

Peptidnucleinsäuren (PNAs) aus chiralen Aminosäuren und Thymin-Monomeren: Hybridisierungs- und Löslichkeitseigenschaften von D-Lysin-PNA^{}**

Gerald Haaima, Anders Lohse, Ole Buchardt[†] und Peter E. Nielsen*

Peptidnucleinsäuren (PNAs) sind DNA-Imitatoren mit einem achiralen, neutralen Pseudopeptid-Rückgrat^[1-4]. Sie gehen sowohl mit Einzelstrang-DNA und -RNA^[5,6] als auch mit doppelsträngiger DNA^[7,8] feste, sequenzspezifische Bindungen ein und sind sowohl chemisch als auch biologisch stabil^[9]. Diese Eigenschaften machen PNAs zu attraktiven Ausgangsverbindungen für die Entwicklung von Gentherapeutika^[10-15] und molekularbiologischen Werkzeugen^[16]. Das ursprüngliche PNA-Rückgrat besteht aus *N*-(2-Aminoethyl)glycin-Einheiten, wobei die Nucleobasen über Methylencarbonyllinker^[1-4] mit den Glycin-Stickstoffatomen verknüpft sind (Schema 1). Verlängerungen des Rückgrats durch den Einbau zusätzlicher Methylengruppen haben sich als ungünstig für die DNA-Imitation erwiesen^[16]. Methylgruppen an verschiedenen Stellen des Rückgrats und die so erzeugte Chiralität haben dagegen keinen negativen Einfluß auf die Hybridisierungseigenschaften^[17,18].

Bislang ist jedoch nicht bekannt, ob auch größere Substituenten untergebracht werden können (obwohl die aus NMR-Untersuchungen verfügbaren Daten zu PNA-RNA^[16] und PNA-DNA-Doppelsträngen^[19] nicht auf sterische Wechselwirkungen solcher Substituenten hindeuten).

Diese Frage kann nur beantwortet werden, wenn PNA-Monomere aus anderen α -Aminosäuren als Glycin hergestellt werden und so eine Funktionalität (und Chiralität) in das PNA-Rückgrat eingeführt wird. Durch die Funktionalität könnte das Hybridisierungsverhalten der PNA gesteuert sowie die Löslichkeit in der Zelle und die Aufnahme in diese begünstigt werden. Schließlich könnten funktionelle Gruppen im PNA-Rückgrat Bindungsstellen für biologisch aktive Liganden zur Verfügung stellen.

Wir berichten nun sowohl über die Synthese von PNA-Monomeren aus D- und L-Lysin, D- und L-Serin, D-Glutaminsäure,

[*] Prof. Dr. P. E. Nielsen

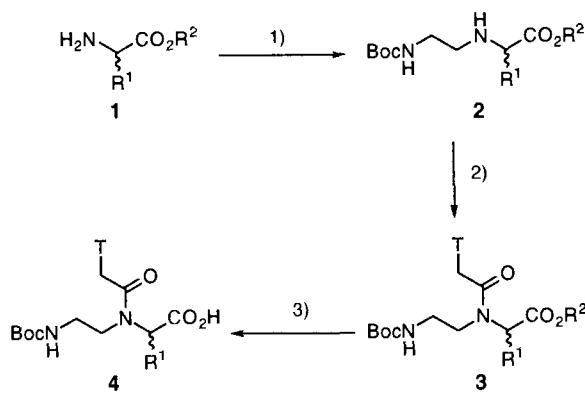
Center for Biomolecular Recognition
Department of Medical Biochemistry & Genetics
The Panum Institute
Blegdamsvej 3, DK-2200 Kopenhagen N (Dänemark)
Telefax: Int. +45/31396042
E-mail: penpanum@biobase.dk

Dr. G. Haaima, A. Lohse, Prof. Dr. O. Buchardt[†]
Center for Biomolecular Recognition
Department of Chemistry, University of Copenhagen
Universitetsparken 5, DK-2100-Kopenhagen N (Dänemark)

[**] Diese Arbeit wurde von der nationalen dänischen Forschungsförderung und von ISIS Pharmaceuticals gefördert. Wir danken Annette W. Jørgensen und Margit Jørgensen für ihre Hilfe bei den praktischen Arbeiten.

