

- [8] **4a**:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , 25 °C, TMS):  $\delta = 1.31$  (d, 12H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.0$  Hz;  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.55 (s, 3H;  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.58 (s, 3H;  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.88 (s, 6H;  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 4.04 (sept, 2H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.0$  Hz;  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 5.48 (s, 2H;  $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 5.53 (s, 2H;  $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 6.18 (s, 4H;  $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 6.96 (t, 1H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.5$  Hz,  $p\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 7.09 (d, 2H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.5$  Hz,  $m\text{-C}_6\text{H}_3$ ).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$  (100.4 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , 25 °C, TMS):  $\delta = 24.4$  ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 25.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.1 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 36.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 54.2 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 90.9, 106.7, 112.5, 114.0 ( $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 122.9 ( $m\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 123.8 ( $p\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 142.8 ( $ipso\text{-C}_5\text{H}_4$ ), 143.2 ( $o\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 152.6 ( $ipso\text{-C}_6\text{H}_3$ ). – **4b**:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , 70 °C, TMS):  $\delta = 1.32$  (d, 12H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.3$  Hz;  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.49 (s, 3H;  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.58 (s, 3H;  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.93 (s, 6H;  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.99 (sept, 2H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.0$  Hz;  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 5.01 (s, 2H;  $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 5.51 (m, 2H;  $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 6.08 (m, 2H;  $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 6.28 (m, 2H;  $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 6.91 (t, 1H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.6$  Hz,  $p\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 7.15 (d, 2H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8.0$  Hz,  $m\text{-C}_6\text{H}_3$ ).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$  (100.4 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , 70 °C, TMS):  $\delta = 24.4$  ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 25.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.1 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 29.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 36.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 53.3 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 89.4, 108.3, 113.2, 116.1 ( $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 122.4 ( $m\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 123.1 ( $p\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 143.7 ( $o\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 145.3 ( $ipso\text{-C}_5\text{H}_4$ ), 152.2 ( $ipso\text{-C}_6\text{H}_3$ ).
- [9] Einkristalle von **4a** wurden aus *n*-Heptan bei – 30 °C erhalten.  $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{Nb}$ ,  $M_r = 482.51$ , orangefarbene Rauten ( $0.39 \times 0.38 \times 0.31$  mm<sup>3</sup>); monoklin, Raumgruppe  $P2_1/n$  (Nr. 14),  $a = 1000.3(1)$ ,  $b = 2186.1(1)$ ,  $c = 1153.1(1)$  pm,  $\beta = 95.29(1)^\circ$ ,  $V = 2510.8(4) \times 10^6$  pm<sup>3</sup>;  $Z = 4$ ;  $\rho_{\text{ber.}} = 1.276$  g cm<sup>-3</sup>;  $F_{000} = 1016$ ;  $\mu = 4.9$  cm<sup>-1</sup>. – IPDS (STOE & CYE.), Mo $\text{K}_\alpha$ -Strahlung,  $\lambda = 71.073$  pm; Oszillation; 2.5 min pro Image. Bei  $T = -50$  °C wurden 18328 Intensitäten gesammelt. Nach LP-Korrektur verblieben 4322 ( $R_{\text{int}} = 0.0215(F_\sigma^2)$ ) unabhängige Reflexe. Die Struktur wurde durch Kombination von Direkten Methoden und Differenz-Fourier-Synthesen gelöst (STRUX-V, SIR-92, SHELXS-93, volle Matrix). Verfeinert wurden alle Schweratome mit anisotropen, alle H-Atome mit isotropen Auslenkungsparametern; Konvergenz bei  $R1 = \Sigma(|F_o| - |F_c|)/\Sigma|F_o| = 0.0295$ ,  $wR2 = [\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2/\Sigma w(F_o^2)^2]^{1/2} = 0.0649$  [ $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0.0476 P)^2 + 0.14 P$ , mit  $P = (F_o^2 + 2 F_c^2)/3$ ],  $GOE = 1.072$  für alle 4322 Reflexe [ $\chi^2 = 0.0$  ( $I$ ) und 419 Variable. Eine abschließende Differenz-Fourier-Synthese blieb ohne Auffälligkeiten (minimale/maximale Restelektronendichte =  $+0.30/-0.38$  e Å<sup>-3</sup>). – Weitere Einzelheiten zu den Kristallstrukturuntersuchungen können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter Angabe der Hinterlegungsnummern CSD-405082 (**2a**) und CSD-405083 (**4a**) angefordert werden.
- [10] **5a**:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , 25 °C, TMS):  $\delta = 1.00$  (s, 3H;  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.32 (s, 3H;  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.33 (d, 12H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.0$  Hz;  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.89 (sept, 2H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.0$  Hz;  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 5.51 (pseudo q, 2H;  $J(\text{H}, \text{H}) = 2$  Hz;  $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 5.85 (pseudo q, 2H;  $J(\text{H}, \text{H}) = 2$  Hz;  $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 6.03 (pseudo q, 2H;  $J(\text{H}, \text{H}) = 3$  Hz;  $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 6.30 (pseudo q, 2H;  $J(\text{H}, \text{H}) = 3$  Hz;  $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 6.85 (t, 1H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.5$  Hz,  $p\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 7.06 (d, 2H;  $^3J(\text{H}, \text{H}) = 7.5$  Hz,  $m\text{-C}_6\text{H}_3$ ).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$  (100.4 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , 25 °C, TMS):  $\delta = 22.1$  ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 27.7 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 36.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 95.4, 105.7, 115.4, 118.3 ( $\text{C}_5\text{H}_4$ ), 122.6 ( $m\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 123.1 ( $p\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 139.8 ( $ipso\text{-C}_5\text{H}_4$ ), 140.9 ( $o\text{-C}_6\text{H}_3$ ), 154.5 ( $ipso\text{-C}_6\text{H}_3$ ). – **5b**: triklin, Raumgruppe  $P\bar{1}$  (Nr. 2),  $a = 951.4(1)$ ,  $b = 1071.9(1)$ ,  $c = 1138.5(1)$  pm,  $\alpha = 76.44(1)^\circ$ ,  $\beta = 83.16(1)^\circ$ ,  $\gamma = 80.36(1)^\circ$ . – Detaillierte Beschreibung der Synthese und Strukturchemie: W. A. Herrmann, W. Baratta, E. Herdtweck, *Organometallics* **1996**, im Druck.
- [11] a) A. D. Jenkins, M. F. Lappert, R. C. Srivastava, *J. Organomet. Chem.* **1970**, 23, 165; b) J. S. Basi, D. C. Bradley, M. H. Chisholm, *J. Chem. Soc. A* **1971**, 1433.

