

Diese Ergebnisse sind in Einklang mit einer Struktur, in der die Silicateinheiten in den zentralen Bereichen der Schichten liegen und die endständigen Cyanbiphenylgruppen zu einem gewissen Grad überlappen^[5,9]. Somit kann die smektische Hochtemperaturphase als S_{Ad}-Phase klassifiziert werden.

Die Klärpunkte der Verbindungen liegen niedriger als die vergleichbarer linearer Siloxane mit mesogenen Seitengruppen ähnlicher Struktur^[10]. Substanzen mit analogen tetraedrischen oder cyclischen Siloxanzentraleinheiten haben hingegen ähnliche Klärpunkte und höhere Glaspunkte; ihre Polymorphie ist jedoch geringer^[1,5,9,11]. Mit den hier erhaltenen Ergebnissen lassen sich die Octasilsesquioxane zwischen linearen Polymeren und kleineren, tetrameren und cyclischen Systemen einordnen. Dies ist insofern nicht erstaunlich, da Octasilsesquioxane als verzwilligte Tetraeder oder doppelte viergliedrige Ringe betrachtet werden können.

Experimentelles

Die zur Untersuchung der Strukturen und der Reinheit der Substanzen sowie zur Bestimmung des Verhaltens der Mesophasen angewandten Methoden und verwendeten Geräte wurden bereits beschrieben^[5].

- 1: Eine 10proz. wäßrige Lösung von Tetramethylammoniumsilicat (4.7 g, 0.05 mol) wurde zu einer Lösung von Heptan (100 mL), Dimethylformamid (200 mL) und Chlordimethylsilan (100 mL) gegeben, die zuvor 20 min lang gerührt wurde. Nach der leicht exothermen Reaktion wurde langsam auf 4 °C gekühlt; anschließend wurde 1 L Wasser mit einer Temperatur von 4 °C langsam zugegeben. Die organische Phase wurde von der wäßrigen Phase getrennt und so lange mit Wasser gewaschen, bis sie säurefrei war. Die organische Phase wurde unter verminderndem Druck eingeengt und auf 4 °C gekühlt, um die Ausfällung von 1 als weißen Festkörper zu beschleunigen. Das Produkt konnte nach Umkristallisieren aus Aceton in einer Ausbeute von 1.48 g (73.8%) erhalten werden. Spektroskopische Daten: IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2960 (C-H), 2142 (Si-H); ¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃, TMS). δ = 4.7 (s, 1 H, Si-H), 0.2 (s, 6 H, Si-CH₃); ²⁹Si-NMR (53.5 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 0.5 (H-Si-CH₃), -108.8 (Si-O₄).
- 2: Eine Lösung aus Toluol (20 mL), 4-Cyan-4'-(5-hexenoxy)biphenyl (0.55 g, 1.58 mmol) und 10 μ L einer 3.0–3.5proz. Lösung von Karstdts Katalysator in Xylool wurde vorbereitet und vorsichtig 20 s belüftet. Dazu wurde bei Raumtemperatur eine Lösung von 1 (0.1 g, 0.098 mmol) in wasserfreiem Toluol (10 mL) tropfenweise innerhalb von 1 h gegeben. Einige Minuten nach der vollständigen Zugabe konnte im IR-Spektrum keine Si-H-Bande (2142 cm⁻¹) mehr beobachtet werden. Eine Spatelspitze Triphenylphosphoran wurde zugesetzt, um den Katalysator in den weniger reaktiven Triphenylphosphankomplex zu überführen. Die Lösung wurde unter verminderndem Druck eingeengt; das oligomere Produkt wurde durch Ausfällen in Methanol isoliert, durch Filtrieren abgetrennt und durch mehrfaches Ausfällen aus Methanol so lange gereinigt, bis chromatographisch keine Monomere mehr nachgewiesen werden konnten. Rekrystallisation aus Pentan/Dichlormethan ergab 2 in einer Ausbeute von 0.31 g (85%). Spektroskopische Daten: IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3020 (Ar-H), 2940 (C-H), 2220 (C=N), 1600 (Ar), 860 (C-H) cm⁻¹; ¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 7.65 (m, 4 H, Ar-H), 7.52 (m, 2 H, Ar-H), 6.95 (m, 2 H, Ar-H), 3.93 (t, 2 H, Ar-O-CH₂), 1.75 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂), 1.45 (m, 6 H, CH₂-CH₂-CH₂), 0.62 (t, 2 H, t, CH₂-Si), 0.14 (s, 6 H, (CH₃)₂Si); ¹³C-NMR (67.8 MHz, CDCl₃): δ = 0.01 (CH₃Si), 18.14 (CH₂-Si), 23.49, 26.31, 24.78, 33.75, (CH₂-CH₂-CH₂), 110.82 (Ar, C4', C-CN), 115.19 (Ar, C3, C5), 126.89, 128.48 (Ar, C2, C6, C2', C6'), 131.56 (Ar, C1), 132.49 (Ar, C3', C5'), 144.71 (Ar, C1'), 160.11 (Ar, C4, O-C), 118.87 (CN); ²⁹Si-NMR (53.5 MHz, CDCl₃, TMS): δ = 12.34 (Si-CH₃), -108.8 (Si-O₄).