L-Asparaginsäure und L-Isoleucin mit Thymin als Nucleobase als auch über PNA-Decamere, die drei solche Monomere enthalten. Weiterhin zeigen wir, daß die Änderungen der thermischen Stabilität von PNA-DNA- oder PNA-RNA-Doppelsträngen zwischen -3.0 und $+1.0$ K pro eingeführtem Monomer betragen, verglichen mit der Stabilität des ursprünglichen Glycin-Rückgrats; das D-Lysin-Derivat ist das einzige Monomer, das eine Stabilisierung zur Folge hat. Außerdem führt dieses Monomer zu einer erhöhten Wasserlöslichkeit des PNA-Oligomers. Schließlich konnten falsche Basenpaarungen nach Einführung dieser Monomere leichter erkannt werden.

In Schema 2 ist die Synthese chiraler PNA-Monomere mit Thymin als Nucleobase dargestellt. Der Syntheseweg gleicht dem für reguläre PNA-Monomere^[21]. Es wurden mehrere Schutzgruppen für die Seitenketten und α -Carboxygruppen verwendet (Tabelle 1); alle wurden so gewählt, daß das Stereozen-



Schema 2. Synthese der chiralen PNA-Monomere **4a-g**. 1) $\text{BocNHCH}_2\text{CHO}$, NaCNBH_3 ; 2) Thymine-1-ylessigsäure, DCC, DhbtOH, DIEA, DMF, 40°C ; 3) für Benzylester: H_2 , 10 % Pd-C, MeOH, 1 h; für Allylester: $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, Morpholin, THF, 30 min. Die Abkürzungen sind in Lit. [20] erklärt. Siehe auch Tabelle 1.

Tabelle 1. Verwendete Aminosäuren und Schutzgruppen in den Synthesen aus Schema 2 sowie erzielte Ausbeute.

| Aminosäure | Konfi- guration | R ¹ | R ² | Gesamt- ausbeute [%] |
|------------|--------------------|----------------|--|-------------------------|
| a | Isoleucin | L | <i>sec</i> -Bu | Benzyl 49 |
| b | Serin | L | CH_2OBn | Allyl 44 |
| c | Serin | D | CH_2OBn | Allyl 41 |
| d | Asparaginsäure | L | $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Hex}$ | Benzyl 42 |
| e | Glutaminsäure | D | $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bn}$ | Allyl 46 |
| f | Lysin | L | $(\text{CH}_2)_4\text{NH}-2\text{-CIZ}$ | Allyl 45 |
| g | Lysin | D | $(\text{CH}_2)_4\text{NH}-2\text{-CIZ}$ | Allyl 42 |

trum während der Synthese und der nachfolgenden Oligomerisierung erhalten blieb^[22]. Die α -Carboxygruppen wurden als Allylester geschützt^[23], da diese Schutzgruppenstrategie mit der für die Nucleobasen der PNAs (A, C und G) in Einklang ist^[21].

In einer modifizierten Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield^[24] wurden duplexbildende PNA-Oligomere mit der Sequenz $\text{H-GT}_x\text{AGAT}_x\text{CACT}_x\text{-}(Lys)\text{NH}_2$ (T_x steht für die neu synthetisierten T-Monomere) an einem MBHA-Träger synthetisiert^[25]. Am Anfang der Sequenz wurde außer bei Oligomeren, deren Monomere Carbonsäureseitenketten enthielten, immer L-Lysin eingeführt, um den Vergleich mit früher synthetisierten PNAs zu erleichtern. Entschützen und Abspalten vom Träger erfolgte mit wasserfreiem HF oder nach der „Low/high“-TFMSA-Methode^[26]. Alle Oligomere wurden über HPLC gereinigt und mittels MALDI-TOF- und/oder FAB-Massenspek-

Tabelle 2. Schmelztemperaturen T_m [°C] von PNA-DNA- und PNA-RNA-Doppelsträngen [a, b].