## Erhöhung der Stabilität von DNA-Tripelhelices bei neutralem pH durch Verwendung von Oligonucleotiden mit einem basischeren Desoxycytidin-Analogon\*\*

Stefan Hildbrand und Christian Leumann\*

Die sequenzspezifische Erkennung doppelsträngiger DNA durch modifizierte Oligonucleotide ist von großer Bedeutung im Hinblick auf die selektive Steuerung der Genexpression<sup>[1]</sup>. Die Bildung stabiler Tripelhelices durch Oligonucleotide im Py-Pu:Py-Motiv<sup>[2]</sup> ist jedoch bei neutralem pH limitiert, weil die

Cytidineinheiten im dritten Strang protoniert sein müssen; der  $pK_a$ -Wert von freiem Desoxycytidin beträgt aber nur 4.3. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurden in der letzten Zeit hauptsächlich (Desoxy)ribonucleoside mit ungeladenen Basen entwickelt, die das gleiche (isomorphe) H-Brücken-Bindungsmuster aufweisen wie  $\text{N}^3$ -protoniertes Cytosin. Beispiele solcher Basen sind Pseudoisocytosin<sup>[3]</sup>, die „Base  $\text{P}^{+}$ “<sup>[4]</sup>, 4-Amino-5-methyl-2,6-[1*H*,3*H*]-pyrimidion<sup>[5]</sup>, 8-Oxo-adenin<sup>[6]</sup> und sein  $\text{N}^6$ -Methyl-Derivat<sup>[7]</sup>,  $\text{N}^7$ -Desoxyguanin<sup>[8]</sup> und die Base „Pyrazin-ADD“<sup>[9]</sup>.

