

2.5% Mannit, pH = 6.8 vor dem Autoklavieren), 48 h bei 28 °C und 250 U min⁻¹ geschüttelt (Schüttler-Typ: BS 4, B. Braun, Melsungen). Mit 100 mL dieser Vorkultur wurde der 1 L-Fermenter (Typ ISF 100, Infors GmbH, Basel, Schweiz) angeimpft, der mit 1 L des Nährmediums und 30 mmol L⁻¹ Ornithinhydrochlorid gefüllt war (Ausnahme: Fütterungsversuche mit markiertem Ornithin oder markierter Glutaminsäure, bei denen kein Ornithinhydrochlorid zugesetzt wurde; T = 28 °C, Belüftung: 1.6 L min⁻¹, 700 U min⁻¹). Die Ernte erfolgte nach ca. 64 h.

Isolierung von Pyridazomycin 1: Das Kulturfiltrat der Fermentationen wurde auf einen sauren Ionenaustauscher (Dowex 50) gegeben, mit ca. 1.8 L demineralisiertem Wasser gewaschen und mit wässriger NH_4^+ - HCOO^- -Lösung (pH = 5; Gradient 0.3 M (1.5 L), 0.5 M (0.7 L) und 0.7 M (1 L)) eluiert. Die 1-enthaltenden Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer bei 40 °C im Vakuum eingeengt, zunächst an Kieselgel (Säule 60 × 3 cm, $n\text{BuOH}/\text{CH}_3\text{COOII}/\text{H}_2\text{O}$ 3/2/2) und anschließend an Sephadex G-10 (Säule 100 × 2.5 cm, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 8/2, pH = 4.0, eingestellt mit 0.1 M HCl) chromatographiert. Die Fraktionen mit dem gereinigten Produkt wurden gefriergetrocknet.

Fütterungsexperimente: Die isotopenmarkierten Verbindungen wurden in 100 mL steriles Wasser gelöst und in vier gleichen Portionen in Abständen von sechs Stunden oder kontinuierlich, beginnend 25 h nach Animpfung zur wachsenden *S. violaceoruber*-Kultur (1 L-Fermenter) gegeben.

Isotopenmarkierte Verbindungen: Die ^{13}C - und/oder ^{15}N -markierten Verbindungen wurden synthetisiert oder von den Cambridge Isotope Laboratories, Cambridge, MA, USA bezogen. Die unterschiedlich markierten Ornithine wurden nach der Methode von Gould et al. [14] aus 2-Chlorethanol, K^{13}CN (99% ^{13}C) bzw. KC^{15}N (99% ^{15}N) und Diethylacetamidomalonat, das markierte Glycerin aus Bromessigsäure und K^{13}CN (99% ^{13}C) über Cyanessigsäure, Diethylmalonat und Diethyl-2-acetoxymalonat (Oxidation mit PbOAc_4) synthetisiert. $[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{-}\beta\text{-Alanin}$ wurde durch Hydrierung (12 h, 25°C, 90 mg Pt als Katalysator, in 30 mL Ethanol, angesäuert mit 0.2 mL konzentrierter HCl) der ^{13}C -markierten Cyanessigsäure (1.5 g) hergestellt und chromatographisch an Kieselgel (Säule 30 x 2 cm, 1-Propanol/H₂O 4/1) gereinigt (Ausbeute: 0.3 g).

Eingegangen am 26. Februar 1994 [Z 6715]

- [1] R. Grote, Y. Chen, A. Zeeck, Z. Chen, H. Zähner, P. Mischnick-Lübbecke, W. A. König, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 595–601.

[2] P. Hughes, J. Clardy, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3260–3264, zit. Lit.

[3] a) M. Nakagawa, Y. Hayakawa, K. Furihata, H. Seto, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 477–484; b) K. Isshiki, T. Sawa, H. Naganawa, Y. Koizumi, N. Matsuda, M. Hamada, T. Takeuchi, M. Iijima, M. Osono, T. Masuda, M. Ishizuka, *ibid.* **1990**, *43*, 1195–1198; c) J. E. Leet, D. R. Schroeder, B. S. Krishnan, J. A. Matson, *ibid.* **1990**, *43*, 961–966; d) O. D. Hensens, R. P. Borris, L. R. Koupal, C. G. Caldwell, S. A. Currie, A. A. Haidri, C. F. Homnick, S. S. Honeycutt, S. M. Lindemann, C. D. Schwartz, B. A. Weissberger, H. B. Woodruff, D. L. Zink, L. Zitano, J. M. Fieldhouse, T. Rollins, M. S. Springer, J. P. Springer, *ibid.* **1991**, *44*, 249–254.

[4] a) J. G. Buchanan, M. R. Hamblin, G. S. Sood, R. H. Wightman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 917–918; b) C. S. J. Walpole, R. Wrigglesworth, *Nat. Prod. Rep.* **1989**, *6*, 311–346.

[5] a) M. Yamato, T. Takeuchi, H. Umezawa, N. Sakata, H. Hayashi, M. Hori, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 1263–1269, zit. Lit.; b) R. J. Parry, Y. Li, F.-L. Lii, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10062–10064.