Eingegangen am 22. April 1996 [Z 9060]

Stichworte: Flüssigkristalle · Mesophasen · Siliciumverbindungen

- [1] F.-H. Kreuzer, D. Andrejewski, W. Haas, N. Häberle, G. Riepl, P. Spes, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1991**, *199*, 345, zit. Lit.; R. D. C. Richards, W. D. Hawthorne, J. S. Hill, M. S. White, D. Lacey, J. A. Semlyn, G. W. Gray, T. C. Kendrick, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 95.
- [2] T. J. Bunning, H. E. Klei, E. T. Samulski, R. L. Crane, R. J. Linville, *Liq. Cryst.* **1991**, *10*, 445; B. Hahn, V. Percec, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1988**, *157*, 125; M. Schellhorn, G. Lattermann, *Liq. Cryst.* **1994**, *17*, 529.
- [3] R. Eidschink, F.-H. Kreuzer, W. H. de Jeu, *Liq. Cryst.* **1990**, *8*, 879.
- [4] A. Sellinger, R. M. Laine, V. Chu, C. Viney, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1994**, *32*, 3069, zit. Lit.
- [5] G. H. Mehl, J. W. Goodby, *Chem. Ber.* **1996**, *129*, 521, zit. Lit.
- [6] F. H. Kreuzer, R. Maurer, P. Spes, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1991**, *50*, 215, zit. Lit.

- [7] a) D. Hoebbel, W. Wieker, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1971**, *384*, 43; D. Hoebbel, G. Garzo, G. Engelhardt, E. Lippma, M. Alla, *ibid.* **1980**, *465*, 15; D. Hoebbel, I. Pitsch, W. Hiller, S. Schelm (Akademie der Wissenschaften der DDR), EP 0348705, **1990**; *Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 125354b; b) R. Weidner, N. Zeller, B. Deubzer, V. Frey (Wacker Chemie) EP 0367222, **1990**; *Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 116465m; c) M. Moran, C. M. Casado, I. Cuadro, J. Losada, *Organometallics*, **1993**, *12*, 4327.
- [8] B. D. Karstedt (General Electrics), US-Pat. (US-PS 3.814.730), **1974**; *Chem. Abstr.* **1974**, *80*, 16134j.
- [9] B. J. Ostrovskij, *Liq. Cryst.*, **1993**, *14*, 131.
- [10] V. Percec, C. Pugh in *Side Chain Liquid Crystals* (Hrsg.: C. B. McArdle), Blackie, London, **1989**.
- [11] H. Coles, E. A. Corselli, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1955**, *261*, 71; M. Ibn-Elhaj, A. Skovlios, D. Gouillon, J. Newton, P. Hodge, H. J. Coles, *Liq. Cryst.* **1995**, *19*, 373.

Synthese und Eigenschaften von PNA/DNA-Chimären **

Eugen Uhlmann*, David W. Will, Gerhard Breipohl, Dietrich Langner und Antonina Ryte

Synthetische Oligonukleotide spielen eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl molekularbiologischer Techniken, in denen sie als Linker, Primer oder Gen-Sonden breite Anwendung finden^[1–3]. In jüngster Zeit ist jedoch ihre Bedeutung zur möglichen therapeutischen Nutzung in Form von Antisense- oder Antigene-Oligonukleotiden in den Vordergrund getreten^[4–7]. Damit Oligonukleotide in vivo die gewünschte biologische Aktivität entfalten können, müssen sie einerseits stabil sein gegenüber den Nucleasen im Serum und im Zellinneren, andererseits müssen sie zur Zellaufnahme befähigt sein, um intrazellulär in sequenzspezifischer Weise an die Zielnucleinsäuren zu binden. Aus der großen Vielfalt chemischer Modifikationen von Oligonukleotiden^[4,8] nehmen nichtionische Oligonukleotid-Analoga^[9] eine Sonderstellung ein, da man von ihnen neben einer erhöhten Stabilität gegenüber Nucleasen vor allem eine verbesserte Bindungsaffinität aufgrund der reduzierten Ladungsabstoßung erwarten darf. Besonderes Interesse gilt dabei den Polyamid-Nucleinsäuren (PNAs), da diese mit höherer Affinität an komplementäre DNA und RNA binden als die natürlichen Oligonukleotide^[10–13].

PNAs sind Nucleinsäure-Mimetika, in denen das gesamte Zucker-Phosphat-Gerüst durch ein Rückgrat aus *N*-(2-Aminoethyl)glycin ersetzt ist. Obwohl PNAs in ihrer Bindung an komplementäre Nucleinsäuren prinzipiell den Watson-Crick-Basenpaarungs-Regeln gehorchen, haben sie gegenüber den natürlichen Nucleinsäuren den Nachteil, daß sie nicht in eindeutiger Orientierung binden, sondern sowohl antiparallele wie auch parallele Duplexe bilden können^[13]. Neben ihrer Tendenz zur Selbstdaggregation besteht ein weiteres Problem hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit als Antisense-Oligonukleotide darin, daß sie, wenn überhaupt, nur in sehr geringer Menge ins Zellinnere aufgenommen werden^[12]. Hier berichten wir über eine Methode zur vollautomatischen Synthese von PNA/DNA-Chimären (Abb. 1), die alle vier natürlichen Nucleobasen enthalten. Es

[*] Dr. E. Uhlmann, Dr. D. W. Will, Dr. G. Breipohl, D. Langner, Dr. A. Ryte Hoechst AG, Zentrale Pharma Forschung G 838
D-65926 Frankfurt am Main
Telefax: Int. +69/30589713
E-mail: Uhlmann@MSMRD.Frankfurt.Hoechst-AG.d400.de

[**] Wir danken Silvia Hein, Lothar Hornung, Norbert Laub, Michael Reiter, Gerd Schluckebier und Sabine Schülke für ihre Hilfe bei den experimentellen Arbeiten sowie Dr. A. Schäfer und Dr. W. Fehlhaber für die Aufnahme der Massenspektren.