Der Ersatz des Cytidin-Nucleosids durch ein Analogon, das idealerweise bei neutralem pH vollständig protoniert wäre, böte eine Alternative, um die Affinität von Oligonucleotiden bei physiologischem pH zu erhöhen. Eine geringe Erhöhung der Basizität kann bereits durch den Austausch des Furanose-Rings durch den entsprechenden Carbocyclus erreicht werden. So ist carbocyclisches 5-Methyldesoxycytidin um 0.45  $pK_a$ -Einheiten basischer als 5-Methyldesoxycytidin<sup>[10]</sup>. Oligonucleotide, die dieses Analogon enthalten, haben eine im Vergleich zu 5-Methyldesoxycytidin erhöhte Triplexstabilität von 3.9 K pro Substitution. Ein anderer offensichtlicher Weg, um die Basizität zu erhöhen, wäre der Ersatz von Cytosin durch einen leichter protonierbaren aromatischen Heterocyclus. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich 6-Amino-2'-*O*-methylcytidin ( $pK_a = 6.8$ ) hergestellt und in Oligonucleotide eingebaut; deren Paarungseigenschaften mit doppelsträngiger DNA wurden untersucht<sup>[11]</sup>. Daß in diesem Fall jedoch keine stabilen Tripelhelices beobachtet werden konnten, kann wahrscheinlich auf eine ungünstige Konformation um die nucleosidische Bindung in diesem 2,6-substituierten Pyrimidin-Nucleosid zurückgeführt werden.

Unserem Entwurf eines leichter protonierbaren Cytosin-Analogons liegt die Idee zugrunde, daß durch den Austausch des Stickstoffatoms  $\text{N}^1$  des Pyrimidin-Rings durch ein Kohlenstoffatom und das Entfernen der 2-Oxo-Funktion ein basischeres Pyridin-Derivat mit dem für die Triplexbildung relevanten H-Brücken-Bindungsmuster resultiert. Die Anwendbarkeit dieses Konzepts schien durch die bereits früher bestimmte unterschiedliche Basizität von 4-Aminopyrimidin ( $pK_a = 5.71$ ) und 2-Aminopyridin ( $pK_a = 6.86$ ) bestätigt zu werden<sup>[12]</sup>. In dieser Arbeit berichten wir über die Synthese der C-Nucleoside **5** und **7**, über den Einbau von **7** in Oligonucleotide und über deren Paarungseigenschaften mit doppelsträngiger DNA. Zwar wurde kürzlich eine alternative Synthese von **7** beschrieben<sup>[13]</sup>, die Idee aber, **7** als protoniertes Cytidin-Äquivalent in Oligonucleotide einzubauen, ist neu.

Unsere Synthese der C-Nucleoside **5** und **7** (Abb. 1) startete von dem leicht zugänglichen 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-D-ribono-1,4-lacton **3**<sup>[14]</sup> und dem kommerziell erhältlichen 2-Amino-5-brompyridin **1** und wurde gemäß den Arbeiten zur Synthese von C-Glycosiden von Krohn et al.<sup>[15]</sup> und Kraus et al.<sup>[16]</sup> durchgeführt. Schützen der Aminofunktion von **1** mit 1,2-Bis(chlordimethylsilyl)ethan lieferte Verbindung **2**, die sich für die Kuppelung mit dem Lacton **3** als geeignet erwies. Brom-Lithium-Austausch in **2** mit *n*BuLi bei – 75 °C lieferte das Nucleophil, das in situ mit dem Lacton **3** umgesetzt wurde. Reduktion der resultierenden Halbacetale mit  $\text{Et}_3\text{SiH}/\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  ergab **4** (nur das  $\beta$ -Anomer wurde erhalten), das nach Debenzylierung mit  $\text{BBr}_3$  das Ribonucleosid **5** als Hydrobromid lieferte. Das entsprechende N-geschützte 2'-Desoxynucleosid **6** wurde ausgehend von **4** in fünf Stufen (Benzoylierung der exocyclischen Aminogruppe, Debenzylierung, selektives Schützen der 3'- und 5'-Hydroxygruppen, Abspaltung der 2'-Hydroxygruppe nach Barton und Desilylierung) erhalten. Verbindung **6** wurde dann entweder nach Standardverfahren in den Phosphoramidit-Baustein **8**<sup>[17]</sup> oder durch Behandlung mit 40proz. wäßriger

[\*] Prof. C. Leumann, Dipl.-Chem. S. Hildbrand  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Freiestrasse 3, CH-3012 Bern (Schweiz)  
Telefax: Int. + 31/631-3422

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und von der Ciba-Geigy AG, Basel, unterstützt.

