

$2.0 < \theta < 49.9^\circ$. Die Daten wurden auf einem Enraf-Nonius CAD-4-Diffraktometer mit MoK_{α} -Strahlung ($\lambda = 0.70930 \text{ \AA}$) im ω -Scan-Modus bei 290 K gesammelt. Die Strukturen wurden mit Direkten Methoden unter Verwendung des NRCVAX-Systems gelöst. Nichtwasserstoffatome wurden mit anisotropen thermischen Parametern verfeinert. Die Lösungsmittelmoleküle in **1a** waren fehlgeordnet und konnten nicht genau lokalisiert werden. Daher wurden diese Atome als Kohlenstoffatome behandelt und mit festen isotropen thermischen Parametern und flexibler Lagenbesetzung verfeinert. 1795 beobachtete Reflexe, 1027 mit $I > 3.0\sigma(I)$, 135 Parameter, $R = 0.055$, $R_w = 0.055$. Die H-Atome der 4,4'-Bipyridinmoleküle wurden auf berechneten Lagen positioniert ($d_{C-H} = 1.00 \text{ \AA}$). Restelektronendichte (min./max.) – 0.980/0.420 und – 0.590/0.750 für **1a** bzw. **1b**. Die kristallographischen Daten (ohne Struktur faktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no. CCDC-179-126“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse angefordert werden: The Director, CCDC, 12 Union Road, CB-Cambridge CB21EZ (Telefax: Int. +1223/336033; E-mail: tecched@chemcrys.cam.ac.uk).

- [11] Aus alternierenden Einheiten aufgebauten Strukturmotive sind bei der Zusammenlagerung T-förmiger Gruppen ebenso möglich: F. Robinson, M. J. Zaworotko, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 2413; O. M. Yaghi, H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 295. Verwendet man CS_2 als Lösungsmittel, kristallisiert **1** mit alternierend angeordneten Baueinheiten; dieses Strukturmotiv läßt sich am besten als Doppelschicht bezeichnen: P. Losier, K. N. Power, M. J. Zaworotko, noch unveröffentlicht.
- [12] A. F. Cameron, D. W. Taylor, R. H. Nuttall, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1972**, 1603.
- [13] Infrarotspektroskopisch lassen sich Hinweise darauf finden, daß Acetonitril vorhanden ist. Die Bande bei 2252 cm^{-1} wird der $\text{C}\equiv\text{N}$ -Streckschwingung zugeordnet: K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 2. Aufl., Wiley, New York, **1970**, S. 186.
- [14] J. A. R. P. Sarma, G. R. Desiraju, *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 222.
- [15] C. A. Hunter, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1181; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1079; M. Fujita, J. Yazaki, K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5645; P. J. Stang, D. H. Cao, *ibid.* **1994**, 116, 4981; R. V. Slone, D. I. Yoon, R. M. Calhoun, J. T. Hupp, *ibid.* **1995**, 117, 11813; P. J. Stang, B. Olenyuk, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 798; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 732.

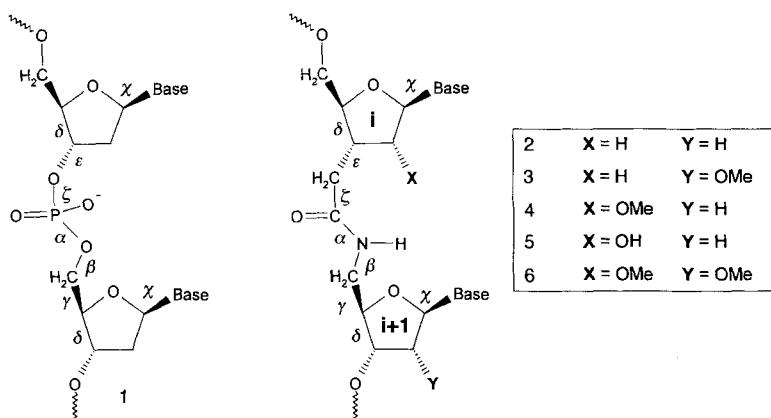


Abb. 1. Dimer in einem nativen DNA-Strang (links) und modifizierte Dimere (rechts). Die Torsionswinkel in den modifizierten Strukturen sind wie in natürlichen Nucleinsäuren definiert (IUPAC-IUB, Joint Commission on Biochemical Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* **1983**, 131, 9). In den Strängen, in denen abwechselnd modifizierte und Wildtyp-Monomere vorliegen, gibt es zwei unterschiedliche Typen von Resten: Die Reste *i*, die mit dem C3'-Ende, und die Reste *i*+1, die mit dem C5'-Ende an das modifizierte Rückgrat gebunden sind.