| Rückgrat [c] | [f] | T_m (DNA, antiparallel) | ΔT_m DNA [e] | T_m (DNA, parallel) | T_m (RNA) | ΔT_m (RNA) [e] |
|------------------|--------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------|-------------|------------------------|
| Glycin | LysNH ₂ | 52 | — | 38 | 55 | — |
| Glycin | NH ₂ | 49 | — | 38 | 54 | — |
| L-Lysin | LysNH ₂ | 49 | -1.0 | 41 | 51 | -1.3 |
| D-Lysin | LysNH ₂ | 55 | +1.0 | 40 | 55 | 0 |
| L-Serin | LysNH ₂ | 49 | -1.0 | 37 | 52 | -1.0 |
| D-Serin | LysNH ₂ | 50 | -0.6 | 38 | 52 | -1.0 |
| D-Glutaminsäure | NH ₂ | 42 | -2.3 | 28 | [d] | [d] |
| L-Asparaginsäure | NH ₂ | 38 | -3.3 | 33 | [d] | [d] |
| L-Isoleucin | LysNH ₂ | 44 | -2.6 | 38 | 46 | -3.0 |

[a] Wäßriger Puffer aus 100 mM NaCl, 10 mM Phosphat, 0.1 mM EDTA, pH 7.0, Aufheizgeschwindigkeit 1 K min⁻¹, UV-Absorption gemessen bei 254 nm. [b] Die PNA-Sequenz lautete H-GT_xA GAT_xCAC T_x-R (R = NH₂ oder L-LysNH₂). Die komplementäre DNA-Sequenz lautete 5'-d(AGT GAT CTA C) für den antiparallelen Komplex und 5'(CATCTAGTGA) für den parallelen Komplex. [c] Das Rückgrat enthält an der T_x-Position das von der angegebenen Aminosäure abgeleitete Monomer. [d] Nicht bestimmt. [e] T_m -Erhöhung/-Erniedrigung pro eingeführtem chiralen Monomer (antiparallele Orientierung) in K. [f] C-terminale Aminosäure.

trometrie charakterisiert^[27]. Zudem wurde die thermische Stabilität der Komplexe aus PNA-Oligomeren und komplementärer DNA oder RNA gemessen (Tabelle 2).

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Glycin-Moleküle eines PNA-Rückgrats unter nur geringfügigen Stabilitätseinbußen durch chirale Aminosäuren ausgetauscht werden können; teilweise wird eine verstärkte Hybridisierung beobachtet. D-Aminosäuren fügen sich besser in das Rückgrat eines PNA-DNA-Doppelstranges ein, wie es schon für PNAs, die Alanin enthalten, beobachtet wurde^[17] (vgl. L- mit D-Lysin und L- mit D-Serin, Tabelle 2). Negativ geladene Seitenketten im Rückgrat (z.B. bei Glutamin- oder Asparaginsäure) verschlechtern die Hybridisierungseigenschaften, während positiv geladene die Hybridisierung von PNAs mit DNAs begünstigen: So wurde eine T_m -Steigerung von ca. 1 K pro Lysin-Einheit beobachtet. Eine ähnliche Steigerung wurde bei Oligonucleotiden, die sich von Aminoalkylphosphaten ableiten, gefunden^[28, 29]. Bei der Hybridisierung von PNAs mit RNAs ergaben sich ähnliche thermische Stabilitäten, doch war hier ein Trend zu einer größeren relativen Destabilisierung durch die Einführung von Substituenten in die PNAs zu beobachten. So konnte in diesem Fall keine T_m -Änderung nach Einführung des D-Lysin-Monomers festgestellt werden.

Ähnlich den Glycin-PNAs^[5] zeigen die hier getesteten PNAs deutliche Bindungspräferenzen: Sie binden besser an antiparallele als an parallele DNA.

Wir haben auch den Einfluß einer einzelnen falschen Basenpaarung (T_{PNA} -G_{DNA/RNA}) in der Mitte des Doppelstranges untersucht (Tabelle 3). Es zeigte sich, daß PNAs, die eine chirale

Aminosäure enthalten, falsche Basenpaarungen besser erkennen können als Glycin-PNAs. Da die Sequenzselektivität sowohl für die D- als auch für die L-Derivate größer zu sein scheint als für Glycin, dürfte der Grund für die größere Selektivität in den sperrigen Substituenten in der α -Position zu suchen sein, die es dem Rückgrat erschweren, die notwendige Konformation einzunehmen, um falsch gepaarte Basen in der Helix unterzubringen. Interessanterweise weist die PNA, die D-Lysin-Monomere enthält, eine hohe Sequenzspezifität auf ($\Delta T_m = -19$ K), die annähernd mit der der PNA, die D-Glutaminsäure enthält, übereinstimmt ($\Delta T_m = -20$ K). Die elektrostatische Anziehung zwischen dem anionischen DNA-Strang und der kationischen PNA scheint die Spezifität der Basenpaarung somit nicht zu beeinflussen.