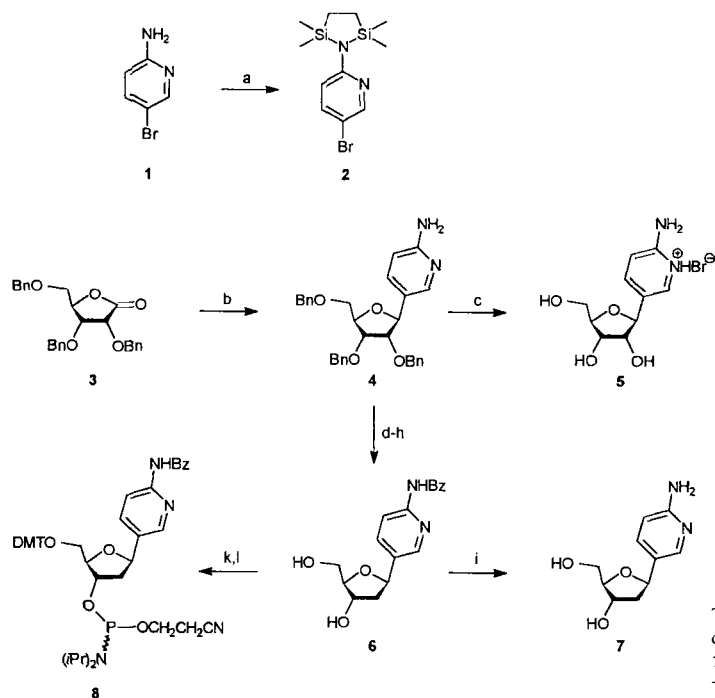


Abb. 1. a)  $n\text{BuLi}$  (2 Äquiv.),  $\text{Cl}(\text{Me})_2\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{Me})_2\text{Cl}$  (1 Äquiv.), THF,  $-75^\circ\text{C}$ , 2.5 h, 68%; b) **2** (1.8 Äquiv.),  $n\text{BuLi}$  (1.7 Äquiv.), THF,  $-75^\circ\text{C}$ , 3 h,  $-75^\circ\text{C} \rightarrow 0^\circ\text{C}$ , 4 h, dann  $\text{Et}_3\text{SiH}$  (5 Äquiv.),  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (5 Äquiv.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-75^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 12 h, 64%; c) 0.15 M  $\text{BBr}_3$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-75^\circ\text{C}$ , 3 h, 71%; d)  $\text{BzCl}$  (1.3 Äquiv.), Pyridin,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Raumtemp., 24 h, dann 0.4 M  $\text{BBr}_3$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-75^\circ\text{C}$ , 4 h, 70%; e)  $\text{Cl}(\text{iPr})_2\text{Si}_2\text{O}$  (1.2 Äquiv.), Pyridin, Raumtemp., 5 h, 75%; f)  $p\text{-TolOC}(\text{S})\text{Cl}$  (1.6 Äquiv.), 4-Dimethylaminopyridin (2.2 Äquiv.),  $\text{CH}_3\text{CN}$ , Raumtemp., 25 h, 81%; g) Azobisisobutyronitril (0.1 Äquiv.),  $n\text{Bu}_3\text{SnH}$  (2 Äquiv.), Toluol,  $80^\circ\text{C}$ , 4 h, 84%; h) Tetra- $n$ -butylammoniumfluorid (Äquiv.), THF, Raumtemp., 1.5 h, 86%; i) 40proz.  $\text{MeNH}_2$ ,  $70^\circ\text{C}$ , 25 h, 83%; k) Chlorbis(4-methoxyphenyl)phenylmethan (1.2 Äquiv.), Pyridin, Raumtemp., 3.5 h, 84%; l)  $(\text{NCCCH}_2\text{CH}_2\text{O}) (\text{iPr}_2\text{N})\text{PCl}$  (1.5 Äquiv.),  $\text{Et}(\text{iPr})_2\text{N}$  (3 Äquiv.), THF, Raumtemp., 2 h, 81%.

$\text{CH}_3\text{NH}_2$  in das freie 2'-Desoxynucleosid **7** überführt. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Daten von **7** gleichen den veröffentlichten Werten<sup>[13]</sup>.