[6] Y. Takahashi, M. Nakayama, I. Watanabe, T. Deushi, H. Ishiwata, M. Shiratsuchi, G. Otani, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1541–1546, zit. Lit.

[7] a) T. Kameyama, A. Takahashi, H. Matsumoto, S. Kurasawa, M. Hamada, Y. Okami, M. Ishizuka, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1561–1567; b) A. Takahashi, H. Nakamura, D. Ikeda, H. Naganawa, T. Kameyama, S. Kurasawa, Y. Okami, T. Takeuchi, Y. Itaka, *ibid.* **1988**, *41*, 1568–1574.

[8] a) C. L. Stevens, B. T. Gillis, J. C. French, T. H. Haskell, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6088–6092; b) R. J. Parry, H. S. P. Rao, J. Mueller, *ibid.* **1982**, *104*, 339–340; c) R. J. Parry, J. V. Mueller, *ibid.* **1984**, *106*, 5764–5765.

[9] a) N. Imamura, H. Kuga, K. Otoguro, H. Tanaka, S. Ömura, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 156–158; b) W. Giencke, O. Ort, H. Stark, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 671–676.

[10] R. Thiericke, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 265–289, zit. Lit.

[11] a) D. Hege, H. Zähner, persönliche Mitteilung; b) D. Hege, Diplomarbeit, Universität Tübingen, **1988**; c) H. Bockholt, Diplomarbeit, Universität Göttingen, **1989**.

[12] A. I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara, R. J. Cushley, P. J. Whitman, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 8069–8080.

[13] Wir vermuten eine N-N'-Verknüpfung durch N-Oxidation von Ornithin, die durch eine Ornithin-*N*⁵-Hydroxylase eingeleitet wird [5b].

[14] J. Wityak, V. I. Palaniswamy, S. J. Gould, *J. Labelled Compd.* **1985**, *22*, 1155–1157.

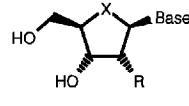
Synthese eines Azathymidins und dessen Einbau in Oligonucleotide**

Karl-Heinz Altmann*, Susan M. Freier, Uwe Pieles
und Tammo Winkler

Die Hemmung der Proteinbiosynthese durch Antisense-Oligonucleotide ist ein grundsätzlich neuer Ansatz in der medizinisch-chemischen Forschung^[1]. Dieses Konzept basiert auf den sehr spezifischen Regeln, die die gegenseitige Erkennung von Nucleinsäuren bestimmen (Watson-Crick-Basenpaarung), wobei versucht wird, die selektive Hybridisierung eines (Antisense)-Oligonucleotids mit einer geeigneten komplementären Basensequenz auf einer Boten-RNA zur Unterdrückung der Expression eines mit einer bestimmten Krankheit in Zusammenhang stehenden Proteins zu nutzen^[1]. Die grundsätzliche Anwendbarkeit einer solchen Strategie ist bereits durch eine Vielzahl von In-vitro-Experimenten belegt worden; diese Experimente haben jedoch auch gezeigt, daß das entsprechende Antisense-Oligonucleotid zur Erreichung einer signifikanten Inhibition der Proteinsynthese genügend stabil gegenüber enzymatischem Abbau sein muß^[1]. Da natürliche Oligonucleotide unter physiologischen Bedingungen sehr schnell abgebaut werden, hat dies zum Entwurf und zur Synthese einer ganzen Reihe verschiedener Typen von Oligonucleotiden oder Oligonucleotidanalogen geführt, die einen modifizierten Zucker- oder Basenteil oder eine modifizierte Rückgratstruktur aufweisen^[1, 2]. Hierunter befinden sich u.a. Oligonucleotide, die carbocyclische Nucleoside **1**^[3, 4] oder auch Thia-Analoge von Thymidin^[6] oder von Ribothymidin **2**^[7] (Base = Thymin) als Bausteine enthalten. Im Gegensatz dazu sind bisher keine Oligonucleotide bekannt, die Nucleosidanaloge **3** enthalten, bei welchen die 2'-Desoxyribose-Einheit durch einen Pyrrolidinring ersetzt ist.

Während Verbindungen vom Typ 3 mit $R' = H$ mit großer Wahrscheinlichkeit chemisch zu unstabil sind, um in Oligonucleotide eingebaut werden zu können^[8], könnten die entsprechenden acetylierten Derivate ($R' = Ac$) interessante Bausteine für Antisense-Oligonucleotide sein. Zwar kann die Hybridisierungssaffinität solcher modifizierter Oligonucleotide für komplementäre RNA nur schwer im Detail vorausgesagt werden, doch weisen Molekülmodelle eindeutig darauf hin, daß acetylierte Bausteine vom Typ 3 ohne größere strukturelle Störungen in einen Standard-Nucleinsäureduplex eingebaut werden können. Darüber hinaus scheint es wahrscheinlich, daß die größere Raumerfüllung eines Acetamido-Substituenten (im Vergleich zum Furanose-Sauerstoffatom) die Erkennung der entsprechenden Oligonucleotide durch nucleolytische Enzyme entscheidend behindern und somit zu erhöhter metabolischer Stabilität führen sollte.