Allgemein wurde beobachtet, daß purinreiche PNAs eine geringere Wasserlöslichkeit aufweisen als PNAs mit gemischten Purin-Pyrimidin-Sequenzen. Um zu untersuchen, ob Ladungen im PNA-Rückgrat eine erhöhte Löslichkeit zur Folge haben, wurde das Dodecamer (H-AGAGTGAGTGAG-NH₂)PNA aus T-Monomeren mit dem ursprünglichen Glycin- oder einem D-Lysin-Baustein synthetisiert und eine gesättigte Lösung der PNA in 140 mM KCl, 10 mM Natriumphosphat bei pH 7.0 und 37 °C hergestellt. Während bei der Glycin-PNA nur eine Konzentration von 40 mM erreicht werden konnte, war es bei der D-Lysin-PNA eine fünfmal höhere Konzentration (200 mM). Eine noch höhere Wirkung auf die Löslichkeit ist somit zu erwarten, wenn das PNA-Rückgrat noch mehr Lysin-Monomere enthält.

Wir haben gezeigt, daß PNAs mit chiral funktionalisiertem Rückgrat ihre Hybridisierungseigenschaften bezogen auf DNA und RNA beibehalten. Dies sollte Möglichkeiten eröffnen, PNAs mit bestimmten physikalischen und chemischen Eigenschaften gezielt herzustellen (was mit Oligonucleotiden noch nicht erreicht werden konnte), z.B. für den pharmakokinetischen Bereich und die Synthese von PNA-Konjugaten. Beispielsweise können sowohl amphiphile als auch amphiphatische PNAs relativ leicht erhalten werden. PNAs mit funktionalisierten Aminosäuren stellen formal Chimäre zwischen Proteinen und Nucleinsäuren dar, da sie die Funktionalitäten beider aufweisen. Die Monomere könnten außerdem Anwendung in der kombinatorischen Chemie auf Amidbasis finden^[30].

Experimentelles

Das Vorgehen wird anhand der Synthese des von L-Serin abgeleiteten Monomers **4b** beschrieben.

1b: Zu einer Lösung von L-BocSer(Obn)OH (5.00 g, 16.93 mmol) in wasserfreiem DMF (60 mL) wurde unter Röhren Cs₂CO₃ (5.52 g, 16.94 mmol) gegeben. Nach 15 min wurde Allylbromid (4.10 g, 33.88 mmol) zugefügt und die Mischung weitere 45 min gerührt. Die anorganischen Salze wurden abfiltriert, das DMF im Vakuum

Tabelle 3. Schmelztemperaturen T_m [°C] von PNA-DNA- und PNA-RNA-Doppelsträngen mit einer falschen Basenpaarung [a, b].

| Rückgrat [c] | [f] | T_m (DNA) | ΔT_m (DNA) [e] | T_m (RNA) | ΔT_m (RNA) [e] |
|--------------|--------------------|-------------|------------------------|-------------|------------------------|
| Glycin | LysNH ₂ | 37 | -15 | 46 | -9 |
| L-Lysin | LysNH ₂ | 35 | -14 | 40 | -11 |
| D-Lysin | LysNH ₂ | 36 | -19 | 43 | -12 |
| D-Glutamin- | NH ₂ | 28 | -20 | [d] | [d] |
| säure | | | | | |
| L-Isoleucin | LysNH ₂ | 28 | -16 | 36 | -10 |
| D-Serin | NH ₂ | 33 | -17 | 43 | -9 |

[a] Wäßriger Puffer aus 100 mM NaCl, 10 mM Phosphat, 0.1 mM EDTA, pH 7.0, Aufheizgeschwindigkeit 1 K min⁻¹, UV-Absorption gemessen bei 254 nm. [b] Die PNA-Sequenz lautete H-GT_xA GAT_xCAC T_x-R (R = NH₂ oder L-LysNH₂). Die komplementäre DNA-Sequenz mit einer falschen Basenpaarung lautete 5'-d(AGT GGT CTA C) (antiparallele Orientierung). [c] Das Rückgrat enthält an der T_x-Position das von der angegebenen Aminosäure abgeleitete Monomer. [d] Nicht bestimmt. [e] T_m -Erhöhung/-Erniedrigung für den PNA-DNA-Doppelstrang (antiparallele Orientierung) in K. ΔT_m für den entsprechenden DNA-DNA-Doppelstrang mit Fehlpaarung: 10 K. [f] C-terminale Aminosäure.

