38]. Unabhängig davon wurde gezeigt, daß die Diastereomere der H-Phosphonate **6** chromatographisch (Silicagel)^[37, 38] getrennt und unter Erhaltung der Konfiguration sulfuriert werden können. Diese Stabilisierung der Konfiguration am Phosphoratome unsymmetrischer O,O-Dialkyl-H-phosphonate war angesichts klassischer Untersuchungen zur Synthese von diastereomerenreinen O-Menthylphenylphosphonaten^[39] und enantiomeren O-Isopropylmethylphosphonaten^[40] nicht überraschend. Darüber hinaus war bekannt, daß bei der Sulfurierung von P-chiralen O,O-Dialkyl-H-phosphonaten die Konfiguration am Phosphoratome nicht verändert wird^[15]. Deshalb scheint die stereokontrollierte Synthese von Oligonucleosid-H-phosphonaten als Vorstufen von Oligo-S (oder anderen P-chiralen Analoga der Oligonucleotide) ein noch immer unerforschtes Zugang zu **1** zu sein, der besonders angesichts der Ergebnisse von Hata et al.^[41] und kürzlich von Battistini et al.^[42] mehr Beachtung verdient.

Hata et al. fanden, daß der Abbau von Dinucleosid-3',5'- α -ketophosphonaten **20** bei Zugabe von *n*-Butylamin und 1,8-Di-



Schema 9. Die DBU-katalysierte Aminolyse der Phosphonate **20** verläuft bemerkenswert diastereoselektiv, wie das Diastereomerenverhältnis der sulfurierten Produkte zeigt. a) 1. S_8 , 2. Entschützen der OH-Gruppen; b) 1. Entschützen der OH-Gruppen, 2. $Me_3SiCl/Et_3N + S_8$. $B^1 = Ade, Thy$; $B^2 = Thy$; $Ar = Phenyl, p$ -Chlorphenyl.

azabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) stereoselektiv verläuft (Schema 9). Bei diesen Untersuchungen wurden die Intermediate **21** nicht isoliert, sondern mit Trimethylsilylchlorid und mit elementarem Schwefel umgesetzt. Abhängig von der Art der Schutzgruppen und der Abfolge der Schutzgruppenabspaltung/Sulfurierungsschritte wurden entweder reine (R_p)-Dinucleosid-3',5'-phosphorothioate oder ein Diastereomerenmischung mit einer angereicherten Komponente [$(S_p):(R_p) = 2.5:1$] erhalten. Schon von den Autoren^[41b] wurde bei d($T_{PS}T$) darauf hingewiesen, daß bei der Verwendung von Benzoyl- oder *tert*-Butyldimethylsilylgruppen anstelle von 1,3-Benzodithiol-2-yl (DBT) als 3'-terminaler Schutzgruppe die Bildung der Phosphorothioate nicht stereoselektiv erfolgt. Da bei der DBU-katalysierten Aminolyse der α -Ketophosphonate **20** ein Diastereomerenmischung eingesetzt wurde, darf angenommen werden, daß DBU das Konfigurationsgleichgewicht der entstehenden *H*-Phosphonate **21** beeinflusst (Schema 10). Hata et al. postulierten^[41b], daß die

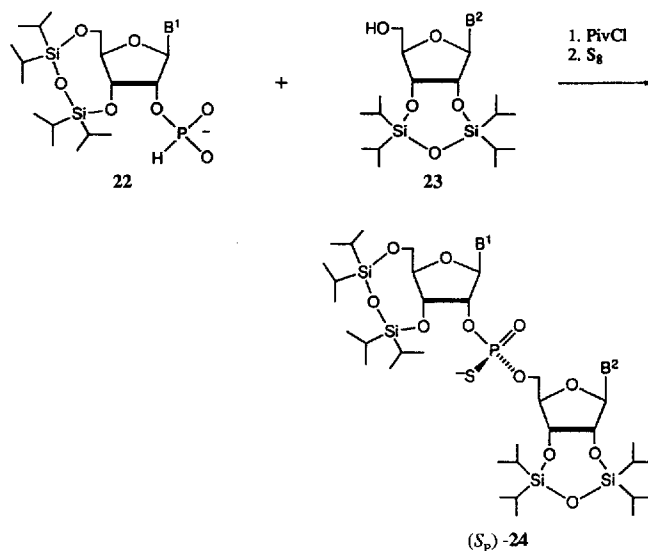


Schema 10. Beeinflussung des Konfigurationsgleichgewichts von **21** durch DBU.

im allgemeinen als nicht nucleophil geltende Base DBU^[43] mit *H*-Phosphonaten unter Bildung von pentakoordinierten Intermediate reagiert, die durch Pseudorotation unter Epimerisierung am Phosphorzentrum in die thermodynamisch stabileren Isomere übergehen. Die thermodynamische Bevorzugung wird durch den sterischen Anspruch sperriger Liganden bestimmt (und durch sterisch anspruchsvolle 5'-*O*- oder 3'-*O*-Schutzgruppen verstärkt)^[44].

Für die von Battistini et al. beobachtete Stereoselektivität bei der Synthese von 2',5'- $A_{PS}A$ ^[42] muß eine andere Erklärung gefunden werden. Die Kondensation von *N*⁶-Benzoyl-3',5'-*O,O*-

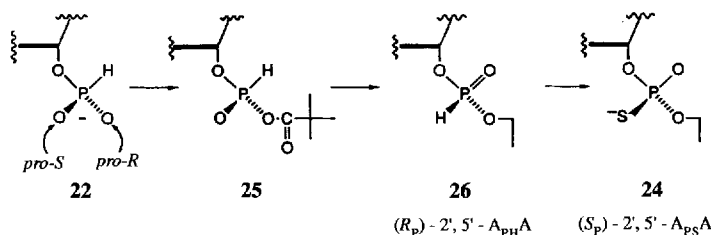
tetraisopropylidisloxanadenosin-2'-*O*-(*H*-phosphonat) **22** mit **23** in Gegenwart von Pivaloylchlorid führt nach Sulfurierung ausschließlich zu (S_p)-konfiguriertem Diadenosin-2',5'-phosphorothioat **24** (Schema 11). Interessanterweise verringert die Einführung einer *tert*-Butyldimethylsilyl-2'-*O*-Schutzgruppe, die eine höhere Konformationsbeweglichkeit als das cyclische 3',5'-*O,O*- oder 2',3'-*O,O*-1,1,3,3-Tetraisopropyl-1,3-disiloxandiyl-Schutzgruppensystem aufweist, die Diastereoselektivität [$(S_p):(R_p) = 70:30$].



Schema 11. Stereoselektive Synthese von 2',5'- $A_{PS}A$. $B^1 = B^2 = AdeBz$; Piv = Pivaloyl.

Diese bemerkenswerten Ergebnisse können durch eine diastereoselektive Aktivierung der *H*-Phosphonatfunktion von geschütztem **22** aufgrund sterisch anspruchsvoller Schutzgruppen in der Nucleosidkomponente erklärt werden. Wahrscheinlich findet eine Acylierung des anionischen **22** aus sterischen Gründen ausschließlich am (*pro-R*)-Sauerstoffatom statt, und das Anhydrid **25** reagiert stereospezifisch mit **23** zu (R_p)-2',5'- $A_{PH}A$ **26**, dessen Sulfurierung unter Konfigurationserhaltung (S_p)-**24** ergibt (Schema 12). Die oben erwähnte Erklärung impliziert, daß eine nucleophile Substitution am Phosphoratom in **25** unter Konfigurationsumkehr erfolgt; jedoch sind bislang noch keine Beispiele für eine stereochemische Umwandlung von Verbindungen des Typs **25** bekannt.

Angesichts der Ergebnisse von Hata et al. zur stereoselektiven Synthese von Oligonucleosidphosphorothioaten durch DBU-katalysierte stereoselektive Epimerisierung der Internucleotid-*H*-

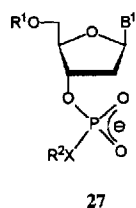


Schema 12. (*pro-R*)-*O*-Acylierung von **22**, die die diastereoselektive Synthese von 2',5'- $A_{PS}A$ bewirkt.

phosphonatfunktion sollte versucht werden, sterisch und/oder stereoelektronisch anspruchsvolle Schutzgruppen für die beteiligten Nucleoside (Nucleotide) zu entwerfen. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Anzahl potentieller Katalysatoren, unter anderem optisch aktive und sterisch anspruchsvolle Säuren und Basen, zur Veränderung des (R_p):(S_p)-Gleichgewichts von **21** untersucht; bislang ist dieser Prozess aber noch nicht kontrollierbar^[34].

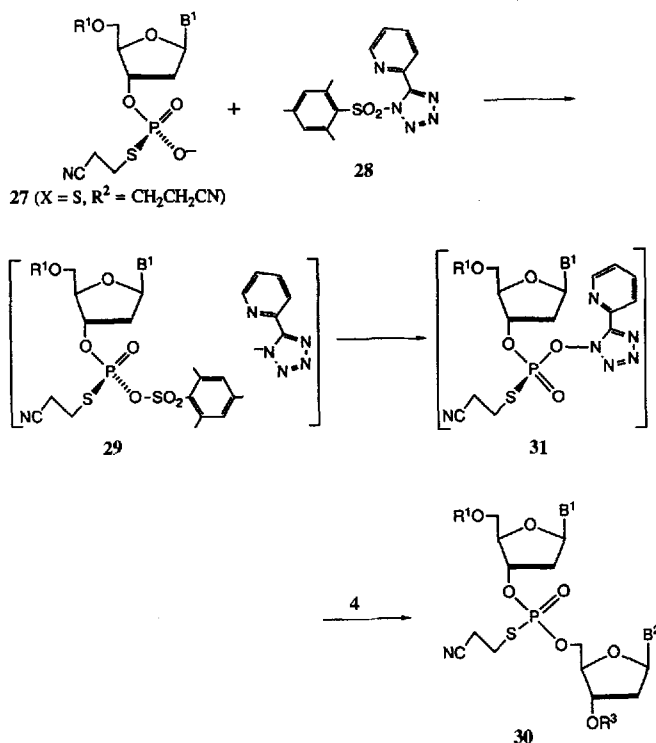
4.3. Diastereoselektive Aktivierung von prochiralen tetrakoordinierten Phosphorsubstraten