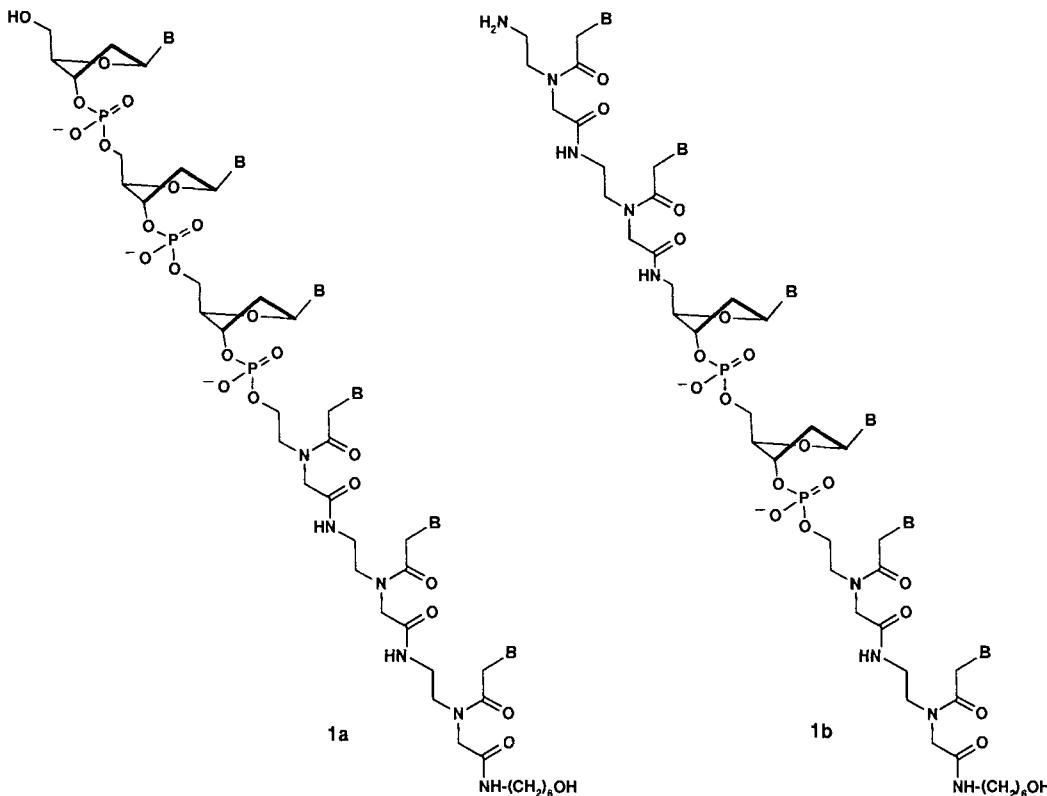
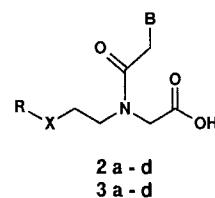


Abb. 1. Strukturformeln der DNA-PNA-Chimären **1a** und der PNA-DNA-PNA-Chimären **1b**. Im Chimären **1a** bildet der DNA-Teil den 5'-Terminus des Oligomers. B = Nucleobase-Rest.

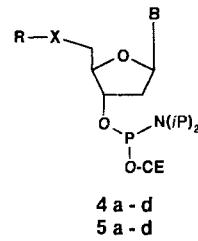
wird gezeigt, daß diese PNA/DNA-Chimären nur in der bevorzugten antiparallelen Orientierung an komplementäre DNA und RNA binden. Aufgrund der negativen Ladungen im DNA-Teil werden die Neigung zur Aggregation und die damit verbundene Schwerlöslichkeit positiv beeinflußt.

Die Synthese von PNA/DNA-Chimären sollte idealerweise in beliebiger Sequenz (DNA-PNA oder PNA-DNA; Leserichtung ist in Analogie zur reinen DNA von 5' nach 3') „on-line“ am Synthesearautomaten unter Beibehaltung der kommerziell erhältlichen DNA-Bausteine möglich sein. Bisher wurde nur über solche Synthesen von PNA/DNA-Chimären berichtet, in denen der DNA-Anteil ausschließlich aus den säurestabilen Pyrimidin-Nucleosiden bestand^[14–16], wobei in einem Fall zusätzlich speziell geschützte DNA-Bausteine erforderlich waren^[14]. Die Bindungsaaffinität der PNA-DNA-Chimären^[14] und der DNA-Homo-PNA-Chimären^[15] war in diesen Untersuchungen niedriger als die der entsprechenden DNA-Analoga. Erst kürzlich haben wir über die Synthese von reinen PNAs mit neuen PNA-Monomerbausteinen berichtet^[17], in denen die gegen schwache Säuren labile Monomethoxytrityl-Gruppe (Mmt) als temporärer Schutz für die Aminofunktion des Aminoethylglycins dient, während die Aminofunktionen der Nucleobasen mit basenlabilen Acylschutzgruppen versehen sind. Diese orthogonale Schutzgruppen-Strategie ist prädestiniert für eine Kombination mit der Phosphoramidit-Synthese von Oligonukleotiden nach Caruthers^[18].