entfernt und der Rückstand zwischen Ethylacetat und gesättigter NaHCO_3 -Lösung verteilt. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit Ethylacetat ausgeschüttet; die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (Na_2SO_4). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der gelbliche Rückstand in Benzol (50 mL) gelöst und mit pTSA · H_2O (3.33 g, 17.5 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 1 h unter Rückfluß gekocht, das Volumen auf 10 mL eingeeignet und die Kristallisation durch langsame Zugabe von Diethylether eingeleitet. Nach Abfiltrieren des Feststoffs und Umkristallisation aus Methanol/Diethylether wurden 5.68 g (82%) farblose Kristalle erhalten (**1b** · pTSA). – Schmp.: 81–82 °C; $[\eta]_D^{20} = -4.8$ ($c = 5$ in MeOH); $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}, 400$ MHz, DMSO): $\delta = 8.59$ (br. s, 3 H), 7.43 (m, 5 H), 7.57, 7.26 (ABq, $J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, 4 H), 5.97 (m, 1 H), 5.44 (m, 1 H), 5.34 (dm, $J_{\text{cis}} = 10.5$, $J_{\text{gem}} = 1.5$ Hz, 1 H), 4.78 (m, 2 H), 4.66, 4.57 (ABq, $J_{\text{AB}} = 12.3$ Hz, 2 H), 4.52 (t, $J = 3.5$ Hz, 1 H), 3.96 (dd, $J = 10.6$, 3.9 Hz, 1 H), 2.37 (s, 3 H); $^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 167.37, 137.67, 137.27, 131.61, 128.29, 128.05, 127.76, 127.70, 118.48, 72.51, 67.30, 66.10, 52.58, 20.82$; C,H-N-Analyse für $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_5\text{S}$: ber. C 58.95, H 6.18, N 3.36; gef. C 58.70, H 6.17, N 3.44.

2b: Eine Lösung von **1b** (4.50 g, 11.04 mmol), das durch mehrfache Extraktion einer **1b**-NaHCO₃-Lösung mit CH₂Cl₂ von pTSA-Salzen befreit worden war, in Methanol (40 mL, auf 0 °C vorgekühlt) wurde mit Boc-Aminoacetaldehyd (2.14 g, 13.28 mmol) versetzt. Die Mischung wurde 30 min bei 0 °C gerührt, danach mit Essigsäure (0.75 mL) und Natriumcyanoborhydrid (0.37 g, 5.89 mmol) versetzt. Nach 30 min wurde das Methanol im Vakuum entfernt und das erhaltene Öl in Ethylacetat (200 mL) aufgenommen. Nach Waschen mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (100 mL) und NaCl-Lösung (100 mL) wurde die organische Phase getrocknet (Na₂SO₄) und das Lösungsmittel abgezogen. Eine Lösung des erhaltenen farblosen Öls in Ether (80 mL) wurde auf –20 °C gekühlt und mit einer äquivalenten Menge wasserfreier ethischer HCl (1.5 M) versetzt. Nach Zugabe von 80 mL wasserfreiem Hexan wurde das Hydrochlorid durch Filtration abgetrennt. Die Kristallisation aus Methanol/Diethylether/Hexan lieferte 3.72 g (91 %) farblose Kristalle (**2b** · HCl). – Schmp.: 120–121 °C; $[\alpha]_D^{20} = -11.1$ (*c* = 5 in MeOH); ¹H-NMR (D_6DMSO): $\delta = 10.22$ (br. s, 1H), 9.60 (br. s, 1H), 7.40 (m, 5H), 7.21 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 5.96 (m, 1H), 5.43 (dm, *J*_{trans} = 17.2, *J*_{gem} = 1.5 Hz, 1H), 5.32 (dm, *J*_{cis} = 10.6, *J*_{gem} = 1.5 Hz, 1H), 4.78 (m, 2H), 4.68, 4.56 (ABq, *J*_{A,B} = 12.0 Hz, 2H), 4.59 (m, 1H), 4.20 (dd, *J* = 10.8, 2.8 Hz, 1H), 4.00 (dd, *J* = 10.8, 3.1 Hz, 1H), 3.42 (m, 2H), 3.14 (m, 2H), 1.46 (s, 9H); ¹³C-NMR (D_6DMSO): $\delta = 166.78, 155.77, 137.26, 131.58, 128.29, 127.76, 127.73, 118.55, 78.30, 72.50, 66.33, 66.20, 58.96, 46.21, 36.38, 28.21$; Elementaranalyse für $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{Cl}_2\text{O}_5$: ber. C 57.89, H 7.53, N 6.75, Cl 8.54; gef. C 57.61, H 7.64, N 6.60, Cl 8.7.