Die prochiralen Phosphorsubstrate **27** (Schema 13) können bei der Phosphortriester-Methode zur Synthese von Oligonucleotiden eingesetzt werden^[45]. Mit Alkoxy- oder Aryloxy-



Schema 13. R^1 = DMT, Pixyl etc.; R^2 = Alkyl, Aryl; X = S; B^1 = geschütztes Ade, Gua, Cyt, Thy.

gruppen als R^2X führte die Aktivierung der Phosphatfunktion zur Bildung von P-chiralen Dinucleosid-3',5'-O-alkyl(aryl)-phosphaten. Da man anschließend die O-Alkyl- oder O-Arylfunktion noch abspalten muß, hat man das Diastereomerenverhältnis des intermediären Triesters nicht bestimmt. Die Prochiralität von **27** läßt jedoch einen diastereoselektiven Aktivierungsprozeß vermuten. Tatsächlich konnten Ohtsuka et al.^[46] an einem gut dokumentiertem Beispiel zeigen, daß die Kondensation von $N^6,5'$ -O-Bis(dimethoxytrityl)adenosin-3'-O-[O-(2-chlorphenyl)phosphat] mit $N^6,5'$ -O-bis(dimethoxytrityl)adenosin in Gegenwart von 1-(2,4,6-Triisopropylphenyl)sulfonyl-5-(pyridin-2-yl)tetrazol als Aktivierungsreagens nach Abspaltung der Schutzgruppen (S_p)-konfiguriertes Didesoxyadenosin-3',5'-O-(2-chlorphenyl)phosphat ergibt. Diese Beobachtung veranlaßte Cosstick und Williams^[47], die diastereoselektive Aktivierung von **27** (B^1 = CytBz, R^2X = NCCH₂CH₂S) zu untersuchen. Bei der Reaktion von **27** mit 3'-O-Acetylthymidin (**4**, R^3 = Ac, B^1 = Thy) in Gegenwart von 1-(2,4,6-Trime-thylphenyl)sulfonyl-5-(pyridin-2-yl)tetrazol **28** entsteht das entsprechende Dinucleosid-3',5'-S-(2-cyanethyl)phosphorothioat **30**, das nach Abspaltung der Cyanethylgruppe als Diastereomeren-gemisch von d(C_{ps}T) mit einem deutlich erhöhten Anteil an (S_p)-Diastereomer vorliegt (Schema 14). Das beste Diastereomerenverhältnis (S_p):(R_p) betrug 79:21. Diese Anreicherung ist zwar für eine stereokontrollierte Synthese von **1** nicht ausreichend, gibt jedoch Anlaß zu ausführlicheren Untersuchungen. Falls die stereoselektive Bildung der Anhydride **29**, die zweifach nucleophil substituiert werden (zuerst durch das substituierte Tetrazol unter Bildung von **31**, anschließend durch Reaktion von **31** mit **4** zu den Phosphorothioatriestern **30**), Teil des Aktivierungsmechanismus von **27** ist, erhöhen Versuche, sterisch anspruchsvolle Schutzgruppen für die nicht am Kupp-

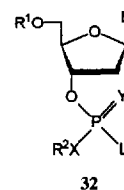


Schema 14. Diastereoselektive Aktivierung von P-prochiralen Phosphorothioaten **27** durch 1-[2,4,6-Trimethylphenylsulfonyl]-5-(pyridin-2-yl)tetrazol.

lungsprozeß beteiligten Nucleobasen und Hydroxyfunktionen einzuführen, die Wahrscheinlichkeit einer diastereoselektiven Bildung von Dinucleosid-3',5'-phosphorothioaten. Diese vielversprechende Aussicht muß mit Vorsicht betrachtet werden, da frühere Studien von Knorre, Zarytova et al. darauf hinweisen, daß die phosphorylierenden Zwischenstufen der Triester-Methode zur Synthese von Oligonucleotiden Pyrophosphate sind^[48]; deren Auftreten als Intermediate und die Möglichkeit der P-Stereoäquilibrierung können den Effekt der diastereoselektiven Aktivierung von **27** unterdrücken^[49].

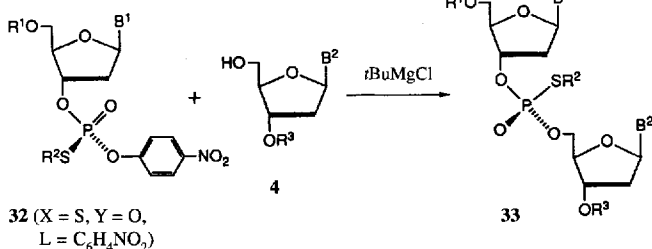
4.4. Stereoselektive nucleophile Substitution an tetrakoordinierten Phosphoratomen

Beim vielversprechendsten und einfachsten Ansatz zur stereokontrollierten Synthese von Oligo-S müssen zuerst die Substrate **32** mit Abgangsgruppe L (R^2 = Aryl, X = O, Y = S oder R^2 = Alkyl, X = S, Y = O, Schema 15), die während der nucleophilen Substitution am Phosphoratom durch die 5'-OH-Funktion des Nucleosids oder Oligonucleosids stereodefinit ersetzt wird, hergestellt werden. Erstmals beschrieben Lesnikowski et al.^[50] die Substrate **32** (R^2X = MeS, Y = O, L = 4-NO₂C₆H₄O). Die getrennten Diastereomere von **32** ergaben bei



Schema 15. R^1 = DMT, Pixyl etc.; R^2 = Alkyl, Aryl; X, Y = S, O (X ≠ Y); B^1 = geschütztes Ade, Gua, Cyt, Thy; L = Abgangsgruppe.

Reaktion mit 3'-*O*-Acetylnucleosiden in Gegenwart von *t*BuMgCl die Dinucleosid-3',5'-(*S*-methyl)-phosphorothioate **33** (Schema 16). Die CH₃-S-Bindung (Schutzgruppenabspaltung am Phosphorothioat) wurde in einem weiteren Schritt mit PhSH/NEt₃ gespalten. Diese Kupplung verläuft unter Konfigurationsumkehr am Phosphoratom mit einer Stereoselektivität größer 95 % und liefert **33** in ca. 70 % Ausbeute.



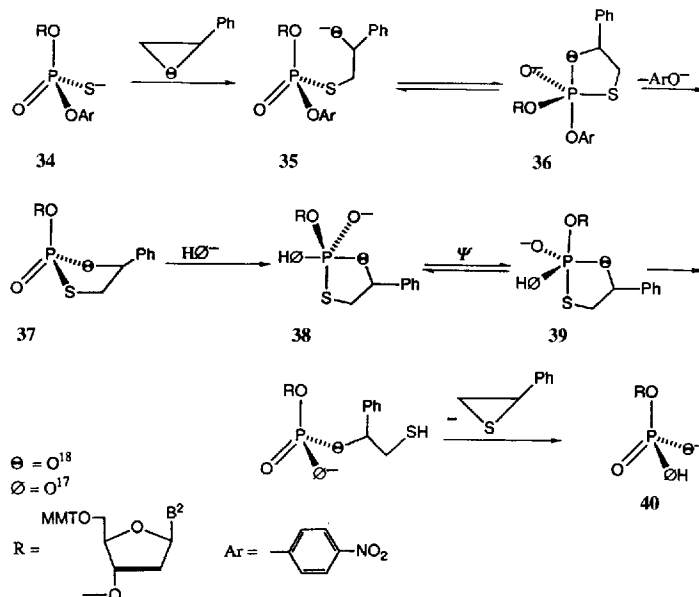
Schema 16. Stereoselektive nucleophile Substitution am Phosphoratom von **32**. Mit dieser Reaktion können kurze Oligo-S hergestellt werden. R¹ = Monomethoxytrityl (MMT); R² = Me; R³ = Ac; B¹ = B² = Thy.

Obwohl diese Methode nicht als Festphasensynthese durchführbar ist, gelang es Lesnikowski et al. zu zeigen, daß die Herstellung von optisch reinen Trimeren d(T_{PS}T_{PS}T) und Tetrameren d(T_{PS}T_{PS}T_{PS}T) möglich ist, falls als Schutzgruppe am Schwefelatom beispielsweise 4-Chlorbenzyl eingesetzt wird. Erst vor kurzem wurde mit dieser Methode (*R_P*,*R_P*)- und (*S_P*,*S_P*)-U_{PS}U_{PS}U synthetisiert^[50c]. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist das durch Hayakawa et al.^[51] in die Oligonucleotidsynthese eingeführte *t*BuMgCl für diese Methode der Katalysator der Wahl, da die Verwendung anderer Katalysatoren wie *t*BuOK, DMAP oder DBU zu nicht zufriedenstellenden Ausbeuten oder zu am Phosphorzentrum epimerisierten Produkten führt^[52].

4.5. Die Oxathiaphospholan-Methode zur Synthese von Oligonucleosidphosphorothioaten

Eine neue Synthesestrategie zur stereodefinierten Herstellung von Oligo-S beruht auf einer nucleophilen Substitution am tetrakoordinierten Phosphoratom. Sie wurde aufgrund von früheren Untersuchungen über die Umwandlung von *O*,*O*-Dialkylphosphorothioaten in die entsprechenden [¹⁸O]Phosphate ausgearbeitet^[53]. Okruszek et al. beobachteten, daß bei der Reaktion von *O*-Alkyl-*O*-arylphosphorothioate **34** mit [¹⁸O]Styrenoxid/[¹⁷O]Wasser das Schwefelatom durch [¹⁸O] und die Aryloxygruppe durch [¹⁷O]OH stereospezifisch ausgetauscht werden (Schema 17).