Aufgrund dieser Überlegungen haben wir nun die Eigenschaften von Oligonucleotiden näher untersucht, die Nucleosid-



- 1 $X = \text{CH}_2$, $R = \text{H}$
 - 2 $X = \text{S}$, $R = \text{H, OH}$
 - 3 $X = \text{NR}'$, $R = \text{H}$
 - 4 $X = \text{NCOCH}_3$, $R = \text{H}$
Base = Thymin

[*] Dr. K.-H. Altmann, Dr. U. Pieles

Dr. K. H. Altmann, Dr. G. Fleis
CIBA, Zentrale Forschungslaboratorien, R-1060.2.34
CH-4002 Basel (Schweiz)

Telex: 7002 Basler (Schweiz)

Dr. S. M. Freier

ISIS Pharmaceuticals Carlsbad, CA (USA)

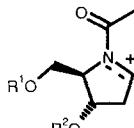
Dr. T. Winkl

Dr. T. Winkler

[**] Wir danken Dr. H.-P. Buser für die Bestimmung der Enantiomerenreinheit von 6 durch HPLC auf einem chiralen Träger.

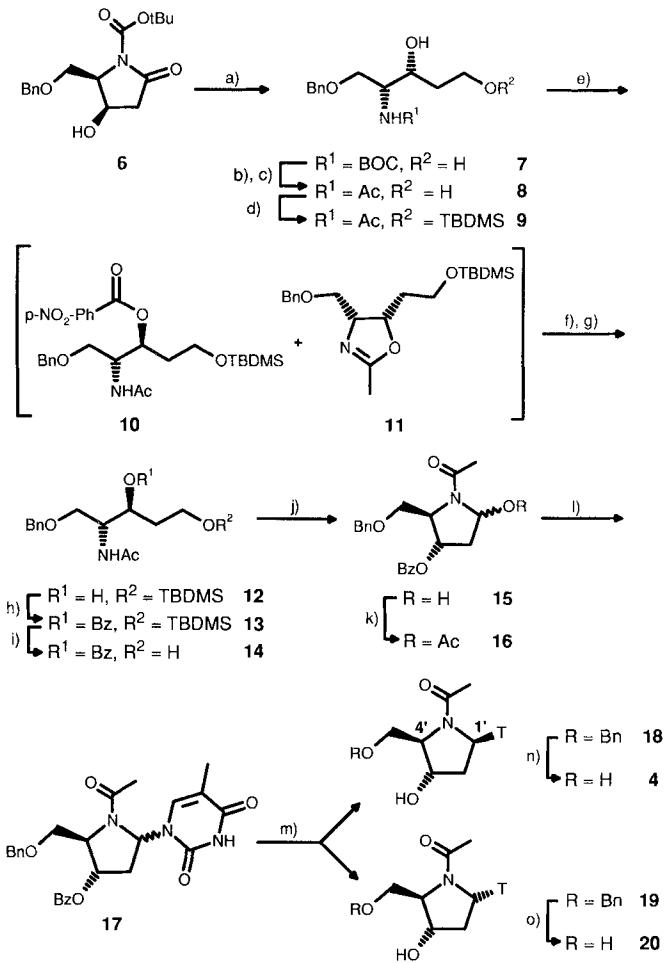
analoga vom Typ **3** mit $R' = \text{Ac}$ als Bausteine enthalten, wobei wir uns zunächst auf das Azathymidin **4**, bei dem das Sauerstoffatom der Ribofuranosyleinheit durch einen *N*-Acetyl-Substituenten ersetzt ist, als einem repräsentativen Beispiel dieser Verbindungsklasse konzentriert haben. Eine 13stufige Synthese der Verbindung **4** ausgehend von 2-Desoxyribose ist kürzlich beschrieben worden^[9]. In dieser Arbeit berichten wir nun über einen alternativen Ansatz zur Synthese von **4**, dessen Einbau in ausgewählte Oligonucleotidsequenzen, sowie über die Hybridisierungseigenschaften und die Nucleaseresistenz dieser Oligomere.

Unsere Strategie zur Synthese von **4** basierte auf der geplanten Lewis-Säure-katalysierten Erzeugung eines geeigneten geschützten *N*-Acyliminium-Ions **5** als reaktivem Schlüssel-Zwischenprodukt^[10]. Dieses sollte dann in situ mit silyliertem Thymin als Nucleophil abgefangen und das entstehende geschützte Thymidin-Analoge durch nachfolgende Schutzgruppenmanipulationen in das gewünschte Produkt überführt werden.