3b: Zu einer Lösung von DhbtOH (2.20 g, 13.5 mmol) und Thymin-1-ylessigsäure (2.48 g, 13.5 mmol) in 40 mL DMF wurde DCC (2.92 g, 14.2 mmol) unter Rühren gegeben. Nach 1 h wurden **2b** · HCl (2.50 g, 6.74 mmol) und DIENA (0.88 g, 6.8 mmol) zugefügt. Die Reaktion wurde bis zum vollständigen Umsatz bei 40 °C gehalten (etwa 15 h). Das DMF wurde im Vakuum entfernt, der gelbe Rückstand in Ethylacetat (120 mL) aufgenommen und der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Die organische Phase wurde nacheinander mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (100 mL), halbgesättigter KHSO₄-Lösung (100 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde ein gelblicher Schaum erhalten, der an Kieselgel (Ethylacetat/Hexan, 2/1) chromatographiert wurde. Das Produkt wurde zur weiteren Reinigung in Ethylacetat (5 mL) gelöst, mit Diethylether (100 mL) versetzt und ca. 12 h gerührt. Es wurden 2.04 g (58%) analysenreines Produkt erhalten. $[\alpha]_D^{20} = -5.2$ (*c* = 3 in MeOH); ¹H-NMR ([D₆]DMSO) (nur für das Hauptisomer): δ = 11.35 (s, 1 H), 7.41 (m, 6 H), 6.90 (m, 1 H), 5.94 (m, 2 H), 5.36 (dd, *J* = 17.3, 1.5 Hz, 1 H), 5.26 (dd, *J* = 10.5, 1.5 Hz, 1 H), 4.68 (m, 6 H), 1.83 (br. s, 3 H), 1.47 (s, 9 H); ¹³C-NMR ([D₆]DMSO): δ = 168.27, 167.43, 164.32, 155.69, 150.92, 142.00, 137.96, 132.25, 128.26, 127.50, 117.69, 108.06, 78.06, 72.21, 67.43, 65.03, 59.76, 47.85, 46.79, 28.19, 11.91; Elementaranalyse für C₂₇H₃₆N₄O₆: ber. C 59.55, H 6.66, N 10.29; gef. C 59.40, H 6.65, N 10.29.

4b: Eine Lösung des Esters **3b** (0.50 g, 0.92 mmol) und von Morpholin (0.80 mL, 9.2 mmol) in THF (9 mL) wurde mit [Pd(PPh₃)₄] (10.6 mg, 0.09 mmol) versetzt. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der resultierende Schaum in Ethylacetat (30 mL) aufgenommen und mit gesättigter NaCl-Lösung, die mit KHSO₄-Lösung auf pH 3 eingestellt war, gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat ausgeschüttelt (6 × 15 mL), und die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Entfernen des Lösungsmittels wurde der gelbliche Schaum in Ethylacetat aufgenommen und das Produkt durch langsame Zugabe von Hexan ausgefällt. Nach Abfiltrieren und Trocknen im Hochvakuum wurden 0.386 g (83 %) weißer Feststoff erhalten. $-[\alpha]_D^{20} = -35.3 (c = 3 \text{ in MeOH})$; ¹H-NMR (D_6DMSO): $\delta = 11.28$ (s, 1H), 7.41 (m, 6H), 6.85 (m, 1H), 4.66–4.49 (m, 4H), 3.85 (m, 2H), 1.75 (br. s, 3H), 1.38 (s, 9H); ¹³C-NMR (D_6DMSO): $\delta = 167.98, 166.93, 164.39, 155.63, 151.04, 142.09, 138.47, 132.04, 131.54, 128.25, 127.49, 107.94, 77.80, 71.92, 68.14, 61.71, 48.45, 38.19, 28.30, 11.91$; hochauflöstes FAB-MS: m/z für C₁₄H₃₃N₄O₈: ber. 505.2298; gef. 505.2324.