Wir bestimmten die  $\text{pK}_a$ -Werte der Cytidin-Analoga **5** und **7** zu 6.15 bzw. 6.26<sup>[18]</sup>. Diese Werte sind zwar um ca. 0.6  $\text{pK}_a$ -Einheiten niedriger als der Wert für 2-Aminopyridin, aber, und das ist viel wichtiger, um ca. 2  $\text{pK}_a$ -Einheiten höher als der von natürlichem Cytidin. Die geringfügige Differenz der Basizität zwischen **5** und **7** (0.1  $\text{pK}_a$ -Einheiten) ist nicht überraschend und bestätigt nur die Tatsache, daß die An- oder Abwesenheit einer Hydroxygruppe am C-2' des Furanose-Rings einen vernachlässigbaren Einfluß auf den  $\text{pK}_a$ -Wert dieser C-Nucleoside ausübt.

Mit dem Baustein **8** wurden an der Festphase nach der Phosphoramiditmethode die beiden Oligonucleotide **10** und **11** (Abb. 2) hergestellt<sup>[19]</sup>. Die Kupplungsausbeuten wurden mit Trityl-Assays ermittelt und lagen bei 95% pro Kupplung. Die

Target-Duplex (21mer)  
5'-d (GCTAAAAAGAGAGAGATCG)  
3'-d (CGATTTTCTCTCTCTCTAGC)

**9** 5'-d (TTTTTCTCTCTCTCT)  
**10** 5'-d (TTTTTCTXTCTCTCT)  
**11** 5'-d (TTTTTXXTXXTXXT)  
**12** 5'-d (TTTTT<sup>Me</sup>CT<sup>Me</sup>CT<sup>Me</sup>CT<sup>Me</sup>CT<sup>Me</sup>CT)

Abb. 2. Sequenzen des 21mer-DNA-Duplexes und der Oligonucleotide **9–12** für die Triplexbildung (X = 7; <sup>Me</sup>C = 5-Methyldeoxycytidin).

Oligomere wurden mit 25proz.  $\text{NH}_3$  ( $55^\circ\text{C}$ , 12 h), gefolgt von 40proz. wäßrigem  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  ( $70^\circ\text{C}$ , 26 h) von der Festphase abgespalten und entschützt. Es zeigte sich, daß die Behandlung mit Methylamin wegen der Unempfindlichkeit der Benzoylschutzgruppe in **6** gegenüber  $\text{NH}_3$  absolut notwendig war. Die so erhaltenen Oligonucleotide wurden durch DEAE-Anionenaustauschchromatographie (DEAE = Diethylaminoethyl) gereinigt, ihre Reinheit wurde durch Umkehrphasen-HPLC überprüft und anschließend wurden sie mit matrixassistierte Laserdesorptionsionisations-Flugzeit (MALDI-TOF)-Massenspektrometrie analysiert<sup>[20]</sup>. Die Oligonucleotide **9** und **12** wurden zu Vergleichszwecken hergestellt.

Die Bindung der Oligonucleotide **9–12** an doppelsträngige DNA wurde mit UV-Schmelzkurven in einem pH-Intervall von 6.0–8.0 und Salzkonzentrationen von 200 mM und 1 M NaCl ermittelt. Die Schmelzübergänge ( $T_m$ ) für die Dissoziation des dritten Stranges **9–12** vom gewählten 21-mer-Duplex (Abb. 2) sind in Tabelle 1 und repräsentative Schmelzkurven (pH 7.5, 200 mM NaCl) in Abbildung 3 aufgeführt<sup>[21]</sup>. Das Oligomer **11**,

Tabelle 1.  $T_m$ -Werte [ $^\circ\text{C}$ ] und Hyperchromie [%] (in Klammern) der Dissoziation des dritten Stranges **9–12** aus UV-Schmelzkurven ( $\lambda = 260$  nm). Triplex-Konzentration 1.5–1.7  $\mu\text{M}$  in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Strang	200 mM NaCl [a]				1 M NaCl [b]			
	pH 6.0	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0
<b>9</b>	42.5 (10)	20.3 (3)	9.8 (2)	<4	42.9 (10)	20.7 (8)	13.0 (6)	4.0 (3)
<b>10</b>	44.3 (9)	25.7 (3)	15.3 (2)	7.8 (1)	47.2 (10)	26.3 (7)	16.4 (6)	8.0 (4)
<b>11</b>	50.3 (11)	39.0 (6)	31.3 (4)	23.1 (3)	[c]	43.4 (5)	33.2 (4)	28.5 (5)
<b>12</b>	53.3 (12)	31.5 (5)	20.1 (2)	12.2 (1)	55.1 (11)	31.4 (7)	21.2 (6)	12.5 (5)

[a]  $T_m$  des Target-Duplexes:  $61 \pm 1^\circ\text{C}$ . [b]  $T_m$  des Target-Duplexes:  $69 \pm 1^\circ\text{C}$ . [c] Nur ein  $T_m$ -Wert für Triplex- und Duplex-Schmelzen ( $69.4^\circ\text{C}$ ) wurde beobachtet.