5

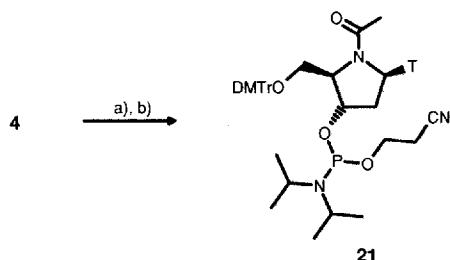
Wie in Schema 1 dargestellt, geht die Synthese aus vom optisch aktiven Pyrrolidin **6**, das in bekannter Weise in drei Schritten aus BOC-*D*-Ser(OBn)-OH (BOC = *tert*-Butoxycarbonyl) hergestellt werden kann^[11]. Behandlung von **6** mit NaBH_4 /EtOH in Gegenwart katalytischer Mengen HCl gab das partiell geschützte Aminotriol **7** in praktisch quantitativer Ausbeute. Dieses wurde dann durch säurekatalysierte Entfernung der BOC-Schutzgruppe und anschließende Acetylierung mit *N*-Acetoxysuccinimid direkt in die kristalline *N*-acetylierte Verbindung **8** überführt. Selektive Silylierung der primären Alkoholfunktion von **8** mit *tert*-Butyl-dimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl)^[12] führte zu **9**, dessen geplanter weiterer Aufbau zur Zielverbindung **4** zunächst die Inversion der Konfiguration am späteren Kohlenstoffatom C-3' erforderte. Mitsunobu-Reaktion von **9** mit *p*-Nitrobenzoësäure als externem Nucleophil^[13] ergab ein ca. 1/1-Gemisch des gewünschten *p*-Nitrobenzoats **10** und Oxazolin **11**. Unter Standard-Mitsunobu-Bedingungen^[14], d. h. entweder mit Benzoesäure oder Ameisensäure als externen Nucleophilen, trat dagegen überhaupt keine Reaktion ein. Das Gemisch von **10** und **11** wurde durch Esterspaltung mit NaOH/THF und anschließender Öffnung des Oxazolinrings mit NaOAc/Dimethoxyethan (DME)/H₂O bei 125 °C in 60% Gesamtausbeute in das gewünschte Aminotriol **12** umgewandelt (Ausbeute bezogen auf **9**). Benzoylierung und anschließende Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe mit NH₄F/MeOH^[15] führte dann zu **14** als dem unmittelbaren Vorläufer des Acetats **15**. Im Gegensatz hierzu führte die TBDMS-Abspaltung von *rac*-**13** mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) zu quantitativer Wanderung des Benzoylrests zur primären Hydroxylgruppe. Oxidation von **14** mit Tetra-*n*-propylammoniumperruthenat (TPAP)/*N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMMO)^[16] ergab Acetal **15** in mäßiger Ausbeute von 41%, was in erster Linie auf die schnelle weitere Oxidation von **15** zum entsprechenden Lactam zurückzuführen ist. Es erwies sich deshalb als vorteilhaft, das Reaktionsgemisch bereits nach 1.5 h aufzuarbeiten, das Produkt zu isolieren und zurückgewonnenes **14** nochmals zu oxidieren. **15** wurde dann in das Acetat **16** umgewandelt, das der direkte Vorläufer des *N*-Acyliminium-Ions **5** ist. Behandlung von **16** mit SnCl₄ in Gegenwart von (TMS)₂-Thymin für 1 h bei -15 °C ergab **17** in 93% Ausbeute als ein Gemisch von Diastereoisomeren, welches auf dieser Stufe nicht getrennt werden konnte. Umesterung mit NaOMe/MeOH und anschließende chromatographische Trennung führte dann zu **18** und **19** in 33% bzw. 48% Ausbeute. Die Identität von **18** und **19** wurde NMR-spektroskopisch durch



Schema 1. a) NaBH_4 (9 Äquiv.), EtOH, H^+ (kat.), 20 h, quant.; b) HCl/MeOH, Raumtemperatur (RT), 1 h; c) AcONa, Hünig's Base, THF/*N,N*-Dimethylformamid (DMF) 11/1, 4 h, 45% (zwei Stufen); d) TBDMS-Cl, Et₃N, 4-Dimethylaminopyridine (DMAP), CH_2Cl_2 /DMF 2/1, RT, 7 h, 94%; e) Diethylazodicarboxylate (DEAD), Ph₃P, *p*-NO₂-C₆H₄-COOH, Benzol, RT, 22 h; f) 2 N NaOH/THF 1/5, RT, 4.5 h; g) AcONa, DME/H₂O 12.5/1, 125 °C, 24 h, 60% (drei Stufen); h) Bz-Cl, Pyridin, RT, 5 h, 74%; i) NH₄F (15 Äquiv.), MeOH, 60 °C, 8 h, 82%; j) TPAP (0.1 Äquiv.), NMMO · H₂O (1.2 Äquiv.), AcOH (1 Äquiv.), CH_2Cl_2 , RT, 1.5 h und 4 h, 41%; k) Ac₂O, DMAP, CH_2Cl_2 /Pyridin 4/1, RT, 3 h, quant.; l) (TMS)₂-Thymine (2.5 Äquiv.), SnCl₄ (1.3 Äquiv.), CH₃CN, -15 °C, 1 h, 93%; m) 1) NaOMe (1.1 Äquiv.), MeOH, RT, 1.5 h, 80%; 2. Flash-Chromatographie in CH_2Cl_2 /MeOH 12.5/1: 18: 33%, 19: 48%; n) H₂, 10% Pd-C, MeOH, RT, 1.25 h, quant.; o) H₂, 10% Pd-C, MeOH, RT, 1.25 h, quant.