Zur Herstellung der DNA-PNA-Chimären **1a**, die 5'-terminal mit DNA beginnen und mit PNA am (Pseudo-) 3'-Terminus enden, wird zunächst wie beschrieben^[17] der PNA-Teil mit den PNA-Monomerbausteinen **2a–d** (Abb. 2) an CPG (controlled pore glass) als Träger aufgebaut. Durch Anknüpfung des Übergangsbausteins **3a–d**, der sich von *N*-(2-Hydroxyethyl)glycin ableitet, eröffnet sich die Möglichkeit der Reaktion mit entsprechenden Nucleoside-Phosphoramiditen **4a–d**. Mit einem erweiterten DNA-Synthesizer (Firma Eppendorf-Biotronik GmbH,



B: **a:** T, **b:** 4-N-Anisoyl-C,
c: 6-N-Anisoyl-A,
d: 2-N-Isobutyryl-G



B: **a:** T, **b:** 4-N-Benzoyl-C,
c: 6-N-Benzoyl-A,
d: 2-N-Isobutyryl-G

Abb. 2. Struktur des Bausteins für die PNA-Synthese (**2a–d**) und die DNA-Synthese (**4a–d**), sowie die Übergangsbausteine PNA → DNA (**3a–d**) und der Übergangsbaustein DNA → PNA (**5a–d**).

GmbH, Maintal) mit insgesamt zehn Positionen für Monomerbausteine konnten erstmals vollautomatisch die DNA-PNA-Chimären **6–9** (Abb. 3) hergestellt werden, die alle vier Nucleobasen im PNA-Teil sowie im DNA-Teil enthalten. Die 5'-terminale Dimethoxytrityl-Schutzgruppe wird noch am Synthesizer abgespalten, gefolgt von der Ammoniakbehandlung zur Ablösung des Produkts vom Träger und Entfernung der basenlabilen Phosphat- und aller Aminoschutzgruppen der Nucleobasen. Da das eingesetzte CPG mit einem basenlabilen 6-Aminohexylsuccinat-Linker^[17] derivatisiert ist, fallen die DNA-PNA-Chimären in Form der terminalen Hydroxyhexylamide an. Die DNA-

PNA/DNA-Chimär	PNA-Anteil
6 5'-ACATCATggtcg-h	50%
7 5'-ATGacggaata-h	72%
8 5'-GGGACCATggcagcc-h	53%
9 5'-CGCGAAttcgcg-h	50%
10 (5')Ac-ctcttcTTTtcttc-h	76%
11 5'-TTTTTZttttt-h	50%

Komplementäre Sequenzen und Referenz-Sequenzen:

12 5'-ACATCATGGTCG-3'	21 5'-CGTCCATGATGT-3'
13 (5')-acatcatggtcg-h	22 5'-TATTCGGTCAT-3'
14 5'-ACATCATGGTCG-3'	23 5'-GGCTGCCATGGTCCC-3'
15 5'-CGACCATGATGT-3'	24 5'-TTTTTTTTTTT-3'
16 5'-TGTAGTACCAAGC-3'	25 5'-GAGAACG-3'
17 5'-r (CGACCATGATGT)-3'	26 5'-CTCTCTTTTTCTCTCTC-3'
18 5'-r (TGTAGTACCAAGC)-3'	27 5'-GGGACCATGGCAGCC-3'
19 5'-CGACCATGATGT-3'	28 5'-ATGACGGAATA-3'
20 5'-CGACCTTGATGT-3'	29 5'-CCGAAATTCCGCC

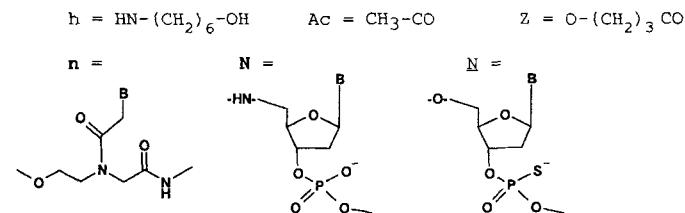


Abb. 3. Sequenzen der im Text diskutierten Oligomere. Nucleotid-Einheiten sind in Großbuchstaben, PNA-Einheiten in Kleinbuchstaben dargestellt.

PNA-Chimären **6–9** sind gut wasserlöslich und können durch Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gelen oder mit Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) auf Ionenaustauscher-Säulen gereinigt werden. Zur Synthese des PNA-DNA-PNA-Chimären **10** wird zunächst der DNA-PNA-Teil wie zuvor für **6–9** beschrieben aufgebaut. Als Übergangsbaustein zum 5'-terminalen PNA-Teil (Abb. 1, Struktur **1b**) wird ein 5'-*N*-Monomethoxytrityl-5'-amino-2',5'-dideoxynucleosid-3'-*O*-phosphoramidit **5a–d** gekuppelt, an dessen Aminofunktion nach Detritylierung mit Trichloressigsäure der PNA-Teil synthetisiert wird. Alle neuen Verbindungen **6–11** wurden mit Elektrospray-Massenspektrometrie charakterisiert.