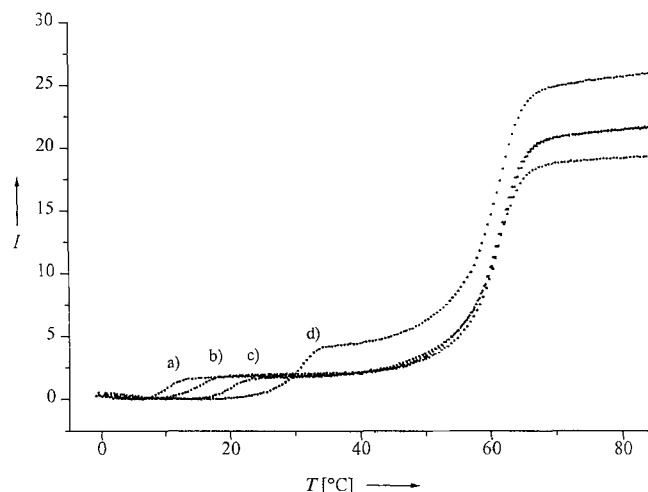


Abb. 3. UV-Schmelzkurven ( $\lambda = 260$  nm) von **9** (a), **10** (b), **11** (c) und **12** (d) mit Duplex-DNA ( $T_m$  des Duplexes  $61 \pm 1^\circ\text{C}$ ); I = Hyperchromie; Bedingungen: 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM NaCl, pH 7.5; Triplex-Konzentration 1.5–1.7  $\mu\text{M}$ .

in dem alle Cytosinbasen durch 2-Aminopyridine ersetzt wurden, weist viel höhere  $T_m$ -Werte auf als **9** (enthält die natürliche Base Cytosin) und **12** (enthält 5-Methylcytosin). Die Stabilitäts-erhöhung ist bei pH > 7.0 am ausgeprägtesten. So bewirkt bereits der Austausch eines Desoxycytidins eine starke Stabilisierung, wie aus den Bindungswerten von **10** ersichtlich wird. Die durchschnittliche Erhöhung von  $T_m$  pro Base bei pH 7.5 ist 4.3 K im Vergleich zu Cytosin und 2.2 K im Vergleich zu 5-Methylcytosin. Interessanterweise hat der Austausch nur einer

Base, wie in **10**, einen größeren Effekt auf die Triplexstabilität als vom durchschnittlichen Wert erwartet würde.

Die Resultate zeigen deutlich, daß das C-Nucleosid **7** aufgrund seiner im Vergleich zu natürlichem Cytidin erhöhten Basicität ein ausgezeichnetes Cytidin-Ersatz für die Erkennung von doppelsträngiger DNA bei physiologischem pH im Py-Pu:Py-Motiv ist. Das Fehlen der 2-Oxo-Funktion im Vergleich zu Cytosin hat also keinen Einfluß auf die Bindung des dritten Stranges in der großen Furche der DNA. Dies ermöglicht es nun, die Positionen 2 und 5 (nach Cytosin-Nomenklatur) von **7** zu modifizieren, um den  $pK_a$  weiter zu erhöhen, die Stapelungseigenschaften zu optimieren oder um chemische Funktionseinheiten anzuhängen.

Eingegangen am 9. April 1996 [Z 9009]

**Stichworte:** DNA · Cytidin-Analoga · C-Nucleoside · Oligonucleotide · Tripelhelices

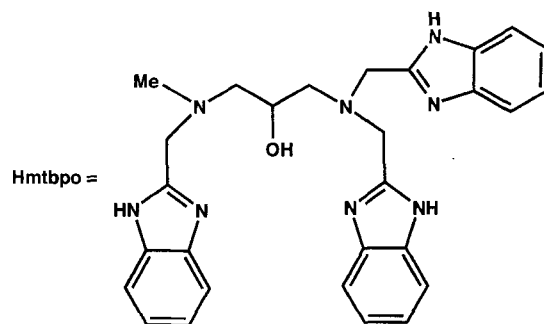
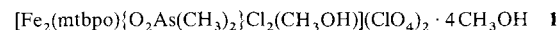
## Ein unsymmetrischer zweikerniger Eisen(III)-Komplex mit Peroxidase-Eigenschaften\*\*