- [1] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497.

[2] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895.

[3] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9677.

[4] M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 800.

[5] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Nordén, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566.

[6] S. C. Brown, S. A. Thomson, J. M. Veal, D. G. Davis, *Science* **1994**, *265*, 777.

[7] D. Y. Cherny, B. P. Belotserkovskii, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, R. H. Berg, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1993**, *90*, 1667.

[8] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *J. Mol. Recognit.* **1994**, *7*, 165.

[9] V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310.

[10] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt in *Antisense Research and Development* (Hrsg.: S. Crooke, B. Lebleu), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **1993**, S. 363.

[11] J. C. Hanvey, N. J. Peffer, J. E. Bisi, S. A. Thomson, R. Cadilla, J. A. Josey, D. J. Ricca, C. F. Hassman, M. A. Bonham, K. G. Au, S. G. Carter, D. A. Bruckenstein, A. L. Boyd, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Science* **1992**, *258*, 1481.

[12] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *Gene* **1994**, *149*, 139.

[13] M. A. Bonham, S. Brown, A. L. Boyd, P. H. Brown, D. A. Bruckenstein, J. C. Hanvey, S. A. Thomsen, A. Pipe, F. Hassman, J. E. Bisi, B. C. Froehler, M. D. Matteucci, R. W. Wagner, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1197.

[14] P. E. Nielsen, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 167.

[15] A. DeMesmaeker, K.-M. Altman, A. Waldner, S. Wendeborn, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 343.

[16] B. Hyrup, M. Egholm, P. E. Nielsen, P. Wittung, B. Nordén, B. O. Buchardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7964.

[17] K. L. Dueholm, K. H. Petersen, D. K. Jensen, M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *Biomed. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1077.

[18] L. Kosylnina, W. Wang, T. C. Liang, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5173.

[19] M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nature Struct. Biol.* **1996**, *3*, 410.

[20] Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Bz = Benzyl, cHex = Cyclohexyl, 2-CIZ = (2-Chlorobenzyl)oxycarbonyl, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, DhbtOH = 2,3-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin, DIEA = Diisopropyl-ethylamin, DMF = Dimethylformamid, MBHA = Methylbenzhydrylamin, pTSA = *para*-Toluolsulfonsäure.

[21] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. H. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5767.

[22] Die Enantiomerenreinheit der L-Ser- (**2b**), L-Glu- (**2e**) und L-Lys-Monomere (**2f**) wurde wie folgt bestimmt: Das Monomer wurde zunächst an racemischen L-Isoleucin-, dann an optisch reinen L-Isoleucinmethylester gekoppelt. Laut HPLC-Analyse der Produkte war die optische Reinheit >90%.

[23] S. Friedrich-Bochntsche, H. T. Waldmann, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 751.

[24] J. P. Tam, W. F. Heath, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5242.

[25] Folgende Nomenklatur wurde verwendet: In H-ACGT-(Lys)NH₂ steht H für den freien N-Terminus, A, C, G und T stehen für N-Acetyl-, N-C-Acetyl-, N-G-Acetyl bzw. N-T-Acetyl-N-(2-aminoethyl)glycin-Einheiten.

[26] L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. M. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Pep. Sci.* **1995**, *3*, 175.

[27] FAB-MS-Analyse: ber. (gef.) L-Ile 3021.4 (3023.7), L-Ser 2943.2 (2945.2), D-Ser 2943.2 (2945.3), D-Glu 2941.2 (2942.4), L-Lys 2937.3 (2938.5), D-Lys 3066.4 (3068.7).

[28] R. L. Letsinger, C. N. Singman, G. Hinstand, M. Salunkhe, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4470.

[29] R. Fathi, Q. Huang, G. Coppola, W. Delany, R. Teasdale, A. M. Krieg, A. F. Cook, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5416.

[30] P. E. Nielsen, *Methods Enzymol.* **1996**, *267*, 426.

Eingegangen am 1. September 1995,
ergänzte Fassung am 20. Mai 1996 [Z 8359]

Stichworte: DNA-Hybridisierung · Peptidnucleinsäuren