NOE-Differenzspektroskopie (NOE = Nuclear Overhauser Enhancement) bestimmt. Während für **19** ein starker NOE zwischen H-4' und H-6 der Base beobachtet wurde, war für **18** kein solcher NOE feststellbar. Dagegen weist ein für **18** beobachteter NOE zwischen H-1' und H-4' eindeutig auf eine *cis*-Anordnung dieser beiden Protonen hin. Die Synthese von **4** sowie seines Diastereoisomers **20** wurde schließlich durch nahezu quantitativ verlaufende Benzyletherspaltung mittels katalytischer Hydrierung zu Ende geführt^[17]. Wie ¹H-NMR-Messungen ergaben, liegt jede der beiden Verbindungen in methanolischer Lösung als ein ca. 1/1-Gemisch von Rotameren vor.

Für die Oligonucleotidsynthese wurde **4** mit Standardmethoden^[18a] in das Phosphoramidit **21** umgewandelt (Schema 2). **21** wurde dann zur Synthese von vier Oligonucleotiden herangezogen, die zwischen einem und vier Pyrrolidino-Thymidinresten enthalten (siehe unten). Die Oligonucleotide wurden nach Standard-Festphasen-Verfahren hergestellt^[18b], wobei während der Kupplung von **21** keine speziellen Probleme auftraten^[19].



Schema 2. a) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl), Et₃N, DMAP, RT, 27 h, 70%; b) NCCH₂CH₂OP[N(i-C₃H₇)₂]₂, Diisopropylammoniumtetrazolidine, CH₂Cl₂, RT, 23 h, 70%.

Die 5'-4,4'-Dimethoxytrityl(DMTr)-geschützten Oligonucleotide wurden durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) gereinigt und die DMTr-Schutzgruppe anschließend durch 20 min Behandlung mit 80proz. Essigsäure bei Raumtemperatur entfernt. Die vollständig entschützten Verbindungen waren nach kapillarelektrophoretischen Befunden zumindest 95% rein^[20].

Die Daten zur Hybridisierung von drei dieser vier Oligonucleotide mit komplementärer RNA (als dem Zielmolekül von Antisense-Oligonucleotiden) sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Hybridisierung von Azathymidin 4 enthaltenden Oligodesoxynucleotiden mit komplementären RNA-Sequenzen (Oligoribonucleotiden).

Oligonucleotid [a]	T _m [b, e]	T _m (WT) [c, e]	ΔT _m /Mod. [d]
d(tCC AGG tGt CCG CAt C)	57.4	62.3	-1.2
d(tCC GTA CCA TTC CGG TCC)	62.8	63.3	-0.5
d(tCC GTA Ctt ttC CGG TCC)	55.8	61.8	-1.5

[a] t = N-Acetyl-Pyrrolidino-Thymidin 4. [b] Schmelztemperatur des Duplexes zwischen dem modifizierten Oligodesoxynucleotid und dem entsprechenden komplementären Oligoribonucleotid (RNA) in °C. [c] Schmelztemperatur des unmodifizierten Wildtyp(WT)-Duplexes in °C. [d] T_m - T_m(WT) pro modifiziertem Baustein. [e] Bestimmt in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7, der außerdem 100 nM Na⁺-Ionen und 0.1 mM Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) enthält [22].

Sie zeigen, daß der Einbau des Azathymidins im Vergleich zum unmodifizierten Wildtyp(WT)-Duplex eine gewisse Destabilisierung des RNA/DNA-Duplexes zur Folge hat, was sich in einer durchschnittlichen Erniedrigung der T_m-Werte um 1.3 °C/Modifikation widerspiegelt. Der destabilisierende Effekt könnte ganz generell durch Störungen der normalen Duplexstruktur durch den N-Acetyl-Substituenten verursacht werden, wobei dies jedoch aus den entsprechenden Molekülmodellen nicht ohne weiteres ersichtlich ist (siehe oben). Hinzu kommt, daß verschiedene Rotamere um die tertiäre Amidbindung die Bindung an RNA in unterschiedlicher Weise beeinflussen könnten.

Im Gegensatz zur leicht beeinträchtigten Bindungsaffinität wird die Spezifität der Hybridisierung eines Oligonucleotids mit komplementärer RNA durch den Einbau von 4 nicht beeinträchtigt. Wie in Tabelle 2 gezeigt, übersteigen die Schmelzpunktsdifferenzen zwischen dem einen einzelnen Azathymidinrest („t“) als Teil des DNA-Strangs enthaltenden, vollständig komplementären („fully matched“) DNA/RNA-Duplex (t: A-Basenpaar) und den verschiedenen fehlgepaarten („mis-matched“) Duplexen (welche t: C, t: G- und t: U-Basenpaare aufweisen) selbst die Schmelzpunktsdifferenzen für die entsprechenden unmodifizierten Duplexe, die anstelle von 4 natürliches Thymidin enthalten. Angesichts des eng begrenzten Datensatzes sollte diese durch den Einbau von 4 hervorgerufene scheinbare Erhöhung der Hybridisierungsspezifität nicht überinterpretiert

Tabelle 2. Hybridisierung von d(CTC GTA CCA TTC CGG TCC) mit r(GGA CCG GAA YGG UAC GAG) [a].