Burkhard Eulerling, Michael Schmidt, Ulrich Pinkernell, Uwe Karst und Bernt Krebs\*

Professor Hans Georg von Schnering zum 65. Geburtstag gewidmet

Zur Herstellung von zweikernigen Eisenkomplexen als Modellverbindungen für Metalloproteine werden häufig siebenzählige Liganden verwendet, die zwei Metallzentren koordinieren können (dinucleating ligands). Um die entsprechenden aktiven Zentren möglichst genau nachzubilden, werden unsymmetrische Liganden benötigt. Die Kristallisation entsprechender unsymmetrischer Eisenkomplexe hat sich als äußerst schwierig erwiesen, und bisher wurden lediglich zwei Beispiele mit  $\mu$ -Phenoxoliganden beschrieben. Latour et al. gelang die Synthese eines unsymmetrischen  $Fe^{III}Fe^{III}$ -Komplexes mit terminaler Phenolatokoordination als Modell für violette saure Phosphatase<sup>[1]</sup> sowie die Herstellung eines Semimet-Hämerythrin-Analogons<sup>[2]</sup>. Wir berichten hier über die Synthese und die röntgenographische Charakterisierung des ersten unsymmetrischen  $\mu$ -Alkoxo-verbrückten zweikernigen Eisenkomplexes sowie über dessen Peroxidase-Aktivität.

Durch die Umsetzung des unsymmetrischen sechszähligen Chelatliganden *N*-Methyl-*N,N',N'*-tris(2-benzimidazolylmethyl)-2-hydroxy-1,3-diaminopropan (Hmtbpo)<sup>[3]</sup> mit äquimolaren Mengen an  $Fe(ClO_4)_3 \cdot 9H_2O$ ,  $FeCl_3$  und  $NaO_2As(CH_3)_2 \cdot 3H_2O$  in Methanol gelang die Synthese der Verbindung **1**.



Wie die Röntgenstrukturanalyse ergab<sup>[4]</sup> (Abb. 1), werden die Metallzentren der komplexen Kationen in **1** durch eine Dime-thylarsinato-*O,O'*-Brücke sowie durch das deprotonierte Alko-xo-Sauerstoffatom O1 verknüpft. Somit liegt ein ( $\mu$ -Alkoxo)-( $\mu$ -dimethylarsinato)dieisen(III)-Zentrum vor, das vor kurzem auch bei einem Komplex mit dem symmetrischen, siebenzähligen Chelatliganden *N,N,N',N'*-Tetrakis(2-benzimidazolylmethyl)-2-hydroxy-1,3-diaminopropan (Htbpo) beschrieben wurde<sup>[5]</sup>. Der Komplex **1** ist hinsichtlich seiner Struktur eine Modellverbindung für das aktive Zentrum des Arsenato-Inhibi-tor-Komplexes der  $Fe^{III}Fe^{III}$ -Form der violetten sauren Phos-phatase aus Schweineuterus (Uteroferrin), da sowohl die Art

[\*] Prof. Dr. B. Krebs, Dr. B. Eulerling, Dipl.-Chem. M. Schmidt  
Anorganisch-chemisches Institut der Universität  
Wilhelm-Klemm-Straße 8, D-48149 Münster  
Telefax: Int + 251/838366  
E-mail: krebs@uni-muenster.de

Dipl.-Chem. U. Pinkernell, Dr. U. Karst  
Lehrstuhl für Analytische Chemie der Universität Münster