Stark erhöhte Affinität modifizierter Oligonucleotide mit in ihrer Konformation eingeschränkten Furanose-Ringen für komplementäre RNA-Stränge**

Alain De Mesmaeker*, Catherine Lesueur, Marc-Olivier Bévière, Adrian Waldner, Valérie Fritsch und Romain M. Wolf

In kürzlich erschienenen Publikationen wurden Analoga natürlicher 2'-Desoxyoligonucleotide beschrieben, bei denen die Phosphodiester- durch Amidbindungen ersetzt waren^[1] und die als Antisense-Nucleinsäuren genutzt werden sollten^[2]. Von den fünf strukturisomeren Amiden, die wir in Oligonucleotide einbauten, bildeten die Verbindungen mit der Modifikation 2 (Abb. 1) thermodynamisch etwas stabilere Duplices mit komplementären RNA-Strängen. Außerdem waren Oligonucleotide mit alternierenden Phosphodiester- und Amidbindungen erheblich stabiler gegenüber Endo- und Exonucleasen. Die Verringe-

[*] Dr. A. De Mesmaeker, Dr. C. Lesueur, Dr. M.-O. Bévière, Dr. A. Waldner, Dr. V. Fritsch, Dr. R. M. Wolf
Zentrale Forschung, Ciba-Geigy
CH-4002 Basel (Schweiz)
Telefax: Int. +61/697 82 52

[**] Wir danken Dr. U. Pieles und Dr. D. Hüskens für Synthese und Reinigung der Oligonucleotide.

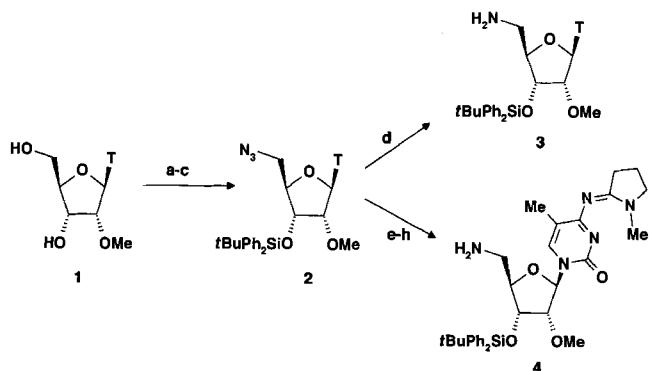
rung der Ladung sollte die Aufnahme in die Zelle begünstigen^[3]. Ermutigt durch diese vielversprechenden Eigenschaften der Verbindungen mit der Modifikation 2 untersuchten wir weitere strukturelle Varianten dieses Prototyps, um die Affinität der Oligonucleotide zu komplementären RNA-Strängen zu verbessern. Viele Parameter beeinflussen die potentielle Aktivität eines Oligonucleotids als Antisense-Wirkstoff unter physiologischen Bedingungen^[2, 4]; es ist allerdings unverzichtbar, durch strukturelle Veränderungen des Stranges die Affinität zur Ziel-RNA erheblich zu verbessern. Wir beschreiben hier die Synthesen von Dimeren mit den Modifikationen 3–6, die 2'-Substituenten an den Furanosylresten tragen, sowie den Einbau dieser Dimere in Oligonucleotide (Abb. 1). Die stark verbesserte thermodynamische Stabilität (ein Maß hierfür ist die Schmelztemperatur T_m) der Duplices, die aus den Oligonucleotiden mit den Modifikationen 3 und 6 sowie den komplementären RNA-Strängen zusammengesetzt sind, wird neben einer Molecular-Modeling-Untersuchung erläutert.