Y	T _m [b, c]	ΔT _m [c, e]	ΔT _m (WT) [d, e]
rA	62.8	-	-
rC	53.1	-9.7	-8.9
rG	54.9	-7.9	-1.7
rU	51.1	-11.7	-7.5
Durchschnitt	-	-9.7	-6.0

[a] t = 4. [b] Schmelztemperatur des modifizierten DNA/RNA Heteroduplexes in °C. [c] Schmelzpunktsdifferenz zwischen dem vollständig komplementären (Y = rA) und dem jeweiligen fehlgepaarten Duplex in °C. [d] Schmelzpunktsdifferenz zwischen dem vollständig komplementären (Y = rA) und dem jeweiligen fehlgepaarten Wildtyp (WT)-Duplex (d.h. alle Duplexe enthalten natürliches Thymidin anstelle von 4). [e] bestimmt in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7, der außerdem 100 mM Na⁺-Ionen und 0.1 mM EDTA enthält [22].

werden, jedoch kann man anhand der in Tabelle 2 gezeigten Daten sicherlich davon ausgehen, daß 4 enthaltende Oligonucleotide im allgemeinen zumindest mit gleicher Spezifität an komplementäre RNA binden sollten wie die entsprechenden Wildtyp-Oligonucleotide.

Zur Überprüfung der Nucleaseresistenz von N-Acetyl-Pyrrolidino-Thymidin enthaltenden Oligonucleotiden haben wir die Stabilität von TCC AGG TGT CCG ttt C gegenüber dem Abbau durch 3'-Exonuclease in 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kalbsserum (FCS) untersucht^[11]. Läßt man den Verlust des natürlichen 2'-Desoxycytidinrests am 3'-Ende außer acht, so beträgt die Halbwertszeit für den Abbau dieses Oligonucleotids sehr viel mehr als 48 h^[23]. Unter den gleichen experimentellen Bedingungen liegt die Halbwertszeit für den Abbau des entsprechenden unmodifizierten Wildtyp-Oligonucleotids lediglich bei 2 h, womit das modifizierte Oligonucleotid eine mehr als 20fach erhöhte Nucleasestabilität aufweist.

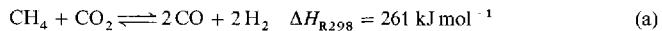
Angesichts dieser Ergebnisse sollten Pyrrolidino-Nucleoside vom Typ 3 mit R' = Ac ein ausgezeichnetes Werkzeug zur Stabilisierung von Antisense-Oligonucleotiden gegenüber einem Abbau durch 3'-Exonuclease sein. Es sind jedoch zusätzliche Experimente erforderlich, um feststellen zu können, ob die Bindungsaffinität von vollständig modifizierten Sequenzen (die nur Bausteine vom Typ 3 mit R' = Ac enthalten) für biologische Anwendungen noch ausreichend wäre.

Eingegangen am 8. Januar,
veränderte Fassung am 29. März 1994 [Z 6607]

- [1] a) E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543–584; b) S. T. Crooke, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1992**, *32*, 329–376; c) J. F. Milligan, M. D. Matteucci, J. C. Martin, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1923–1937.
- [2] P. D. Cook, *Anticancer Drug. Des.* **1991**, *6*, 585–607.
- [3] a) M. Perbost, M. Lucas, C. Chavis, A. Pompon, H. Baumgartner, B. Rayner, H. Griengl, J.-L. Imbach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *165*, 742–747; b) J. Sagi, A. Szemzo, J. Szécsy, L. Ötvös, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 2133–2140; c) H. E. Moser, *Perspectives in Medicinal Chemistry* **1993** (Hrsg.: B. Testa, E. Kyburz, W. Fuhrer, R. Giger) Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, **1993**, S. 275–297.
- [4] Verbindungen vom Typ 1 mit R = OH sind ebenfalls bekannt [5]; entsprechende Oligonucleotide sind bisher jedoch nicht beschrieben worden.
- [5] Übersichtsartikel: A. D. Borthwick, K. Biggadike, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 571–623.
- [6] E. L. Hancox, B. A. Connolly, R. T. Walker, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3485–3491.
- [7] a) L. Bellon, J.-L. Barascut, G. Maury, G. Divita, R. Goody, J.-L. Imbach, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 1587–1593; b) L. Bellon, F. Morvan, J.-L. Barascut, J.-L. Imbach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *184*, 797–803.
- [8] K.-H. Altmann, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7721–7724.
- [9] B. Huang, B. Chen, Y. Hui, *Synthesis* **1993**, 769–771.
- [10] Eine Übersicht über Reaktionen, die über N-Acyliminium-Ionen verlaufen, findet sich in: H. Hiemstra, W. N. Speckamp in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 2 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 1047–1082.