Eine genaue mechanistische Studie zeigte, daß der anfängliche Angriff des Schwefelatoms von **34** auf ein Kohlenstoffatom des Styrenoxidreirings unter Bildung der Zwischenstufe **35** und der anschließende Angriff des β-Alkoxy-Anions auf das Phosphorzentrum unter Eliminierung des Aryloxyrests ArO⁻ als Abgangsgruppe von **36** das Intermediat **37** liefert. Die Hydrolyse mit [¹⁷O]H₂O von Oxathiaphospholan **37** führt zur Öffnung des Heterocyclus durch ausschließliche Spaltung der P-S-Bindung. Die Zwischenstufe **38** entsteht durch den Angriff des Wassermoleküls auf **37** von der der endocyclischen P-O-Bindung gegen-

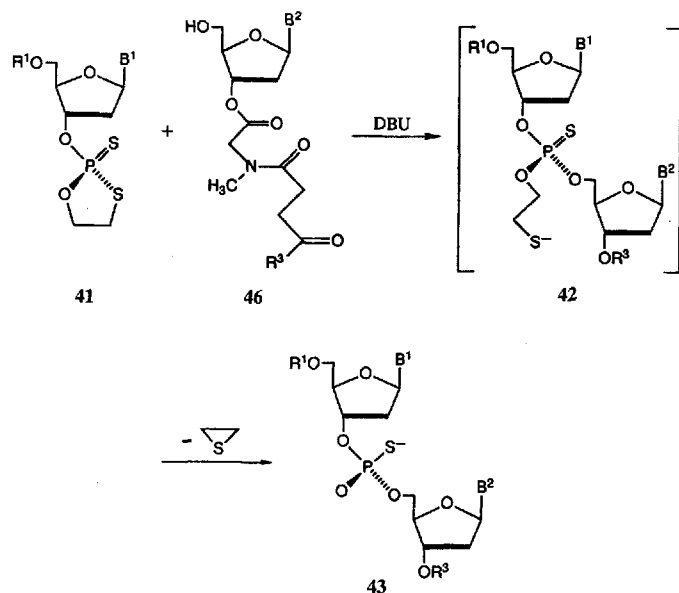


Schema 17. Mechanistische Untersuchungen zur stereokontrollierten Synthese von Nucleosid-3'-[¹⁸O, ¹⁷O]phosphaten **40**.

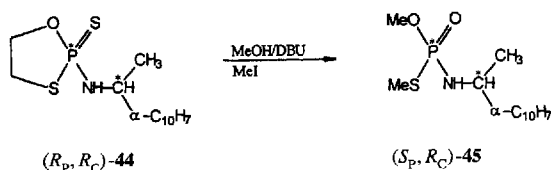
überliegenden Seite, wobei vor dem P-S-Bindungsbruch eine Pseudorotation erfolgen muß, die die Abgangsgruppe in die apikale Position (**39**) bringt. Nach der Spaltung der P-S-Bindung wird das Episulfid schnell abgespalten.

Nachdem die Monoalkyl[¹⁶O, ¹⁷O, ¹⁸O]phosphate **40** stereokontrolliert hergestellt werden konnten, war es naheliegend, die Synthese von Oxathiaphospholanen wie **41** und deren Reaktion mit Alkoholen zu untersuchen^[28]. 5'-*O*-DMT-nucleosid-3'-*O*-(2-thio-1,3,2-oxathiaphospholane) **41** wurden hergestellt und mit 3'-*O*-Acetylthymidin umgesetzt. In diesem Fall wird für den Angriff der Hydroxygruppe auf das Phosphoratom ein basischer Katalysator benötigt. In Gegenwart von Triethylamin (Raumtemperatur, 24 h, 5 % Ausbeute) oder Diisopropylamin (Raumtemperatur, 4 h, 38 % Ausbeute) kommt es zwar zur Reaktion, die besten Ergebnisse werden jedoch mit DBU erzielt. Wird DBU als Katalysator zugegeben, erfolgt ein Kupplungsschritt in 5 min, wobei nach Abspaltung der Schutzgruppen Dinucleosid-3',5'-phosphorothioat **43** in Ausbeuten größer 95 % erhalten wird (Schema 18). Nach der Diastereomerentrennung von **41** (B¹ = AdeBz, GuaiBu, CytBz, Thy) wurde die Stereoselektivität der Oxathiaphospholan-Ringöffnung untersucht, die größer 95 % ist^[28].

Modellstudien an (*R_P*,*R_C*)-2-[*N*-(α-naphthyl)ethylamino-2-thio]-1,3,2-oxathiaphospholan **44**^[54] zeigten, daß die Ringöffnung mit MeOH/DBU über einen Angriff der basenaktivierten Hydroxyfunktion von MeOH auf das Phosphoratom von der endocyclischen P-O-Bindung gegenüberliegenden Seite erfolgt (Schema 19). Gemäß den Regeln von Westheimer^[55] setzt der Zerfall des pentakoordinierten Intermediats einen Pseudorotationsschritt voraus, der die zu spaltende endocyclische P-S-Bindung in die apikale Position bringt. Nach dem Bruch der P-S-Bindung wird rasch Ethylenepisulfid abgespalten. Da dem Substrat (*R_P*,*R_C*)-**44** und dem Produkt (*S_P*,*R_C*)-**45** (das durch *S*-Methylierung des Produkts der DBU-katalysierten Methanolyse der Vorstufe **44** entsteht) die absolute Konfiguration zugeordnet und der stereochemische Verlauf der Umwandlung von **44**



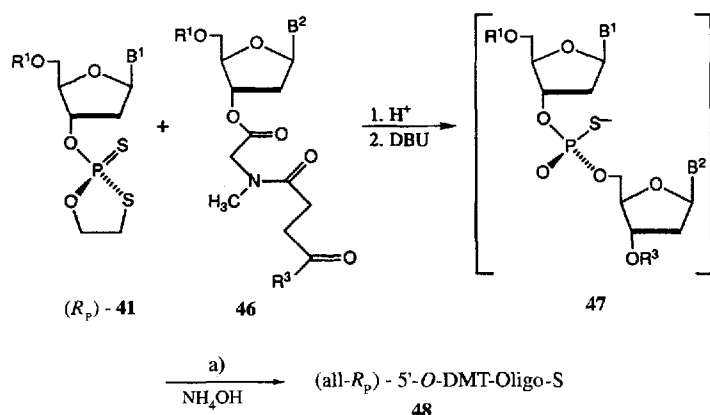
Schema 18. Basenkatalysierte Alkoholyse von 1,3,2-Oxathiaphospholanen **41**. $R^1 = \text{DMT}$; $R^3 = \text{Ac}$; $B^1 = B^2 = \text{Thy}$.



Schema 19. DBU-katalysierte Methanolyse von **44**. $\alpha\text{-C}_{10}\text{H}_7 = \alpha\text{-Naphthyl}$.

in **45** aufgeklärt werden konnte, ist auch eine vorläufige Zuordnung der absoluten Konfiguration am Phosphoratom von **41** möglich. Die schnell eluierenden Diastereomere von **41**, die mit 5'-OH-Nucleosiden zu $(S_p)\text{-d}[(N_{PS})_n]$ reagieren, sind am Phosphoratom (S_p) -konfiguriert, die langsam eluierenden Diastereomere von **41** (R_p) -konfiguriert^[54].

Auch die Kenntnis der Stereochemie von Substraten und Produkten der stereoselektiven zu Dinucleosid-3',5'-phosphorothioaten führenden Oxathiaphospholan-Methode ist für die stereokontrollierte Synthese von Oligo-S nicht ausreichend. Da der im allgemeinen verwendete Succinylanker in Gegenwart von DBU



Schema 20. Stereokontrollierte Oxathiaphospholan-Methode zur Synthese von **1**. a) 1. H^+ ; 2. **41** + DBU; 3. Blockierung; 4. Schritt 1–3 n -mal wiederholen. $R^1 = \text{DMT}$; $R^3 = \text{LCA-CPG}$; $B^1 = B^2 = \text{AdeBz}$, GuaiBu, CytBz, Thy.

abgespalten wird^[56], mußte man einen Succinylsarcosinyl-anker^[56c], der gegen 0.1 M Lösungen von DBU in Acetonitril während der Oligonucleotid-Festphasensynthese stabil ist^[56d], einsetzen. Alle vier Träger-gebundenen Nucleoside **46** wurden synthetisiert und in einer DBU-katalysierten Reaktion mit den Diastereomeren von **41** umgesetzt (Schema 20). Pentadesoxycytidin-, Octathymidin- und Dodecadesoxyadenosinphosphorothioate wurden auf diese Weise diastereomerenrein erhalten^[28, 57]. Die stereokontrollierte Synthese von $(\text{all-}R_p)$ - und $(\text{all-}S_p)\text{-d}[(A_{PS})_{11}A]$ zeigte, daß mit komplementärer Dodecathymidinsäure unter identischen Bedingungen eine bessere Bindung bei $(\text{all-}S_p)\text{-d}[(A_{PS})_{11}A]$ ($T_m = 34.4^\circ$) als bei $(\text{all-}R_p)\text{-d}[(A_{PS})_{11}A]$ ($T_m = 30.0^\circ\text{C}$) möglich ist^[59]. Dieser experimentelle Befund stimmt mit der Analyse von Modell-Duplexstrukturen mit B-Konformation überein, die andeuten, daß aus (R_p) -konfigurierten Oligo-S gebildete Duplexstrukturen aufgrund der Ausrichtung der Schwefelatome sterisch ungünstiger sind. Diese sind relativ zur Doppelhelixlängsachse „nach innen“ gerichtet, während (S_p) -konfigurierte Oligo-S nur „außen“ liegende Schwefelatome aufweisen. Der höhere sterische Anspruch von Phosphorothioaten im Vergleich zu Phosphaten wurde auch aus früheren Untersuchungen zur Synthese, aus Molekülmechanik-Rechnungen und aus den biologischen Eigenschaften von cyclischem Adenosin-3',5'-phosphorodithioat ersichtlich^[60]. Molekülmechanik- und Moleküldynamik-Rechnungen einer simulierten vollständigen DNA-Duplex-Helixwindung, die entweder aus unmodifizierten Oligonucleotiden, aus homochiralen $(\text{all-}R_p)$ - oder $(\text{all-}S_p)$ -Oligo-S^[61] gebildet wurde, bestätigten die Ergebnisse dieser intuitiven Analyse und experimenteller Daten. Hier von unabhängig weisen NMR-^[62] und T_m -Untersuchungen^[63] an Oligonucleotiden mit Phosphorodithioatfunktionen auf einen destabilisierenden Effekt der Schwefelatome in doppelsträngigen Konstrukten hin.