Unsere NMR-Untersuchungen^[5] und Molekülmechanikstudien^[6] an RNA-DNA-Duplices, die nach Prototyp 2 modifizierte DNA-Stränge enthielten, ergaben, daß die Furanose annähernd eine C3'-endo-Konformation einnimmt, wenn sie das Amid-Rückgrat am C3'-Ende trägt (Rest *i* in Abb. 1), jedoch nicht, wenn sie es am C5'-Ende trägt (Rest *i*+1 in Abb. 1). Im zweiten Fall verhält sich die Furanose wie die Desoxyribose in einem unmodifizierten RNA-DNA-Duplex, sie oszilliert also zwischen der C2'-endo- und der C3'-endo-Konformation^[7].

Wir sind der Auffassung, daß die thermodynamische Stabilität der Duplices erhöht werden kann, wenn beide Zuckerreste in die C3'-endo-Konformation gezwungen werden^[8]. Ein 2'-O-Alkylsubstituent an einem Ribonucleosid mit einem Phosphodiester- oder Phosphothioat-Rückgrat begünstigt die C3'-endo-Konformation des Fünfrings^[9] und erhöht die Schmelztemperatur T_m der Duplices mit der komplementären RNA^[10]. Der Einfluß eines solchen 2'-O-Alkylsubstituenten auf den Zuckerrest eines modifizierten Rückgrats ist allerdings schwer vorauszusagen. Je nach der bevorzugten Konformation, die von dem modifizierten Rückgrat eingenommen wird, sind die Folgen der Faltung der „oberen“ und „unteren“ Zuckerreste unterschiedlich. Unsere NMR-spektroskopischen und Molecular-Modeling-Daten legten nahe, daß die Oligonucleotide, die die Modifikation 3 enthalten, eine bessere Affinität zum komplementären

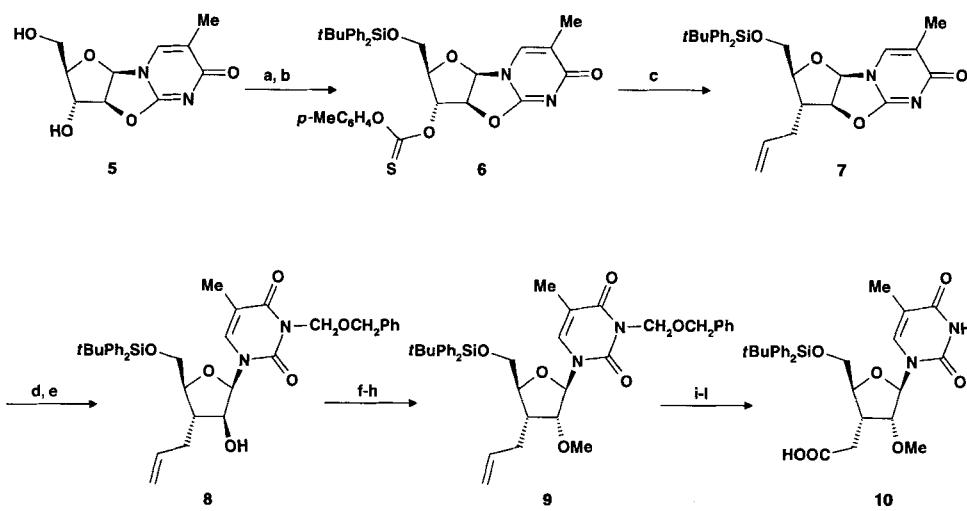
tären RNA-Strang aufweisen als die mit der Prototyp-Modifikation 2. Ein 2'-O-Alkylsubstituent am oberen Zuckerrest wie in Modifikation 4 sollte die Stabilität der Duplices nicht wesentlich beeinflussen, weil dieser Rest auch im Rückgrat des Prototyps 2 eher zur C3'-endo-Konformation neigt. Die Kombination von 2'-O-Alkylsubstituenten an beiden Zuckerresten (Modifikation 6) sollte daher zu einer ähnlichen oder geringfügig größeren thermischen Stabilität der Duplices führen als die Modifikation 3. Wie hier beschrieben wird, wurden unsere Annahmen durch die Versuchsergebnisse bestätigt.