- [11] P. Jouin, B. Castro, D. Nisato, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 1177–1182. **6** wurde durch Flash-Chromatographie gereinigt und anschließend aus Aceton umkristallisiert. Im Gegensatz zu den in der zitierten Arbeit beschriebenen Ergebnissen befand sich das optisch aktive Material in der Mutterlauge der Umkristallisationsmischung, während das Kristallat zur Hauptsache aus dem Racemat bestand. Der $[\alpha]_D^{25}$ -Wert von **6** betrug -65.5 ($c = 1.0$ in MeOH), Schmp. $99\text{--}100^\circ\text{C}$ (Lit. (+)-**6**: $[\alpha]_D^{20} = +59$ ($c = 1.0$ in MeOH), Schmp. $100\text{--}101^\circ\text{C}$). Die Analyse der optischen Reinheit von **6** durch chirale HPLC ergab einen Enantiomerenüberschuss (ee) von 96 %. BOC-D-Ser(Obn)-OH wurde nach H. Sugano, M. Miyoshi, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2352–2353 aus BOC-D-Ser-OH hergestellt.
- [12] S. K. Chaudhary, O. Hernandez, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 99–102.
- [13] S. F. Martin, J. A. Dodge, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3017–3020.
- [14] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1–28.
- [15] W. Zhang, M. J. Robins, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1177–1180.
- [16] W. P. Griffith, S. V. Ley, G. P. Whitcombe, A. D. White, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1625–1627.
- [17] **4**: $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD₃OD, TMS): $\delta = 8.05$ (s, 0.45 H; H-6 (Nebenrotamer, NR)), 7.60 (s, 0.55 H; H-6 (Hauptrotamer, HR)), 6.40 (dd, $^3J(\text{H},\text{H}) = 7$ Hz, $^3J(\text{H},\text{H}) = 7$ Hz, 0.45 H; H-1' (NR)), 6.20 (dd, $^3J(\text{H},\text{H}) = 8$ Hz, $^3J(\text{H},\text{H}) = 8$ Hz, 0.55 H; H-1' (HR)), 4.30 (s, br, 0.45 H; H-3' (NR)), 4.25 (d, $^3J(\text{H},\text{H}) = 5$ Hz, 0.55 H; H-3' (HR)), 4.00–3.65 (m, 3 H; H-5' (2), H-4'), 2.40–2.15 (m, 2 H; H-2'- α , H-2'- β), 2.10 (s, 1.65 H; CH₃ (Ac) (HR)), 1.85 (s, 1.35 H; CH₃ (Ac) (NR)), 1.89, 1.86 (2 \times s, 3 H; CH₃ (Thymin)). FAB-MS: (C₁₂H₁₇N₃O₅) (283.116): 284 (45, [M + H]⁺). **20**: $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD₃OD, TMS): $\delta = 7.55$ (s, 0.45 H; H-6 (NR)), 7.50 (s, 0.55 H; H-6 (HR)), 6.30 (d, $^3J(\text{H},\text{H}) = 8$ Hz, 0.55 H; H-1' (HR)), 6.20 (d, $^3J(\text{H},\text{H}) = 8$ Hz, 0.45 H; H-1' (NR)), 4.30 (m, 1 H; H-3'), 4.15 (s, br, 0.55 H; H-4' (HR)), 4.05 (t, br, 0.45 H; H-4' (NR)), 3.70–3.45 (m, 2 H; H-5'), 2.30–2.10 (m, 1 H; H-2'- β), 2.15 (s, 1.35 H; CH₃ (Ac) (NR)); 1.95–1.75 (m, 5.65 H; inkl. s, 1.90 CH₃ (Ac) (HR); s, 1.78; s, 1.74, CH₃ (Thymin); H-2'- α). FAB-MS (C₁₂H₁₇N₃O₅) (283.116): 284 (56, [M + H]⁺).
- [18] a) N. D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 4539–4557; b) *Oligonucleotide synthesis – a practical approach* (Hrsg.: M. J. Gait) IRL, Oxford, 1984.
- [19] Die Kupplungszeiten für den Einbau von **21** betragen routinemäßig 10 min.
- [20] **4** war unter den Bedingungen der Oligonucleotidsynthese vollkommen stabil. Darüber hinaus wurde der Einbau von **4** als intaktes Molekül in die verschiedenen Oligonucleotide durch Analyse der Produkte mit Matrix-unterstützter Laserdesorptions-Flugzeit (MALDI-TOF) Massenspektrometrie [21] sichergestellt.
- [21] U. Pieles, W. Zürcher, M. Schär, H. E. Moser, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3191–3196.
- [22] E. A. Lesnik, C. J. Guinozzo, A. M. Kawasaki, H. Sasmor, M. Zouves, L. L. Cummins, D. J. Ecker, P. D. Cook, S. M. Freier, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7832–7838.
- [23] Der natürliche Nucleotidbaustein am 3'-Ende des Oligonucleotids ist lediglich aus Gründen der einfacheren synthetischen Zugänglichkeit vorhanden, da hierdurch die Festphasensynthese des Oligonucleotids ausgehend von einem kommerziell erhältlichen Träger durchgeführt werden kann. Dieser Baustein wird durch die Einwirkung von 3'-Exonucleaseen relativ rasch vom Oligonucleotid abgespalten, was von der Natur der benachbarten Bausteine nur sehr wenig beeinflusst wird. Das Ausmaß des durch die modifizierten Bausteine **4** gewährten Schutzes von TCC AGG TGT CCG ttt C vor dem Abbau durch 3'-Exonucleaseen ist deshalb im wesentlichen durch die Halbwertszeit des weiteren Abbaus des durch die Entfernung des 3'-endständigen 2'-Desoxycytidinrestes entstehenden (n-1)-Oligonucleotids gegeben.