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

- [1] N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 697–723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *33*, 666–690.
- [2] G. Felsenfeld, D. R. Davies, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2023–2024; H. E. Moser, P. M. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645–650; J.-C. François, T. Saison-Behmoaras, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11431–11440.
- [3] A. Ono, P. O. P. Ts'o, L.-S. Kan, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4032–4033; A. Ono, P. O. P. Ts'o, L.-S. Kan, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3225–3230.
- [4] J. S. Koh, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1470–1478; E. S. Priestley, P. B. Dervan, *ibid.* **1995**, *117*, 4761–4765.
- [5] a) G. Xiang, W. Soussou, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11155–11156; b) R. Berressem, J. W. Engels, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3465–3472; c) G. Xiang, R. Bogacki, L. W. McLaughlin, *ibid.* **1996**, *24*, 1963–1970.
- [6] P. S. Miller, P. Bhan, C. D. Cushman, T. L. Trapane, *Biochemistry* **1992**, *31*, 6788–6793; M. C. Jetter, F. W. Hobbs, *ibid.* **1993**, *32*, 3249–3254; E. C. Davison, K. Johnson, *Nucleosides Nucleotides* **1993**, *12*, 237–243.
- [7] S. L. Young, S. H. Krawczyk, M. D. Matteucci, J. J. Toole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10023–10026; S. H. Krawczyk, J. F. Milligan, S. Wadwani, C. Moulds, B. C. Froehler, M. D. Matteucci, *ibid.* **1992**, *89*, 3761–3764.
- [8] J. Hunziker, E. S. Priestley, H. Brunar, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2661–2662.
- [9] U. von Krosigk, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5361–5362.
- [10] B. C. Froehler, D. J. Ricca, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8320–8322.
- [11] J. S. Pudlo, S. Wadwani, J. F. Milligan, M. D. Matteucci, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1025–1028.
- [12] A. Albert, R. Goldacre, J. Phillips, *J. Chem. Soc.* **1948**, 2240–2249.
- [13] H.-P. Hsieh, L. W. McLaughlin, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5356–5359.
- [14] W. Timpe, K. Dax, N. Wolf, H. Weidmann, *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 53–60.
- [15] K. Krohn, H. Heins, K. Wielckens, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 511–517.
- [16] G. A. Kraus, M. T. Molina, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 752–753.
- [17] <sup>1</sup>H- und <sup>31</sup>P-NMR-Daten von **8** (Diastereomergemisch): <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.10 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 1.16–1.21 (m, 9H), 1.99–2.09 (m, 1H), 2.34 (dd,  $J$  = 13.0, 5.1 Hz, 0.5H), 2.44 (dd,  $J$  = 13.0, 4.9 Hz, 0.5H), 2.46 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 1H), 2.62 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 1H), 3.23–3.36 (m, 2H), 3.54–3.67 (m, 2H), 3.67–3.90 (m, 2H), 3.784, 3.786, 3.789, 3.792 (4s, 6H), 4.22–4.29 (m, 1H), 4.51–4.58 (m, 1H), 5.14–5.19 (m, 1H), 6.80–6.85 (m, 4H), 7.18–7.24 (m, 1H), 7.26–7.31 (m, 2H), 7.33–7.37 (m, 4H), 7.44–7.52 (m, 4H), 7.54–7.59 (m, 1H), 7.78–7.82 (m, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 8.29–8.32 (m, 1H), 8.359, 8.364 (2d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.71, 8.72 (2s, NH); <sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (PPh<sub>3</sub> = 0) = 154.00, 154.12.
- [18] Die  $pK_a$ -Werte wurden durch Titration mit 0.1 M NaOH und 0.1 M HCl in H<sub>2</sub>O bei 25 °C ermittelt. Wir danken der analytischen Abteilung der Ciba-Geigy für die Durchführung dieser Messungen.
- [19] Die Oligonucleotidsynthesen wurden mit einem DNA-Synthesizer (Pharmacia Gene Assembler Special) in 1.3  $\mu$ mol-Ansätzen durchgeführt. Die einzige Änderung im Vergleich zum Syntheseprotokoll für natürliche Oligomere war die Verlängerung der Kupplungszeit (6 min). Die Synthesen wurden im Trityl-off-mode durchgeführt.
- [20] Anionenaustausch-HPLC der Oligomeren **10** und **11**: Säule: Nucleogen DEAE 60-7 (Macherey & Nagel), Mobile Phase A: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3.9, in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN 4:1; B: A + 1 M NaCl; Gradient: 35–65% B in 35 min (55 °C), Fluß: 1 mL min<sup>-1</sup>; **10**:  $t_R$  = 17.9 min; **11**:  $t_R$  = 11.5 min; MALDI-TOF-MS ( $m/z$ ): **10**: berechnet (monoanionische Form) 4407.9; gefunden 4407.9; **11**: berechnet (monoanionische Form) 4340.0; gefunden 4340.4.
- [21] Die Schmelzkurven wurden durch aufeinanderfolgendes Heizen, Kühlen und Heizen mit einem linearen Gradienten (1 K min<sup>-1</sup>) aufgenommen. Während sich die Aufheizkurven jeweils überlagerten, zeigte der Abkühlvorgang für die Übergänge bei tieferer Temperatur (Dissoziation des dritten Stranges **9–12**) immer leichte Hysterese.