Zur Ermittlung der Bindungsaffinität der DNA-PNA-Chimären an komplementäre Nucleinsäuren wurde die Schmelztemperatur T_m der Duplexe bestimmt. Abbildung 4 zeigt die Schmelzkurven des chimären (DNA-PNA) · DNA-Duplexes **6·15** (Abb. 4A) im Vergleich zum DNA · DNA-Duplex **12·15** (Abb. 4B) und PNA · DNA-Duplex **13·15** (Abb. 4D). Der T_m -Wert des PNA · DNA-Duplexes liegt mit 59 °C am höchsten, aber auch der chimäre (DNA-PNA) · DNA-Duplex mit einem T_m -Wert von 53 °C zeigt eine deutlich erhöhte Stabilität im Vergleich zum natürlichen DNA · DNA-Duplex ($T_m = 48$ °C). Während das reine PNA **12** mit **15** in antiparalleler ($T_m = 59$ °C) und mit **16** in paralleler Orientierung ($T_m = 48$ °C) bindet, geht das analoge DNA-PNA-Chimär **6** nur mit dem antiparallelen Oligonucleotid **15** eine Doppelstrangbildung ein; der parallele Duplex **6·16** dagegen ist bei Raumtemperatur nicht nachweisbar (Tabelle 1). Da für die Anwendung der DNA-PNA-Chimären als Antisense-Strukturen ihre Bindung an mRNA relevant ist, wurden die T_m -Werte der verschiedenen Oligomeren auch gegen komplementäre RNA-Sequenzen gemessen (Tabelle 1, Abb. 4C). Wiederum bildet das Oligomer **6**, das zu 50% aus

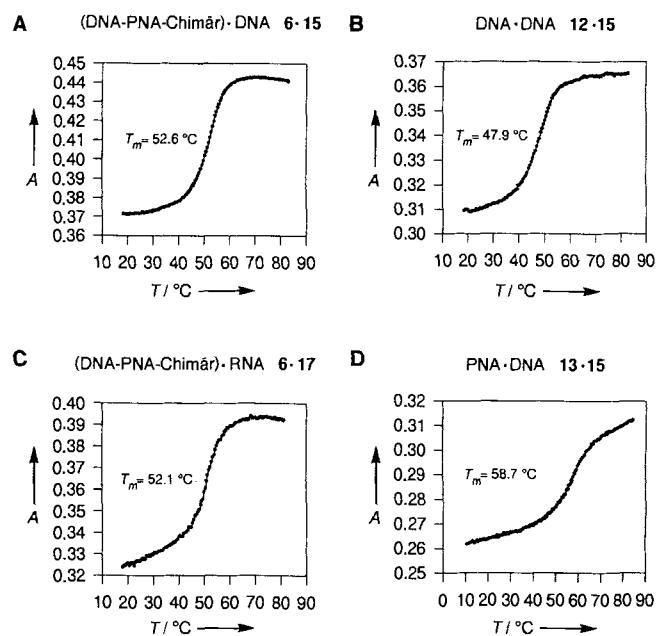


Abb. 4. Schmelzkurven der Duplexe aus dem DNA-PNA-Chimären **6** und der komplementären DNA **15** (A) oder RNA **17** (C) im Vergleich zu den Duplexen aus DNA **12** (B) oder PNA **13** (D) und der komplementären DNA **15**.

Tabelle 1. Vergleich der T_m -Werte [a] der Duplexe aus dem DNA-PNA-Chimären **6** und der komplementären DNA oder RNA mit den entsprechenden Duplexen, die DNA **12** oder PNA **13** enthalten.

Sequenz	Orientierung des Duplexes	T_m [°C] gegen DNA	T_m [°C] gegen RNA
15/17 5'-TGT AGT ACC AGC-5'	DNA/RNA [b]		
5'-ACA TCA tgg tgg-h	DNA-PNA	ap [c]	52.6
12 5'-ACA TCA TGG TGG-3'	DNA	ap	47.9
(5')aca tca tgg tgg-h	PNA	ap	58.7
14 5'-ACA TCA <u>TGG TGG</u>	DNA-(S-DNA)	ap	43.4
16/18 5'-TGT AGT ACC AGC-3'	DNA/RNA [b]		
5'-ACA TCA tgg tgg-h	DNA-PNA	p [d]	<25
(5')aca tca tgg tgg-h	PNA	p	47.6
			43.5

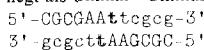
[a] Die T_m -Werte wurden unter physiologischen Bedingungen (140 mM KCl, 10 mM NaH_2PO_4 , 0.1 mM Na-EDTA, pH 7.4) in der Kühlphase von 85 °C nach 15 °C mit 0.5 K min^{-1} bei 260 nm gemessen. [b] Für RNA ist T = U. [c] ap = antiparalleler Duplex; [d] p = paralleler Duplex.

PNA besteht, einen deutlich stabileren antiparallelen Duplex als das DNA-Analogon ($\Delta T_m = 8$ K). Das reine PNA zeigt zwar in der antiparallelen Anordnung eine höhere Bindungsaffinität als das Chimär und das Oligodesoxynucleotid, bindet jedoch zusätzlich wieder an eine parallele komplementäre Sequenz. Da in biologischen Systemen bisher fast nur Oligonucleotid-Phosphorothioate untersucht wurden, galt unser Interesse einem Vergleich mit dem Phosphodiester-Phosphorothioat-Chimären **14**, bei dem die im DNA-PNA-Chimären analogen Basen als Phosphorothioat (S-DNA) vorliegen. Interessanterweise bildet das DNA-PNA-Chimär **6** mit der komplementären RNA **17** einen um etwa 10 K höher schmelzenden Duplex als das entsprechende DNA-(S-DNA)-Chimär **14**. Die Bindungsaffinität hängt im großen Maße vom Verhältnis PNA:DNA im Chimär ab. So schmilzt der Duplex des Undecamers **7**, bei dem 72 % des Oligomers als PNA vorliegen, um 14 K höher als der des entsprechenden DNA-Analogs **28** (Tabelle 2). Das Chimär **8** ist im DNA-Teil über Phosphorothioat-Brücken verknüpft und bindet ebenfalls besser an komplementäre DNA als das entspre-

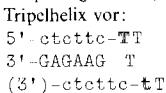
Tabelle 2. Vergleich der T_m -Werte der DNA/PNA-Chimären 7–10 in ihren Duplexen mit denen der korrespondierenden DNA-Oligomeren 26–29.