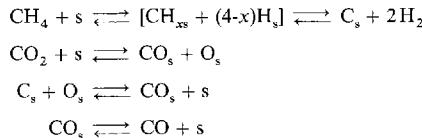
das sogenannte trockene oder CO₂-Reformieren, ist ein besonders eleganter Weg zur direkten Verwertung beider Gase^[2, 3]. Das nach Reaktion (a) entstandene Synthesegas hat im Ver-



gleich zu dem auf üblichem Weg, d.h. über die Spaltung von CH₄ mit Wasserdampf (steam reforming^[4]), hergestellten Synthesegas ein niedrigeres H₂/CO-Verhältnis, was günstig für Hydroformylierungen und Fischer-Tropsch-Verfahren ist. Technisch wurde das CO₂-Reformieren bereits 1948 in den USA zur Synthesegaserzeugung eingesetzt^[5] und wird heute noch im Calcor-Prozeß hauptsächlich zur CO-Herstellung genutzt^[6]. Neues Interesse an dieser Umsetzung ergab sich aus ihrer potentiellen Nutzung als effektive Reaktionen zur Energiespeicherung^[7, 8] und der verkokungsfreien CO₂-Verwertung^[2].

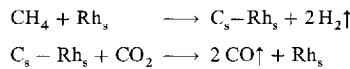
Rh-, Ir- und Ru-Trägerkatalysatoren haben sich bei der stark endothermen Gleichgewichtsreaktion (a) besonders bewährt. Über eine verkokungsfreie Umsetzung an Rh-, Ru-^[2, 3, 8] und Ir-Katalysatoren^[2, 3] wurde berichtet. Ni-, Pt- und Pd-Katalysatoren sind für das CO₂-Reformieren dagegen weniger geeignet, da sie nicht so aktiv wie Rh-, Ru- oder Ir-Katalysatoren sind, und Ni- und Pd-Katalysatoren darüber hinaus zur Desaktivierung durch Verkokung neigen^[2, 3, 9]. Auf Kosten von weiteren Aktivitätseinbußen können Ni-Katalysatoren nach einer partiellen Passivierung mit H₂S verwendet werden^[10].

Obwohl bereits 1928 Fischer und Tropsch^[11] über die Umsetzung von Erdgas mit Kohlensäure berichteten, ist der Reaktionsmechanismus bis heute nicht eindeutig geklärt. Bodrov und Apelbaum postulieren aufgrund kinetischer Untersuchungen die intermediaire Bildung von Wasser als wichtige Zwischenstufe^[12]. Grundlage des in neuerer Zeit akzeptierten Mechanismus^[13] ist die dissoziative Adsorption von CO₂ und die stufenweise Dissoziation von CH₄ an aktiven Metallzentren (Schema 1). Noch 1991 wurde die beobachtete Aktivitätsordnung der katalysierenden Metalle mit der CO₂-Dissoziationsaktivität korreliert^[9].



Schema 1. Bisher angenommener Mechanismus für die Bildung von Synthesegas^[13]. Der Träger wird hier mit s (surface) bezeichnet; C_s entspricht somit an die Oberfläche absorbierten Kohlenstoff (Oberflächenkohlenstoff).

Der Nachweis von geringen Mengen an Ethan bei der Zersetzung von Methan an Rh/SiO₂-Katalysatoren bei 250 °C wurden als Hinweis auf die Bildung von CH_x-Einheiten an der Oberfläche gedeutet^[13, 14]. Solymosi et al.^[14] beobachteten auf Rh-Katalysatoren die Bildung unterschiedlich reaktiver C-Spezies, deren reaktivste Form schon bei 80 °C mit H₂ zu Methan reagiert. Dieselben Autoren diskutieren erstmals 1993 einen Alternativmechanismus für die Umsetzung von aktivem Oberflächenkohlenstoff C_s mit CO₂^[14] (Schema 2).



Schema 2. Alternativmechanismus für die Bildung von Synthesegas [14].

Aktiver Oberflächenkohlenstoff – reaktive Zwischenstufe bei der Synthesegaserzeugung aus Methan und Kohlendioxid

Michael F. Mark und Wilhelm F. Maier*

Eine sinnvolle Nutzung der klimarelevanten Gase CH₄ und CO₂ (Treibhauseffekt) als Kohlenstoffquellen ist ein zentrales Anliegen der heterogenen Katalyse^[1]. Die Umsetzung (a) von CO₂ mit CH₄ zu einem Gemisch aus CO und H₂ (Synthesegas),

[*] Prof. Dr. W. F. Maier, Dipl.-Chem. M. F. Mark

Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45466 Mülheim an der Ruhr
Telefax: Int. + 208/306-2987