Die Dimere mit den Modifikationen 3–6, die jeweils eine 5'-DMT- und eine 3'-Phosphoramidit-Gruppe trugen, wurden in die Oligonukleotide eingeführt. Die benötigten Amine 3 und 4 wurden aus 2'-OMe-Thymidin 1 synthetisiert (Schema 1). Das



Schema 1. a) 1.3 Äquiv. I₂, 1.3 Äquiv. PPh₃, Py, RT, 5 h (90%); b) 3 Äquiv. NaN₃, DMF, 60 °C, 24 h (89%); c) 1.3 Äquiv. tBuPh₂SiCl, 1.1 Äquiv. (4-Dimethylamino)pyridin (DMAP), 2 Äquiv. Imidazol, DMF, RT, 24 h (87%); d) 2 Äquiv. SnCl₂·2H₂O, MeOH, RT, 20 h (72%); e) 1.5 Äquiv. p-ClC₆H₄OPOCl₂, 3 Äquiv. 1H-1,2,4-Triazol, Py, 50 °C, 20 h; f) NH₃(aq.) (25%), Dioxan, RT, 17 h (84%); g) 1.6 Äquiv. N-Methylpyrrolidinone-dimethylacetal, THF/Py (1/1), RT, 20 h; h) 3 Äquiv. SnCl₂·2H₂O, MeOH, RT, 2 h (93%).

primäre Iodid wurde in hohen Ausbeuten durch Umsetzung von 1 mit Iod und Triphenylphosphan in Pyridin erhalten^[11]. Die Substitution mit Natriumazid und der Schutz der 3'-OH-Gruppe mit tBuPh₂SiCl führte zum Zwischenprodukt 2. Die Umsetzung von Thymidin zum N-Methylpyrrolidin-geschützten 5-Methylcytidin gelang in hoher Gesamtausbeute^[12]. Wie bei der Herstellung des Dimers mit der Modifikation 2 wurde das Amin (4) ohne vorherige Reinigung zur Dimer-Synthese eingesetzt^[13].



Anfangs versuchten wir, das Carboxylderivat **10** (Schema 2) durch Addition des 3'-zentrierten Radikals an Allyltributylzinn und anschließende oxidative Spaltung der C-C-Doppelbindung herzustellen. Dieser Syntheseweg verläuft bei den 2'-Desoxyderivaten sehr effizient^[11]. Die Addition des Radikals aus dem 3'-Thionocarbonat von **1** (das einen 2'-OMe-Substituenten trägt) an Allyltributylzinn führte allerdings zum β-3'-Allylderivat als Hauptprodukt und nicht zum gewünschten α-3'-Allylderivat. Diese Schwierigkeiten lassen sich umgehen, wenn man von dem Anhydroderivat **5** ausgeht (Schema 2)^[14].