Chimär · DNA	T_m [°C]	DNA · DNA	T_m [°C]
7 · 22	53.5	28 · 22	39.9
8 · 23	68.4	27 · 23	64.6
9 · 9 [a]	67.5	29 · 29	54.5
10 · 25 [b]	64.6	26 · 25	27.3

[a] liegt als Chimär · Chimär-Duplex vor:



[b] bei pH 5 gemessen, liegt als



chende Oligonucleotid 27. Das selbstkomplementäre DNA-PNA-Chimäre 9, bei dem über den gesamten Duplex 9 · 9 die PNA- mit den DNA-Basen paaren, hat einen um 13 K höheren T_m -Wert als der DNA-analoge Duplex 29 · 29. Das PNA-DNA-PNA-Chimäre 10 ist so konzipiert, daß der carboxyterminale PNA-Teil (Pseudo-3'-Ende) über Watson-Crick-Basenpaarung an das komplementäre Hexamer 25 bindet, wobei der DNA-Teil als Schleifenstruktur zur Rückfaltung dient, um die Bindung des aminoterminalen zweiten PNA-Teils über Hoogsteen-Basenpaarung zu ermöglichen. Die im sauren Milieu resultierende Triplex-Struktur zeigt für einen Hexamer-Komplex einen erstaunlich hohen T_m -Wert von 65 °C im Vergleich zum DNA-Analogen, das bereits bei 27 °C schmilzt.

Um die Spezifität der Basenpaarung im PNA- und DNA-Teil des PNA-DNA-Chimären zu überprüfen, wurden die Schmelztemperaturen des DNA-PNA-Chimären 6, des DNA-Oligomers 12 und des PNA-Oligomers 13 gegen komplementäre DNA-Sequenzen mit jeweils einer Basen-Mißpaarung an drei unterschiedlichen Positionen gemessen. Eine Mißpaarung befindet sich im DNA-Teil, eine im PNA-Teil und eine direkt am DNA → PNA-Übergang. Wie aus Abbildung 5 ersichtlich, sind

12 (6, 13)	5'-A C A T C A T G G T C G-3'
15	3'-T G T A G T A C C A G C-5'
19	3'-T G T T G T A C C A G C-5'
20	3'-T G T A G T T C C A G C-5'
21	3'-T G T A G T A C C T G C-5'

Sequenz	19	20	21	ΔT_m [K]
6 PNA-DNA	10.1	6.8	11.0	
12 DNA	10.3	7.3	9.3	ΔT_m [K]
13 PNA	10.2	7.5	10.5	

Abb. 5. Vergleich der Änderung der T_m -Werte (ΔT_m [K]) der Duplexe aus dem DNA-PNA-Chimären 6, DNA 12 oder PNA 13 und dem komplementären DNA-Strang 15 mit den entsprechenden Duplexen, in denen im komplementären DNA-Strang 19–21 an drei unterschiedlichen Positionen Basen-Mißpaarungen (A → T) eingeführt wurden.

die destabilisierenden Effekte, die durch die Basenmißpaarung relativ zum Paarungskomplex mit DNA 15 verursacht werden, an den identischen Positionen für PNA und DNA annähernd gleich. Eine Basenmißpaarung am Übergang von DNA → PNA führt ebenfalls zu einer deutlichen Absenkung des T_m -Wertes. Dies spricht dafür, daß auch die Nucleobase des Übergangsbausteins kooperativ an der Bindung zur komplementären Nucleinsäure teilnimmt. Es können aber auch besser zugängliche Übergangsbausteine eingebaut werden, die allerdings nicht an

der Basenpaarung teilnehmen, beispielsweise der γ -Hydroxybuttersäure-Linker in Sequenz 11. Die Tatsache, daß der ΔT_m -Wert bei Einführung einer Basenmißpaarung für das DNA-PNA-Chimäre geringer ist als für die reinen PNA- oder DNA-Oligomere, könnte dafür sprechen, daß am Übergang von DNA → PNA eine geringfügige strukturelle Störung vorliegt.

Im Hinblick auf eine Anwendung der PNA/DNA-Chimären als Antisense- oder Antigene-Oligomere ist es unverzichtbar, daß diese Verbindungen in das Zellinnere gelangen. Daher wurde das DNA-PNA-Chimäre 11 am 5'-Ende des Oligonucleotid-Teils mit ^{35}S - γ -ATP radioaktiv markiert und seine Aufnahme bei Inkubation mit Verozellen bestimmt. Abbildung 6 zeigt, daß