Leider ist die Synthese und Isolierung von genügend reinen, längeren (> 12 -mere) Oligo-S mit der Oxathiaphospholan-Methode immer noch schwierig. Wenn die Effizienz einzelner Kupplungsschritte geringer als 96 % ist, könnte dies die Ursache für das Auftreten von Fehlsequenzen ($n - 1$, $n - 2$, $n - 3$, ...) sein, besonders wenn der Abbruch der Reaktion nicht zu 100 % verläuft. Erst kürzlich wurde das ursprünglich zur Blockierung von nicht umgesetzten 5'-OH-Gruppen bei der Acylierung eingesetzte Essigsäureanhydrid/ N -Methylimidazol-Gemisch^[28] durch Essigsäureanhydrid/4-Dimethylaminopyridin ersetzt. Da der Wassergehalt von Lösungsmitteln und Reagentien sicherlich ein kritischer Faktor ist (Spuren von Wasser können in Gegenwart von DBU die Polymerisation von 1,3,2-Oxathiaphospholanen unter Ringöffnung initiieren), wurden besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen und absolut wasserfreie Reagentien eingesetzt. Zusätzlich wurde die Dauer eines Kupplungsschritts von 600 auf 200 Sekunden verkürzt. Obwohl die Bedingungen und Parameter der Oxathiaphospholan-Methode noch nicht optimiert sind, gelang Grajkowski et al. ausgehend von diastereomerenreinen Substraten **41** ($B^1 = \text{CytBz}$) die Synthese der $(\text{all-}R_p)$ - und $(\text{all-}S_p)$ -Diastereomere von $\text{d}[(C_{PS})_{27}C]$, die in 86 % bzw. 82 % Ausbeute entstehen (bestimmt durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE))^[58]. Im ^{31}P -NMR-Spektrum des Rohprodukts sind keine Signale von Phosphatverunreinigung zu beobachten; werden Oligo-S nach anderen Methoden hergestellt, so entstehen unvermeidbar Phosphate^[3c]. Darüber hinaus

synthetisierten Grajkowski et al., ausgehend von einem Diastereomergemisch von **41**, ein 26-mer mit „gemischter Sequenz“, das sechs dC, sechs dG, zehn dT und vier dA enthält. Dieses war nach PAGE mit dem nach der Phosphoramidit/Sulfurierungs-Methode hergestellten 26-mer identisch. Zur Zeit wird versucht, die Ausbeute der Reaktionsschritte zu verbessern und die Struktur von Produkten, die bei unerwarteten, noch nicht bekannten Nebenreaktionen entstehen, aufzuklären.

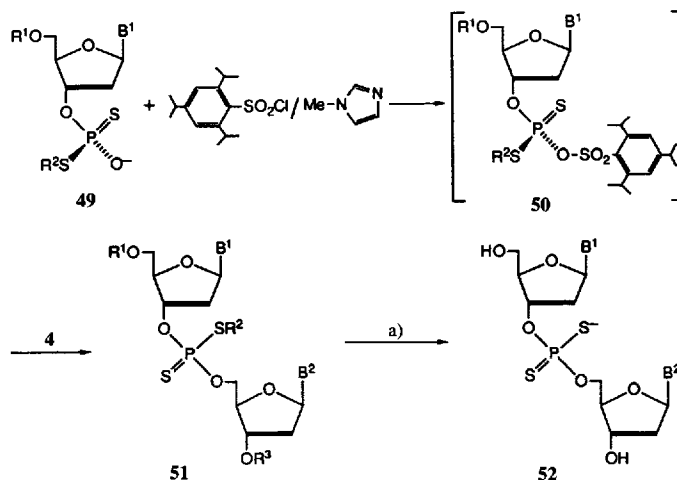
Welche Nebenreaktionen sind denkbar? Eine naheliegende Nebenreaktion ist die intermediäre Bildung einer Internucleotid-Phosphorothioatriester-Funktion mit geladener $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}^-$ -Gruppe wie in **42**. Obwohl man erwartet, daß diese Gruppe abgespalten wird, könnte das Schwefelzentrum auch am nächstliegenden 5'-O-Phosphor-gebundenen 5'-Kohlenstoffatom angreifen, so daß das Phosphorothioatkohlenstoffgerüst um eine $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -Einheit verlängert würde. Diese Reaktion müßte über einen thermodynamisch ungünstigen siebengliedrigen cyclischen Übergangszustand verlaufen. Bei einem solchen Angriff sollte die abschließende enzymatische Hydrolyse der Oligo-S modifizierte Nucleoside(-tide) ergeben, was jedoch nicht der Fall zu sein scheint. Dennoch muß diese Möglichkeit näher untersucht werden, da diese Reaktion Spuren von Verunreinigungen mit gleicher Basenzusammensetzung und gleicher negativer Ladung wie die erwarteten Produkte liefern würde. Ebenfalls untersucht man die mögliche 5'-O-Acetyl-Deblockierung durch DBU, die die Bildung unerwünschter ($n-1$)-, ($n-2$)- und ($n-3$)-Oligo-S bewirken könnte^[64].

Weiterhin wird versucht, Substrate wie **41** ohne amidische Protonen herzustellen, die eine DBU-Aktivierung und die Bildung möglicher Verzweigungsstellen für das wachsende Polymer verhindern sollen. Auch C-substituierte Oxathiaphospholane, die zwar noch mit 5'-OH-Funktionen umgesetzt werden können, deren Ringöffnung aber nicht unter anschließender Eliminierung des Episulfids verläuft, werden synthetisiert. Die Acylierung am Schwefelatom eines zu **42** analogen Intermediats würde zwar die Triestereinheit bis zum Schluß der gewünschten Kettenverlängerung erhalten, gleichzeitig sollte aber auch der unerwünschte Angriff am 5'-Kohlenstoffatom häufiger erfolgen^[64].

Erwähnenswert, obwohl es nicht direkt zum Aufsatzthema zählt, ist die erfolgreiche Synthese von Oligonucleosidphosphorothioaten **52** durch eine modifizierte Oxathiaphospholan-Methode unter Verwendung von 5'-O-DMT-nucleosid-3'-O-(2-thio-1,3,2-dithiaphospholanen)^[65].

4.6. Mögliche Methoden zur stereokontrollierten Synthese von Oligonucleosidphosphorothioaten

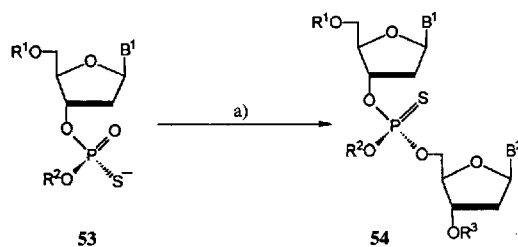
Da wir Phosphor- und Biopolymer-Chemiker auf das Problem der stereokontrollierten Synthese von Oligo-S und verwandten DNA- oder RNA-Analoga aufmerksam machen wollen, sollen nun noch nicht untersuchte Methoden zur stereokontrollierten Synthese von P-chiralen Oligonucleotid-Analoga diskutiert werden. Aktiviert man ein Diastereomergemisch von 5'-O-DMT-nucleosid-3'-O-[S-(2,4-dichlorbenzyl)phosphorodithioat] **49** mit 2,4,6-Triisopropylphenylsulfonylchlorid (TIPS-Cl) und *N*-Methylimidazol, so wird das Sauerstoffatom im Vergleich zum Schwefelatom der Phosphorodithioatgruppe zu 97% aktiviert



Schema 21. Die Aktivierung des Phosphorodithioats **49** durch TIPS-Cl/*N*-Methylimidazol findet zu 97% am Sauerstoffatom statt.

(Schema 21). Obwohl die Reaktion von **50** mit dem 5'-OH-Nucleosid **4** ein Diastereomergemisch von **51** ergibt, werden nach der Abspaltung der Schutzgruppen am Schwefelatom P-achirale Dinucleosid-3',5'-phosphorodithioate **52** erhalten^[66].

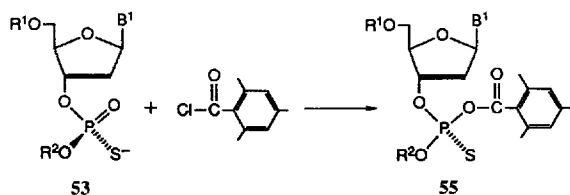
Die aufgrund früherer Arbeiten über die Aktivierung von ambidenten Phosphorothioat-Anionen unerwartete Chemoselektivität der TIPS-Cl/*N*-Methylimidazol-Aktivierung läßt hoffen, daß die Substrate **53** mit den Resten OR² wie OMe, OEt oder OBz nach der Diastereomerentrennung Phosphorothioat-Anionen am Sauerstoffzentrum selektiv aktivieren; die anschließende Reaktion mit einem OH-Nucleosid könnte zu diastereomerenreinen (oder stark angereicherten) Dinucleosid-3',5'-O-alkylphosphorothioaten **54** führen (Schema 22). Spaltet man die Schutzgruppen an der Phosphorothioateinheit ab (Angriff am Kohlenstoffatom), so sollten Oligo-S entstehen.



Schema 22. Die Phosphorothioate **53** sind mögliche Substrate für die stereokontrollierte Synthese von **1**. a) 1. TIPS-Cl/*N*-Methylimidazol; 2. **4**. R¹ = DMT; R² = Me, Et, Bz, Allyl; R³ = Ac; B¹ = B² = Thy.

Dieser Ansatz zur stereoselektiven Synthese von Oligo-S wird fehlschlagen, wenn Pyrophosphorothioat-Intermediate^[48] zur Bildung von Anhydriden aus Thiophosphorsäure und Sulfonsäure führen.