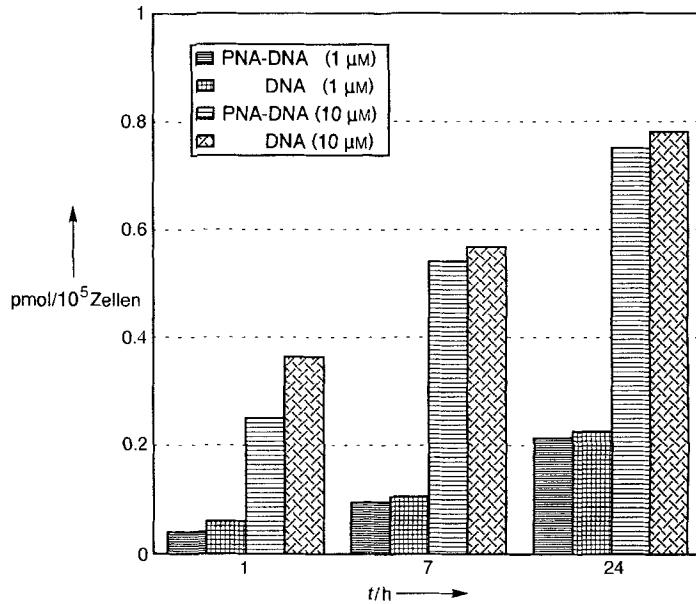


Abb. 6. Zelluläre Aufnahme des am 5'-Ende des Oligonucleotid-Teils mit ^{35}S - γ -ATP radioaktiv markierten DNA-PNA-Chimären 11 im Vergleich zum entsprechend markierten DNA-Oligomeren 24 bei 37 °C in Verozellen.

die zelluläre Aufnahme des DNA-PNA-Chimären, gemessen als zellassoziiertes Oligomer^[19], bei 1 μM und bei 10 μM extrazellulärer Oligomerkonzentration nahezu identisch ist mit der des entsprechenden Oligodesoxynukleotids 24. Erste Untersuchungen in Zellkultur zeigen, daß die DNA-PNA-Chimären als Antisense-Oligomere die Expression spezifischer Target-Gene selbst dann zu hemmen vermögen, wenn der DNA-Anteil nur 30% ausmacht. Von Bedeutung könnte dabei sein, daß die PNA-DNA-Chimären im Gegensatz zu den reinen PNAs im Duplex mit RNA die zelluläre RNase H aktivieren, wodurch wie im Falle eines DNA · RNA-Duplexes eine Spaltung der RNA induziert wird. RNase-H-aktivierende Oligonucleotid-Analoga sind im allgemeinen hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität solchen Derivaten überlegen, die dieses Enzym nicht aktivieren^[4, 5].

Wir haben eine allgemein anwendbare Methode zur automatischen Synthese von DNA/PNA-Chimären entwickelt, die kompatibel mit der Standard-Festphasen-Synthese von Oligonukleotiden ist und keine zusätzlichen Schritte bei der Entschützung der Oligomeren erfordert. Die Bindungsaffinität der DNA-PNA-Chimären ist höher als die ähnlicher DNA-Phosphorothioat-Chimärer oder natürlicher Oligonukleotide. Im Gegensatz zu den reinen PNAs binden die untersuchten DNA-PNA-Chimären unter physiologischen Bedingungen ausschließlich in der bevorzugten antiparallelen Orientierung. Die DNA-PNA-Chimären, in denen der PNA-Teil an das 3'-Ende der

DNA konjugiert ist, sind besonders stabil gegen 3'-Exonucleasen, die im Serum den Hauptanteil der Oligonucleotid-abbauenden Enzyme bilden. Da die DNA-PNA-Chimären von Zellen in ähnlichem Ausmaß wie Oligonucleotide aufgenommen werden, zudem weitgehend nucleaseresistent sind und eine gute Bindungsaffinität an komplementäre RNA haben, entsprechen sie den an Antisense-Wirkstrukturen gestellten Anforderungen.

Eingegangen am 15. Juli 1996 [Z 9333]

Stichworte: Antisense-Oligonucleotide · Helices · Nucleinsäuren

- [1] J. Engels, B. Sprunkel, E. Uhlmann in *Biotechnology*, Vol. 2 (Hrsg.: A. Pühler) VCH, Weinheim, 1993, S. 317.
- [2] U. Englisch, D. H. Gauss, *Angew. Chem.* 1991, 103, 629–646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 613–630.
- [3] E. Uhlmann in *Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology, ECB6*, (Hrsg.: L. Alberghina, L. Frontali, P. Sensi), Elsevier, Amsterdam, 1994, S. 667.
- [4] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* 1990, 90, 543–584.
- [5] E. Uhlmann, A. Peyman in *Molecular Biology and Biotechnology*, (Hrsg.: R. A. Meyers) VCH, Weinheim, 1995, S. 38.
- [6] N. T. Thuong, C. Helene, *Angew. Chem.* 1993, 105, 697–723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 666–690.
- [7] H. Schreier, *Pharm. Acta Helv.* 1994, 68, 145–159.
- [8] S. T. Crooke, B. Lebleu, *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993.
- [9] E. Uhlmann, A. Peyman in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20 (Hrsg.: S. Agrawal), Humana Press, New Jersey, Totowa, 1993, S. 355.
- [10] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* 1991, 254, 1497–1500.
- [11] C. Meier, J. Engels, *Angew. Chem.* 1992, 104, 1039–1041; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992, 31, 1008–1010.
- [12] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *Bioconjugate Chem.* 1994, 5, 3–7; W. M. Pardridge, R. J. Boado, Y.-S. Kang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 5592–5596; J. C. Norton, M. A. Piatyszek, W. E. Wright, J. W. Shay, D. R. Corey, *Nature Biotechnol.* 1996, 14, 615–619; B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* 1996, 4, 5–23.
- [13] P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Burchardt, M. Egholm, B. Norden, *Nature* 1994, 368, 561–563.
- [14] F. Bergmann, W. Bannwarth, S. Tam, *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 6823–6826.
- [15] K. H. Petersen, D. K. Jensen, M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995, 5, 1119–1124.
- [16] A. C. van der Laan, N. J. Meeuwenoord, E. Khyl-Yeheskiely, R. S. Oosting, R. Brands, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1995, 114, 295–297; D. A. Stetsenko, E. N. Lubyako, V. K. Potapov, T. L. Azhikina, E. D. Sverdlov, *Tetrahedron* 1996, 52, 3571–3574.
- [17] D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, *Tetrahedron* 1995, 51, 12069–12082.
- [18] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 3185–3191.
- [19] Es wurde die gesamtezelluläre Aufnahme des Oligomers wie früher beschrieben bestimmt: A. Peyman, A. Ryte, M. Helsberg, G. Kretzschmar, M. Mag, E. Uhlmann, *Nucleosides Nucleotides* 1995, 14, 1077–1081.