Ein anderer möglicher Syntheseweg ist die Acylierung eines entsprechend geschützten Nucleosid-3'-O-(O-alkyl)phosphorothioats **53** durch sterisch anspruchsvoll substituierte Benzoylchloride und die Folgereaktion des entstehenden gemischten Anhydrids **55** mit der 5'-OH-Funktion eines Nucleosids oder Oligonucleotids (Schema 23). Obwohl gemischte Anhydride aus Phosphor- und Carbonsäuren sowohl acetylierende als auch



Schema 23. Die Anhydride **55** sind potentielle Substrate der stereokontrollierten Synthese von **1**.

phosphorylierende Eigenschaften haben^[68], sind nur wenige gut untersuchte Beispiele für deren ausschließlich phosphorylierende Aktivität bekannt. Jackson et al.^[68e] zeigten, daß sich bei solchen Anhydriden die Regioselektivität in Abhängigkeit vom angreifenden Nucleophil ändert: Bei der Aminolyse erfolgt der Angriff am Carbonyl-Kohlenstoffatom, bei der Alkoholyse am Phosphoratom. Darüber hinaus bewies Lambie^[68e], daß *O*-Pentachlorbenzoyl-*O,O*-diethylphosphat selbst mit Anilin phosphorylierend wirkt. Diese ausgeprägte Fähigkeit zur Phosphorylierung veranlaßte Wozniak, P-diastereomerenreine Anhydride aus Nucleosid-3'-*O*-(methanthiophosphon)- und Carbonsäuren als mögliche Substrate für die stereokontrollierte Synthese von Oligonucleosidmethanthiophosphonate herzustellen. Bis jetzt haben Reaktionen der oben erwähnten gemischten Anhydride mit 3'-*O*-Träger-gebundenen 5'-OH-Nucleosiden nur mit schlechten, für eine repetitive Mehrstufensynthese nicht akzeptablen Ausbeuten zum gewünschten Produkt geführt. Zur Zeit wird nach einem geeigneten Katalysator für diese Reaktionen gesucht, und falls dies erfolgreich sein sollte, werden geeignete Substrate synthetisiert^[69].

5. Analyse der Diastereomerenreinheit von Oligonucleosidphosphorothioaten

Die Schwierigkeit, die Diastereomerenreinheit von Oligo-S zu analysieren, wurde bereits erwähnt. Abbildung 4 zeigt die zur Zeit

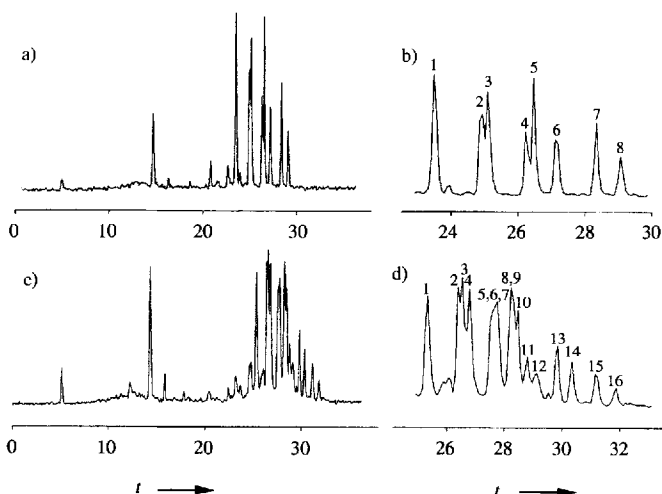


Abb. 4. RP-HPL-Chromatogramm des Tetramers $d(C_{ps}C_{ps}C_{ps}C)$: a) Gesamtchromatogramm, b) gespreizter Ausschnitt, der das Auftreten aller acht Diastereomere illustriert, c) und d) zeigen die teilweise Trennung der 16 Diastereomere des Pentamers $d(C_{ps}C_{ps}C_{ps}C_{ps}C)$. Aufnahmebedingungen siehe Tabelle 1. Retentionszeit t in min.

besten Ergebnisse für eine RP-HPLC-Trennung von acht Diastereomeren von $d[(C_{ps})_3C]$ (Abb. 4 a, b) und ein HPL-Chromatogramm von $d[(C_{ps})_4C]$ (Abb. 4 c, d); beide Produkte wurden nach der nichtstereoselektiven Phosphoramidit-Methode erhalten. Abbildung 4b zeigt deutlich die Grenzen der RP-HPLC-Analyse kurzer Oligo-S^[18]. Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe belegten, daß Oligo-S mit ausschließlich (R_p)-konfigurierten Phosphorothioateinheiten enzymatisch mit Endonuclease P1 abgebaut werden können. Diese „Strukturanalysemethode“ kann auch als „Reinigungsprozeß“ dienen, da unter geeigneten Bedingungen sämtliche (S_p)-konfigurierten Phosphorothioate gespalten werden^[22k]. Darüber hinaus ergaben als Diastereomengemisch hergestellte $d[(C_{ps})_nC]$ ($n = 1 - 4$), nach Nuclease P1- und anschließend basischen Phosphatase-Abbau ein Produktgemisch, das mit RP-HPLC in reine (R_p)- $d(C_{ps}C)$ -, (R_p, R_p)- $d(C_{ps}C_{ps}C)$ -, (R_p, R_p, R_p)- $d(C_{ps}C_{ps}C_{ps}C)$ - und (R_p, R_p, R_p, R_p)- $d[(C_{ps})_4C]$ -Fraktionen getrennt werden konnte. Eine gleiche Behandlung der erwähnten Oligo-S-Diastereomengemische mit als (R_p)-diastereoselektiv geltender Schlangengift-Phosphodiesterase (SVPDE)^[22i, j] ergab nur einen Verdau des 3'-terminalen (R_p)-Internucleotid-Phosphorothioats, da dieses Enzym keine endonucleolytische Wirkung aufweist^[70].

Unter nichtdenaturierenden Bedingungen unterschied sich die Mobilität von (all- R_p) und von (all- S_p)- $d[(C_{ps})_9C]$ bei der Elektrophorese deutlich (Abb. 5). Diese Beobachtung könnte

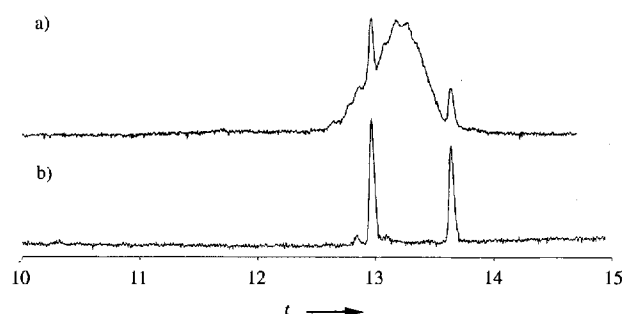


Abb. 5. Die Hochleistungs-Kapillarelektrophorese wurde mit einem Applied Biosystems 270A-HT-Kapillarelektrophorese-Gerät mit MICRO-GEL100 (Applied Biosystems, Foster City, CA) gelgefüllten Kapillaren (50 μ m ID, effektive Länge 27 cm; mobile Puffer: 75 mM TRIS-Phosphat, pH 7.6, 10% Methanol) durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 260 nm bei einer Spannung von 15 kV. Zwei einzelne Diastereomere (all- R_p) bzw. (all- S_p)- $d[(C_{ps})_9C]$ wurden gemischt (b) und mit einer nach der Phosphoramidit/Sulfurierungs-Methode hergestellten Probe von $d[(C_{ps})_9C]$ (512 Diastereomere) unter Beimischung der beiden Diastereomere verglichen (a). Retentionszeit t in min.

eventuell auf eine unterschiedliche Selbstorganisation (z.B. durch Stapelung der Basen) oder auf bei P-homochiralen Oligo-S auftretenden Wechselwirkungen mit dem Gel hinweisen, die als ein indirektes Beispiel für den Einfluß der Chiralität auf die Oligo-S-Mobilität angesehen werden können. Wichtige Faktoren wie die Zellmembran-Permeabilität sind dadurch vielleicht ebenfalls beeinflusst.

6. Schlußfolgerungen

Abgesehen von der biologischen Bedeutung von Oligo-S mit einer definierten Chiralität ist noch immer eine Frage offen: Wie weit sind wir noch von einer stereokontrollierten Synthese von

Oligo-S entfernt? Für die Oligopeptid-Synthese erforderte es fast ein ganzes Jahrhundert zur Lösung des Problems, wenn auch ständig neue enzymatische Methoden entwickelt werden^[71], um die Racemisierung auszuschließen. Schon früher wurde darauf hingewiesen, daß bei jeder mehrstufigen Synthese die Diastereomerenreinheit dp eines n -mers ungefähr p^{n-1} ist, so daß für ein 28-mer, das mit $p = 0.98$ hergestellt wurde, $dp = 0.98^{27} = 0.56$ ist. Ist damit eine diastereoselektive Synthese von chiralen Oligo-S überhaupt möglich? Eckstein et al.^[7] konnten zeigen, daß die Synthese von **1** aus α -dNTPS mit Hilfe von Polymerase zu (all- R_p)-Polynucleosidphosphorothioaten führt. Diese enzymatische Herstellungsmethode von Oligo-S wäre jedoch auf die Synthese von (all- R_p)-Oligo-S beschränkt. In dieser Übersicht wurde schon berichtet, daß chemisch synthetisierte (all- R_p)-konfigurierte Oligo-S durch Nuclease-P1-Verdau der verunreinigenden (S_p)-Phosphorothioate stereochemisch gereinigt werden können. Die nächsten Jahre werden vielleicht die Entdeckung oder die durch rec-DNA gentechnologische Herstellung einer wirksamen (R_p)-diastereoselektiven Endonuclease bringen. Eine solche Endonuclease wäre nicht nur für analytische Zwecke nützlich, sondern auch für die Abtrennung von mit (R_p)-Phosphorothioat-Diastereomeren verunreinigten (all- S_p)-Oligo-S wertvoll. Trotzdem wird die Fähigkeit einer solchen hypothetischen Endonuclease zum stereochemischen Abbau kein Syntheseweg für (all- S_p)-konfigurierte Oligo-S sein, da der Anteil dieser Fraktion mit gewünschter Homochiralität im Diastereomergemisch ungefähr 2^{-n} beträgt. Man sollte auch versuchen, Bedingungen auszuarbeiten, unter denen eine stereoselektive Endonuclease reversibel arbeitet. Es ist vorstellbar, daß eine Matrix-gesteuerte Oligo-S-Synthese mit Phosphorothioattransferasen möglich wird, falls sich die Untersuchungen zum Beispiel auf die Reversibilität der Wirkung von Nucleasen und Phosphotransferasen konzentrieren.

Andernfalls sollten Chemiker ihre Kunst beweisen und Substrate konstruieren, die eine Oligo-S-Synthese mit einer Diastereoselektivität $>99\%$ und einer vorbestimmten Chiralität an jeder Internucleotid-Phosphorothioatfunktion ermöglichen. Auf diesem Gebiet sind leider nur wenig Fortschritte erzielt worden, da zehn Jahre nach der ersten stereokontrollierten Synthese beider Diastereomere von Dithymin-3',5'-phosphorothioat^[72] nur die Stufe von Dodecameren erreicht werden konnte^[28]. Zweifellos wird wirtschaftliches Interesse die Lösung dieser Herausforderung vorantreiben. Die stereokontrollierte Synthese von **1** wird sicherlich möglich, falls Oligo-S, oder für die Erkennung von geeigneten Zielsequenzen in mRNA oder prä-mRNA verantwortliche synthetische Ribozym-Konstrukte mit Nuclease-resistenten Komponenten **1**, weiterhin als nützliche Oligonucleotid-Therapeutica eingeschätzt werden. Falls dies nicht der Fall sein sollte, bleibt immer noch die intellektuelle Neugier, die immer ein wesentlicher Faktor in der reinen Grundlagenforschung war. Zielgerichtete Projekte sind nicht immer erfolgreich, falls sie nicht durch die intellektuelle Herausforderung unterstützt werden.

Diese Übersicht wurde während des einjährigen Aufenthalts von W. J. S. als Fogarty Scholar-in-Residence am National Institute of Health (NIH) in Bethesda, MD, USA, fertiggestellt. Wir möchten den Kollegen und Mitarbeitern danken, die die Entwicklung der ersten stereokontrollierten Synthesemethoden von Oligo-S

vorantrieben (ihre Namen sind in den entsprechenden Zitaten genannt). Unsere Forschung wurde vom State Committee for Scientific Research (0034/PZ/92/03) unterstützt. Wir danken Dr. Gerald Zon von Lynx Therapeutics, Foster City, CA (USA), und Dr. Jack Schmidt, Fogarty International Center, für die kritische Durchsicht mehrerer Versionen dieser Übersicht, Frau Malgorzata Stec für die Hilfe bei der Erstellung dieses Manuskripts und auch einem unbekannten Gutachter für dessen Vorschlag einer weiteren Nebenreaktion, die den Oxathiaphospholan-Ringöffnungsprozeß begleiten könnte.

Eingegangen am 12. Februar 1993 [A 935]
Übersetzt von Dr. Stefan Freund, Cambridge

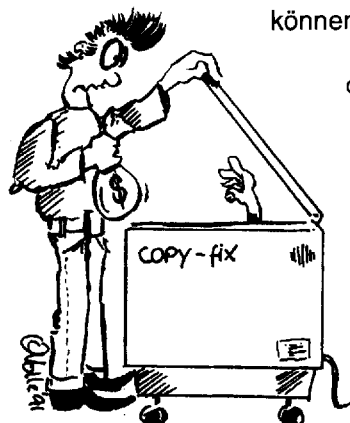
- [1] a) M. Matsukura, K. Shinozuka, G. Zon, H. Mitsuya, M. Reitz, J. S. Cohen, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7706; b) M. Matsukura, G. Zon, K. Shinozuka, M. Robert-Guroff, T. Shimada, C. A. Stein, H. Mitsuya, F. Wong-Staal, J. S. Cohen, S. Broder, *ibid.* **1989**, *86*, 4244; c) S. Agrawal, J. Goodchild, M. P. Civeira, A. H. Thornton, P. S. Sarin, P. C. Zamecnik, *ibid.* **1988**, *85*, 7079; d) S. Agrawal, T. Ikeuchi, D. Sun, P. S. Sarin, A. Konopka, J. Maizel, P. C. Zamecnik, *ibid.* **1989**, *86*, 7790.
- [2] a) G. Zon, W. J. Stec in *Oligonucleotides and Their Analogues: A Practical Approach* (Hrsg.: F. Eckstein), IRL, Oxford, **1991**, S. 87; b) G. Zon, T. G. Geiser, *Anti Cancer Drug Des.* **1991**, *6*, 539; c) T. Geiser, *Aids: Anti-HIV Agents, Therapies and Vaccines* (Ann. N.Y. Acad. Sci. N. Y. **1990**, *616*, 173).
- [3] a) J. W. Efcavitch in *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids* (Hrsg.: D. Rickwood, B. D. Hannes), IRL, Oxford, **1990**, S. 125; b) V. Meteleev, S. Agrawal, *Anal. Biochem.* **1992**, *200*, 342; c) B. J. Bergot, W. Egan, *J. Chromatogr.* **1992**, *599*, 35; d) G. Zon in *High-Performance Liquid Chromatography in Biotechnology* (Hrsg.: W. S. Hancock), Wiley, New York, **1990**, S. 310; e) J. Tang, A. M. Roskey, S. Agrawal, *Anal. Biochem.* **1993**, *212*, 134.
- [4] a) C. A. Stein, K. Mori, S. L. Loke, K. Subasinghe, J. S. Cohen, L. M. Neckers, *Gene* **1988**, *72*, 333; b) S. L. Loke, C. A. Stein, X. H. Zhang, K. Mori, M. Nakanishi, C. Subasinghe, J. S. Cohen, L. M. Neckers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 3474; c) P. L. Iversen, *Anti Cancer Drug Des.* **1991**, *6*, 531; d) P. L. Iversen, S. Zhu, A. Meyr, G. Zon, *Antisense Res. Dev.* **1992**, *2*, 211; e) P. L. Iversen, D. Crouse, G. Zon, G. Perry, *ibid.* **1992**, *2*, 223; f) G. Marti, W. Egan, P. Noguchi, G. Zon, M. Matsukura, S. Broder, *ibid.* **1992**, *2*, 27; g) S. Agrawal, J. Temsamani, J. Y. Tang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7595; h) D. J. Chin, G. A. Green, G. Zon, F. C. Szoka, R. M. Straubinger, *New Biol.* **1990**, *2*, 1091; i) W.-I. Gao, C. Storm, W. Egan, Y.-C. Cheng, *Mol. Pharmacol.* **1993**, *43*, 45; j) P. T. C. HO, T. A. Bacon, E. Wickstrom, A. C. Sartorelli, *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 329; k) J. M. Campbell, T. A. Bacon, E. Wickstrom, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1990**, *20*, 259; l) Q. Zhao, S. Matson, C. J. Herrera, E. Fisher, H. Yu, A. M. Krieg, *Antisense Res. Dev.* **1993**, *3*, 53; m) C. A. Stein, A. M. Cleary, L. Yakubov, S. Lederman, *ibid.* **1993**, *3*, 19.
- [5] a) C. Cazenave, C. A. Stein, N. Loreau, N. T. Thuong, L. M. Neckers, C. Subasinghe, C. Helene, J. S. Cohen, J. J. Toulme, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 4255; b) P. J. Furdon, A. Dominski, R. Kole, *ibid.* **1989**, *17*, 9193; c) W.-Y. Gao, F. Han, C. Storm, W. Egan, Y.-C. Cheng, *Mol. Pharmacol.* **1991**, *41*, 223; d) M. Chiang, H. Chan, M. A. Zounes, S. M. Freier, W. F. Lima, C. F. Bennett, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 18162; e) T. M. Woolf, D. A. Melton, C. B. Jennings, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7305; f) C. A. Stein, J. L. Tonkinson, L. Yakubov, *Pharmacol. Ther.* **1991**, *52*, 365; g) M. K. Ghosh, K. Ghosh, J. S. Cohen, *Antisense Res. Dev.* **1992**, *2*, 111.
- [6] a) M. Z. Ratajczak, J. A. Kant, S. M. Luger, N. Hijiya, J. Zhang, G. Zon, A. M. Gewirtz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 11823; b) M. Simons, E. R. Edelman, J. DeKeyser, R. Langer, R. D. Rosenberg, *Nature* **1992**, *352*, 67; c) K. D. Kumble, P. L. Iversen, J. K. Vishwanatha, *J. Cell Sci.* **1992**, *101*, 35; d) M. Simons, R. D. Rosenberg, *Circ. Res.* **1992**, *70*, 835; e) G. Citro, D. Perrotti, C. Cucco, I. D'Agnano, A. Sacchi, G. Zupi, B. Calabretta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7031; f) K. H. Schlingensiepen, W. Brysch in *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Hrsg.: R. P. Erickson, J. G. Izant), Raven, New York, **1992**, S. 317; g) Y. Shi, J. M. Glynn, L. J. Guilbert, T. G. Cotter, R. P. Bismonette, D. R. Green, *Science* **1992**, *257*, 212; h) P. H. Watson, R. T. Pon, R. P. Shiu, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 3996; i) L. Whitesell, D. Geselowitz, C. Chavany, B. Fahmy, S. Walbridge, J. R. Alger, L. M. Neckers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4665; j) J. Lisiewicz, D. Sun, M. Klotman, S. Agrawal, P. Zamecnik, R. Gallo, *ibid.* **1992**, *89*, 11209; k) S. Agrawal, J. Y. Tang, *Antisense Res. Dev.* **1992**, *2*, 261; l) I. Katajima, T. Shinohara, T. Minor, L. Bibbs, J. Bilakovics, M. Nerenberg, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 25881; m) M. Hikida, K.-i. Haruma, H. Ohmori, *Immunol. Lett.* **1992**, *34*, 297; n) M. Ebbecke, C. Unterberg, A. Buchwald, S. Stohr, H. Wiegand, *Basic Res. Cardiol.* **1992**, *87*, 585; o) B. J. Chiasson, M. L. Hooper, P. R. Murphy, H. A. Robertson, *Eur. J. Pharmacol.* **1992**, *227*, 451; p) B. C. Paria, S. K. Dey, G. K. Andrews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10051; q) T. Lallier, M. Bronner-Freser, *Science* **1993**, *259*, 692; r) A. Colige, B. P. Sokolov, P. Nugent, R. Baserga, D. J. Prockop, *Biochemistry* **1993**, *32*, 8; s) L. M. Cowser, M. C. Fox,