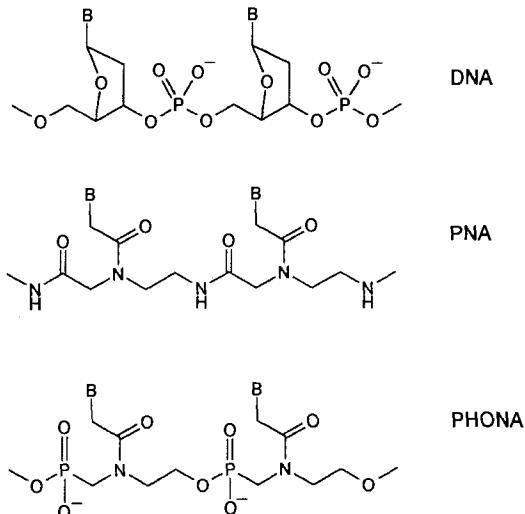
Phosphonsäureester-Nucleinsäuren (PHONAs): Oligonucleotid-Analoga mit achiralem Rückgrat

Anusch Peyman*, Eugen Uhlmann, Konrad Wagner, Sascha Augustin, Gerhard Breipohl, David W. Will, Andrea Schäfer und Holger Wallmeier

Oligonucleotide haben als Therapeutika und in der Diagnostik stark an Bedeutung gewonnen^[1, 2]. Insbesondere an Antisense-Oligonucleotide werden neben der effizienten, sequenzspezifischen molekularen Erkennung von DNA und RNA

* Dr. A. Peyman, Dr. E. Uhlmann, K. Wagner, S. Augustin, Dr. G. Breipohl, Dr. D. W. Will, Dr. A. Schäfer, Dr. H. Wallmeier
Hoechst AG, Central Pharma Research G838
D-65926 Frankfurt
Telefax: Int. +69/331399

weitere Anforderungen gestellt, wie Nucleasestabilität und Zellgängigkeit^[1, 2]. Daher kamen zahlreiche Oligonucleotid-Analoga mit verbesserten Eigenschaften zum Einsatz^[1]; Derivatisierungen der Oligonucleotide reichten von der einfachen Modifikation der Phosphodiester-Brücke, z. B. in Phosphorothioaten, bis hin zum Austausch der Phosphat-Gruppe^[1, 3] oder des gesamten Zucker-Phosphat-Rückgrats, z. B. in den Morpholino-Nucleosid-Oligomeren^[4] oder den Polyamid-Nucleinsäuren (PNAs)^[5]. Die PNAs (Schema 1) stehen wegen ihrer hervor-



Schema 1. Strukturelemente von DNA, PNA und PHONA.

ragenden Bindungseigenschaften an komplementäre DNA und RNA im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Sie sind aus (N-2-Aminoethylglycin)-Einheiten aufgebaut, an die die Nucleobasen über einen Methylencarbonyl-Linker gekoppelt sind. Die Synthese der PNAs erfolgt durch Kondensation der Monomere nach peptidchemischen Methoden^[5–7]. PNAs sind zur PNA-DNA-Duplexbildung und zur Bildung außergewöhnlich stabiler (PNA)_n-DNA-Triplehelices fähig. Die größten Probleme bei der Anwendung der PNAs als Therapeutika sind ihre schlechte Wasserlöslichkeit, die mit einer hohen Tendenz zur Selbstaggregation verbunden ist, sowie eine unzulängliche Zellaufnahme^[5, 8].

Wir beschreiben hier den Aufbau eines achiralen Rückgrats, an das die Nucleobasen ähnlich wie bei den PNAs über Methylencarbonyl-Linker geknüpft sind und das negative Ladungen trägt, um eine ausreichende Wasserlöslichkeit zu garantieren. Um die Bindung an komplementäre DNA zu gewährleisten, wurde auch der Abstand zwischen den Basen von der PNA-Struktur übernommen. Ein Gerüst, das diese Forderungen erfüllt, ist das n-(2-Hydroxyethyl)aminomethylphosphonsäureester-Rückgrat (Schema 1; *phosphonoester nucleic acid* = PHONA). Im folgenden beschreiben wir die Synthese eines Nonamers dieser Verbindungsklasse sowie dessen Bindungseigenschaften an komplementäre DNA. Als Nucleobase wählten wir Thymin, da dieses keiner zusätzlichen Schutzgruppe bedarf.

Die Synthese des Nonamers erfolgte in Lösung durch Blockkondensation, die bei der DNA-Synthese nach der Phosphotriester-Methode erfolgreich eingesetzt wurde^[9]. Entscheidend für eine erfolgreiche Synthese oligomerer Verbindungen ist die Wahl geeigneter Schutzgruppen. Für die Monomere 1a–c wählten wir die orthogonale Kombination aus 4-Methoxyphenyl-diphenylmethyl(Mmt)- für den Alkohol und 2-(4-Nitrophe-nyl)ethyl(NPE)-Gruppe^[10] für die Phosphonsäure (Schema 2).