- G. Zon, C. K. Mirabelli, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 171; t) H. Yokozaki, A. Budillon, G. Tomtora, S. Meissner, S. L. Beaucage, K. Miki, Y. S. Cho-Chung, *Cancer Res.* **1993**, 53, 868; u) J. M. E. Leitler, S. Agrawal, P. Palese, P. C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 3430; v) J. W. Jaroszewski, O. Kaplan, J.-L. Syi, M. Sehested, P. L. Faustino, J. S. Cohen, *Cancer Commun.* **1990**, 2, 287; w) E. Rapaport, K. Misiura, S. Agrawal, P. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 8577; x) J. C. Reed, C. A. Stein, C. Subasinghe, S. Haldar, C. M. Croce, S. Yum, J. S. Cohen, *Cancer Res.* **1990**, 50, 6565; y) J. Lisiewicz, D. Sun, V. Metelev, P. Zamecnik, R. C. Gallo, S. Agrawal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 3860; z) E. Bayever, M. R. Boshop, G. Zon, J. Spinolo, A. Kessinger, *Proc. Am. Cancer Res.* **1993**, 34, 593; A. Gewirtz, *ibid.* **1993**, 34, 595.
- [7] a) F. Eckstein, H. Gindl, *Eur. J. Biochem.* **1970**, 13, 558; b) F. Eckstein, W. Armstrong, H. Sternbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, 73, 2987; c) T. A. Kunkel, F. Eckstein, A. S. Mildvan, R. M. Koplit, L. Loeb, *ibid.* **1981**, 78, 6734; d) L. J. P. Patimer, K. Hampel, J. S. Lee, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 1549.
- [8] a) W. J. Stec, G. Zon, W. Egan, B. Stec, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 6077; b) W. J. Stec, G. Zon, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5275; c) *ibid.* **1984**, 25, 5279; d) W. J. Stec, G. Zon, B. Uznanski, *J. Chromatogr.* **1985**, 326, 263.
- [9] a) G. Zon, *Pharm. Res.* **1988**, 5, 539; b) C. A. Stein, J. S. Cohen, *Cancer Res.* **1988**, 48, 2659; c) J. S. Cohen in *Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression* (Hrsg.: J. S. Cohen), Macmillan, London, **1989**, S. 12; d) E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 544; e) U. Englisch, D. H. Gauss, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 629; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 613; f) M. Ghosh, J. S. Cohen, *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **1992**, 42, 79; g) S. Agrawal, *Trends Biotechnol.* **1992**, 10, 152.
- [10] a) T. R. Cech, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, 2, 605; b) S. M. Edgington, *Biotechnology* **1992**, 10, 256; c) N. Sarver, *Antisense Res. Dev.* **1991**, 1, 373; d) J. Goodchild, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 4607; e) K. Taira, S. Nishikawa, in *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Hrsg.: R. P. Erickson, J. G. Izant), Raven, New York, **1992**, S. 35.
- [11] a) W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, **1984**; b) N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 697; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 666.
- [12] a) S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859; b) M. H. Caruthers, *Science* **1985**, 230, 281; c) S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, 48, 2233.
- [13] a) M. Vaman Rao, C. B. Reese, Z. Zhengyun, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 4839; b) R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Ryan, S. L. Beaucage, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1253; c) R. P. Iyer, L. R. Phillips, E. Egan, J. B. Regan, S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4693; d) H. Vu, B. L. Hirschbein, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3005; e) H. C. P. F. Roelen, P. C. J. Kamer, H. van den Elst, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1991**, 110, 325; f) P. C. J. Kamer, H. C. P. F. Roelen, H. van den Elst, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 6757; g) W. J. Stec, B. Uznanski, A. Wilk, B. L. Hirschbein, K. L. Fearon, B. J. Bergot, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 5317.
- [14] a) B. C. Froehler, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5575; b) B. C. Froehler, M. D. Matteucci, *ibid.* **1986**, 27, 469.
- [15] a) L. Horner, *Pure Appl. Chem.* **1964**, 225; b) W. C. McEwen in *Topics in Phosphorus Chemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: M. Grays, E. J. Griffith), Interscience, New York, **1965**, S. 25; c) W. Benrude, L. H. Hargis, P. E. Rusek, *J. Chem. Soc. D* **1969**, 296; d) M. Mikolajczyk, J. Luczak, *Tetrahedron* **1972**, 28, 5411; e) W. J. Stec, A. Okruszek, J. Michalski, *Angew. Chem.* **1971**, 83, 491; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1971**, 10, 494; f) W. J. Stec, A. Okruszek, M. Mikolajczyk, *Z. Naturforsch. B* **1971**, 26, 855; g) L. J. Szafraniec, L. L. Szafraniec, H. S. Aaron, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 1936.
- [16] P. M. J. Burgers, F. Eckstein, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 3835.
- [17] J. F. Marlier, S. J. Benkovic, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 1121.
- [18] A. Wilk, W. J. Stec, unveröffentlicht.
- [19] F. Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 376.
- [20] F. R. Bryant, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1979**, 18, 2825.
- [21] P. A. Frey in *New Comprehensive Biochemistry* (Hrsg.: A. Neuberger, L. L. van Deenen), Elsevier, Amsterdam, **1982**, S. 204.
- [22] a) P. M. J. Burgers, F. Eckstein, *Biochemistry* **1979**, 18, 450; b) B. A. Connolly, B. V. L. Potter, F. Eckstein, A. Pingoud, L. Grotjahn, *ibid.* **1984**, 23, 3443; c) G. Slim, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 1183; d) P. M. J. Burgers, F. Eckstein, D. H. Hunneman, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 7476; e) B. V. L. Potter, B. A. Connolly, F. Eckstein, *Biochemistry* **1983**, 22, 1369; f) M. Koziolkiewicz, W. J. Stec, *ibid.* **1992**, 31, 9460; g) D. R. Lesser, A. Grajkowski, M. R. Kurpiewski, M. Koziolkiewicz, W. J. Stec, L. Jen-Jacobson, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 24510; h) A. Gupta, C. DeBrosse, S. J. Benkovic, *ibid.* **1982**, 257, 7689; i) P. M. J. Burgers, F. Eckstein, D. H. Hunneman, *ibid.* **1979**, 254, 7476; j) B. V. L. Potter, B. A. Connolly, F. Eckstein, *Biochemistry* **1983**, 22, 1369; k) A. D. Griffiths, B. V. L. Potter, I. C. Eperon, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 4145; l) A. P. Gupta, P. A. Benkovic, S. J. Benkovic, *ibid.* **1984**, 12, 5897.
- [23] Z. Otwinowski, R. W. Schervitz, R. G. Zhang, C. L. Lawson, A. Joachimiak, R. Q. Marmorstein, B. F. Luisi, P. B. Sigler, *Nature* **1988**, 335, 321.
- [24] L. A. Yakubov, E. A. Deeva, V. F. Zarytova, E. M. Ivanova, A. S. Ryte, L. V. Yurchenko, V. V. Vlassov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 6454.
- [25] G. Zon, M. F. Summers, K. A. Gallo, K.-L. Shao, M. Koziolkiewicz, B. Uznanski, W. J. Stec in *Biophosphates and Their Analogues – Synthesis, Structure, Metabolism and Activity* (Hrsg.: K. S. Bruzik, W. J. Stec), Elsevier, Amsterdam, **1987**, S. 165.
- [26] a) FDA's Policy Statement for Development of New Stereoisomeric Drugs, Food and Drug Administration: Rockville, MD, May **1992**; b) I. Amato, *Science* **1992**, 256, 964; c) J. Hodgson, *Biotechnology* **1992**, 10, 1093; d) A. G. Petsko, *Science* **1992**, 256, 1403; e) S. C. Stinson, *Chem. Eng. News* **1992**, 71, 46; f) W. A. Nugent, T. V. RajanBabu, M. J. Burk, *Science* **1993**, 259, 479; g) U. Hacksell, S. Ahlenius, *Trends Biotechnol.* **1993**, 11, 73.
- [27] J. A. Gerlt, J. A. Coderre, S. Mehdi, *Adv. Enzymol.* **1983**, 55, 279.
- [28] a) W. J. Stec, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1991**, 23, 171; b) W. J. Stec, A. Grajkowski, M. Koziolkiewicz, B. Uznanski, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 5883.
- [29] D. Valentine in *Asymmetric Synthesis 1983–1984* **1985**, 4, 263.
- [30] a) S. Berner, K. Muhlegger, H. Seliger, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 853; b) H. Dahl, J. Nielsen, O. Dahl, *ibid.* **1987**, 15, 1729; c) Y. Watanabe, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1992**, 1879.
- [31] A. V. Lebedev, J. P. Rife, H. W. Seligsohn, G. R. Wensinger, E. Wickstrom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 855.
- [32] a) T. Tanaka, S. Tamatsukuri, M. Ikehara, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 199; b) J. Helinski, W. Dabkowski, J. Michalski, *ibid.* **1991**, 32, 4981.
- [33] B. Uznanski, A. Wilk, W. J. Stec, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3401.
- [34] B. Uznanski, A. Wilk, W. J. Stec, unveröffentlicht.
- [35] a) P. J. Garegg, T. Regberg, J. Stawinski, E. Stromberg, *Chem. Scr.* **1985**, 25, 280; b) P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stromberg, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4051; c) A. Andrus, J. W. Efcavitch, L. McBride, B. Gusti, *ibid.* **1988**, 29, 861.
- [36] a) B. C. Froehler, P. G. Ng, M. D. Matteucci, *Nucleic Acids Res.* **1986**, 14, 160; b) C. A. Stein, C. Subasinghe, K. Shinokura, J. S. Cohen, *ibid.* **1988**, 16, 3209.
- [37] a) F. Seela, U. Kretschmer, *Nucleosides Nucleotides* **1991**, 10, 711; b) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1154; c) *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 3861.
- [38] a) J. Stawinski, R. Stromberg, R. Zain, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 3185; b) H. Almer, J. Stawinski, R. Stromberg, M. Thelin, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6163.
- [39] a) W. B. Farnham, R. K. Murray, K. Mislou, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5809; b) J. Donohue, N. Mandel, W. B. Farnham, M. H. Murray, K. Mislou, H. P. Benschop, *ibid.* **1971**, 93, 3792.
- [40] a) L. P. Reiff, H. S. Aaron, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5275; b) L. J. Szafraniec, L. P. Reiff, H. S. Aaron, *ibid.* **1970**, 92, 6391.
- [41] a) M. Fujii, K. Ozaki, A. Kume, M. Sekine, T. Hata, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 26, 935; b) M. Fujii, K. Ozaki, M. Sekine, T. Hata, *Tetrahedron* **1987**, 43, 3395.
- [42] a) C. Battistini, M. G. Brasca, S. Fustinoni, *Nucleosides Nucleotides* **1991**, 10, 723; b) C. Battistini, M. G. Brasca, S. Fustinoni, E. Lazzari, *Tetrahedron* **1992**, 48, 3209.
- [43] H. Oediger, F. Moller, K. Eiter, *Synthesis* **1972**, 591.
- [44] Der Einfluß von DBU auf die Konfigurationsstabilität von P-chiralen Organophosphaten bedarf weiterer Untersuchungen. Unveröffentlichte Ergebnisse aus unserem Arbeitskreis (Z. J. Lesnikowski, L. Wozniak) zeigen, daß Diastereomere von Dinucleosid-3',5'-methanphosphonaten in Gegenwart von DBU unter den Bedingungen, die bei diastereomerenreinen Nucleosid-3'-O-[O-(4-nitrophenyl)methanphosphonaten] oder Nucleosid-3'-O-[Se-(4-nitrophenyl)methanphosphonaten] zu vollständiger P-Epimerisierung führen, nicht epimerisieren. Deshalb können diese Ergebnisse als durch Spuren von Wasser verursachte DBU-katalysierte Hydrolyse erklärt werden. Freigesetzte P-Nitrophenoxid- bzw. Methylselenyl-Ionen können in Gegenwart von DBU möglicherweise die Stammverbindungen über einen Ping-Pong-Mechanismus epimerisieren.
- [45] a) C. B. Reese, *Tetrahedron* **1978**, 34, 3143; b) M. Ikehara, E. Ohtsuka, A. F. Markham, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1978**, 36, 135; c) R. Wu, C. Bahl, S. A. Narang, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1978**, 21, 101; d) K. Itakura, A. D. Riggs, *Science* **1980**, 209, 1401; e) S. A. Narang, *Tetrahedron* **1983**, 39, 3; f) B. S. Sproat, M. J. Gait in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (Hrsg.: M. J. Gait), IRL, Oxford, **1984**; g) J. E. Marugg, C. Van Den Bergh, J. Tromp, G. G. Van Der Marel, J. Van Zoest, J. H. Van Boom, *Nucleic Acids Res.* **1984**, 12, 9095.
- [46] E. Ohtsuka, M. Shiraishi, M. Ikehara, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 41, 5271.
- [47] R. Cosstick, D. M. Williams, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 9921.
- [48] a) D. G. Knorre, A. V. Lebedev, A. V. Zarytova, *Nucleic Acids Res.* **1976**, 3, 1401; b) D. G. Knorre, V. F. Zarytova in *Phosphorus Chemistry Directed Towards Biology* (Hrsg.: W. J. Stec), Pergamon, Oxford, **1979**, S. 13; c) E. H. Ivanova, L. M. Khalimskaya, V. P. Romanienko, V. F. Zarytova, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 5447; d) V. F. Zarytova, D. G. Knorre, *Nucleic Acids Res.* **1984**, 12, 2091.
- [49] W. Niewiarowski, Z. J. Lesnikowski, A. Wilk, P. Guga, A. Okruszek, B. Uznanski, W. J. Stec, *Acta Biochim. Pol.* **1987**, 34, 217.
- [50] a) Z. J. Lesnikowski, A. Sibinska, *Tetrahedron* **1986**, 42, 5025; b) Z. J. Lesnikowski, M. Jaworska, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3821; c) Z. J. Lesnikowski, *Nucleosides Nucleotides* **1992**, 11, 1621.
- [51] a) Y. Hayakawa, M. Uchiyama, R. A. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 4003; b) M. Uchiyama, Y. Aso, R. Noyori, Y. Hayakawa, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 373.
- [52] M. Jaworska-Maslanka, Ph. D. Thesis, University of Lodz, **1992**.

- [53] a) P. Guga, W. J. Stec, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 3899; b) A. Okruszek, P. Guga, W. J. Stec, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 1225; c) A. Okruszek, P. Guga, W. J. Stec in *Biophosphates and Their Analogues – Synthesis, Structure, Metabolism and Activity* (Hrsg.: K. S. Bruzik, W. J. Stec), Elsevier, Amsterdam, **1987**, 247; d) A. Okruszek, P. Guga, W. J. Stec, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 5957; e) *Heteroat. Chem.* **1991**, 2, 561.
- [54] B. Uznanski, A. Grajkowski, B. Krzyzanowska, A. Kazmierkowska, W. J. Stec, M. W. Wieczorek, J. Blaszczyk, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10197.
- [55] F. H. Westheimer in *Rearrangements in Ground & Excited States* (Hrsg.: P. de Mayo), Academic Press, New York, **1980**, 229.
- [56] a) K.-P. Stengele, W. Pfeleiderer, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1989**, 21, 101; b) *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2549; c) T. Brown, C. E. Pritchard, G. Turner, S. A. Salisbury, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 891; d) C. Lehman, Y.-Z. Xu, C. Christoloulos, Z. K. Tan, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 2379.
- [57] A. Suska, A. Grajkowski, A. Wilk, B. Uznanski, J. Blaszczyk, M. Wieczorek, W. J. Stec, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 707.
- [58] A. Grajkowski, A. Wilk, M. Koziolkiewicz, W. J. Stec, unveröffentlicht.
- [59] Der in [57] angegebene T_m -Wert für die (all- R_P)-d[(A $_{PS}$) $_{11}$ A]/T $_{12}$ -Heteroduplexstruktur war falsch bestimmt worden. Sämtliche Messungen wurden mit diastereomeren Dodecaadenosinphosphorothioaten mit einer durch Kapillarelektrophorese bestimmten Größen-Homogenität > 99% wiederholt. Die Diastereomerenreinheit des (all- R_P)-Diastereomers wurde durch Nuclease-P1-Verdau überprüft. Das durch RP-HPLC wiedergewonnene Material wurde durch Fällung in das Natriumsalz überführt. Die Messungen wurden in HEPES-Puffer (pH 5.4, 100 mM HEPES, 20 mM MgCl $_2$, 200 mM NaCl) in einer UV-Zelle mit direkter Temperaturkontrolle durchgeführt. Folgende Ergebnisse wurden erhalten: dA $_{12}$ /dT $_{12}$ 37.4 °C; d[(A $_{PS}$) $_{11}$ A] (Diastereomergemisch, ca. 58% (R_P -Konfiguration)/dT $_{12}$ 31.6 °C; (all- R_P)-d[(A $_{PS}$) $_{11}$ A]/dT $_{12}$ 30.0 °C; (all- S_P)-d[(A $_{PS}$) $_{11}$ A]/dT $_{12}$ 34.4 °C.
- [60] L. H. Parker-Botelho, L. C. Webster, J. D. Rothemel, J. Baraniak, W. J. Stec, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 5301.
- [61] J. W. Jaroszewski, J.-J. Syi, J. Maizel, J. S. Cohen, *Anti-Cancer Drug Des.* **1992**, 7, 253.
- [62] M. E. Piotto, J. N. Granger, Y. Cho, N. Farshtschi, D. G. Gorenstein, *Tetrahedron* **1991**, 47, 2449.
- [63] a) M. H. Caruthers, G. Beaton, L. Cummins, *Nucleosides Nucleotides* **1991**, 10, 47; b) K. Bjergarde, B. H. Dahl, O. Dahl, *ibid.* **1991**, 10, 461; c) K. Bjergarde, O. Dahl, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 5843.
- [64] B. Karwowski, A. Kobylanska, A. Sierzchala, A. Okruszek, W. J. Stec, unveröffentlicht.
- [65] A. Okruszek, A. Sierzchala, M. Sochacki, W. J. Stec, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 7585.
- [66] E. K. Yan, Y.-X. Ma, M. A. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 1953.
- [67] W. Dabkowski, A. Lopusinski, J. Michalski, C. Radziejewski, *Phosphorus Sulfur Relat. Elem.* **1980**, 8, 375.
- [68] a) G. H. Smith, C. N. Cauhlan, F. Ramirez, S. Glaser, P. Stern, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 2698, zit. Lit.; b) R. Ramage in *Organophosphorus Reagents in Organic Synthesis* (Hrsg.: J. I. G. Cadogan), Academic Press, **1979**, S. 511; c) A. G. Jackson, G. W. Kenner, G. A. Moore, R. Ramage, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 3627; d) P. C. Crofts, *Org. Phosphorus Comp. 1972–1976* **1973**, 6, 51; e) A. J. Lambie, *Tetrahedron Lett.* **1966**, 3709; f) N. E. Jacobsen, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 1613, g) *ibid.* **1983**, 105, 1619.
- [69] L. Wozniak, W. J. Stec, unveröffentlicht.
- [70] G. M. Richards, G. du Vair, M. Laskowski, Sr., *Biochemistry* **1965**, 4, 501.
- [71] W. Kullmann, *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC, Boca Raton, FL, **1987**.
- [72] B. Uznanski, W. Niewiarowski, W. J. Stec, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 4289.

Nur Kopieren ist teurer...

... und zudem mühsamer! Diplomanden und Doktoranden können als studentische Mitglieder der GDCh die "Angewandte" für ca. Fünfundachtzig (DM 5.80!!) pro Heft druckfrisch frei Haus erhalten. Das sind weniger als sechs Pfennige pro Seite!



Interessiert?

Dann rufen Sie doch einfach bei Beate Geiß an (Tel. 06201/606-199) oder schicken Sie ihr ein Fax (06201/606-184). Aber natürlich können Sie ihr auch schreiben:



VCH-Leserservice, Postfach 10 11 61, 69451 Weinheim