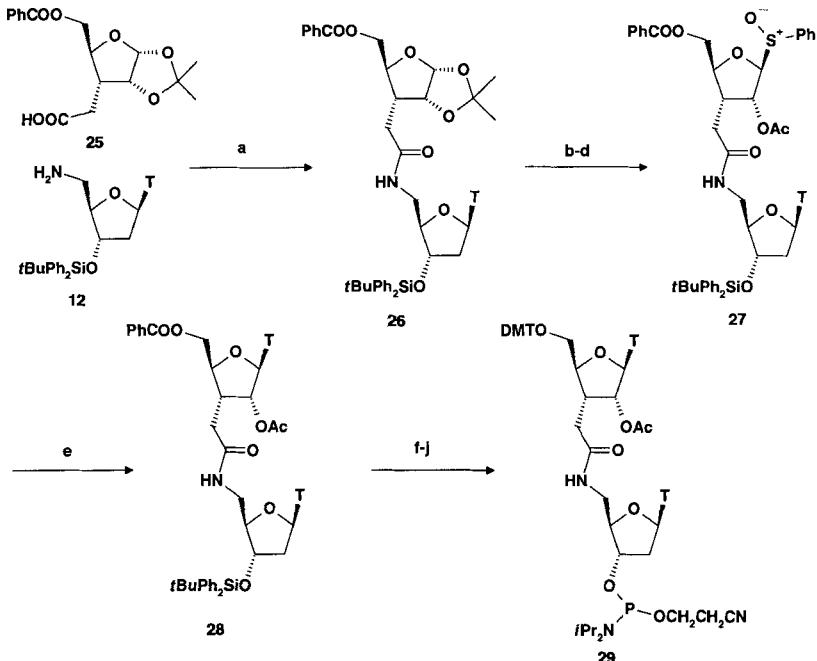
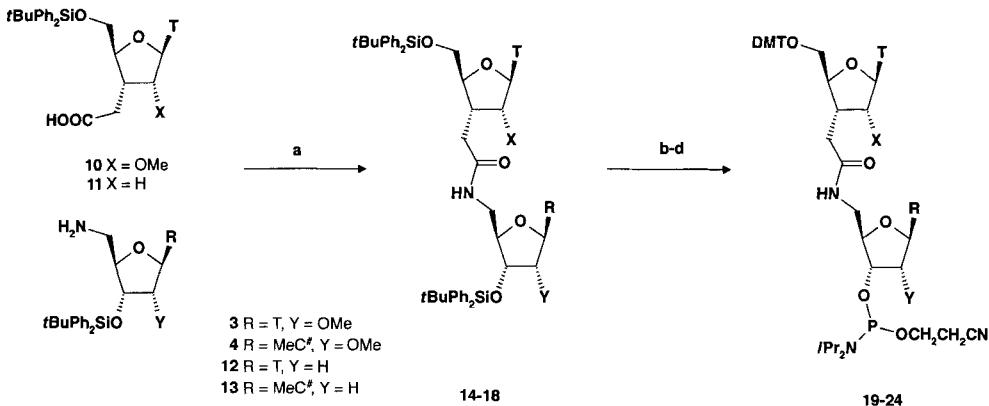
Die Addition des 3'-Radikals aus **6** an Allyltributylzinn ist hoch stereoselektiv, weil sich alle Substituenten auf der β-Seite befinden. Im Reaktionsgemisch konnte durch 500 MHz-¹H-NMR-Spektroskopie nur das 3'-Allylderivat **7** nachgewiesen werden. Der Anhydroring wurde zur Thymidinbase hydrolysiert und diese anschließend durch Behandeln mit BOMCl in Gegenwart von DBU geschützt. Die Konfiguration der 2'-Position wurde mit Chloressigsäure in einer Mitsunobu-Reaktion umgekehrt^[15]. Der Chloracetatrest wurde dann mit NaOMe abgespalten und der gebildete Alkohol methyliert. Die BOM-Schutzgruppe wurde nach Dihydroxylierung der C-C-Doppelbindung (in **9**) mit OsO₄ entfernt. Die gewünschte Carbonsäure **10** wurde durch Behandeln mit NaIO₄ und anschließende Oxidation des Aldehyds mit NaClO₂ erhalten. Die Kupplung der Carbonsäure **10** mit dem Amin **3** (oder **4**) verlief in hohen Ausbeuten (Schema 3, Tabelle 1). Die Dimere wurden dann für die Festphasensynthese der Oligonukleotide aktiviert^[16].

Für die Synthese von Verbindungen mit der Modifikation 5, die eine 2'-OH-Gruppe am oberen Zuckerrest tragen, haben wir eine neue Strategie entwickelt. Diese beruht auf der stereoselektiven Glycosylierung eines Dimers, das einen Thyminrest am unteren Zuckerrest trägt (Schema 4). Die Carbonsäure **25**^[17]

Tabelle 1. Ausbeuten der Syntheseschritte a-d ausgehend von den Monomeren **3**, **5** und **12** über die Dimere **14**–**18** (vgl. Schema 3; MeC* = 5-Methyl-N-methylpyrrolidon).

Monomer	Dimer	Ausbeuten [%]			
		a	b	c	d
3 T, Y = OMe	X = H, Y = OMe	79	95	78	71
4 MeC*, Y = OMe	X = H, Y = OMe	70	80	80	79
12 T, Y = H	X = OMe, Y = H	80	91	81	74
13 MeC*, Y = H	X = OMe, Y = OMe	75	91	88	84
	X = OMe, Y = OMe	80	70	74	83

Schema 2. a) 1.1 Äquiv. tBuPh₂SiCl, 2 Äquiv. Imidazol, DMF, RT, 18 h (72%); b) 4 Äquiv. p-MeC₆H₄OCSi, 4 Äquiv. NEt₃, 2 Äquiv. DMAP, 10 Äquiv. Py, CH₂Cl₂, RT, 40 h (82%); c) 5 Äquiv. Allyltributylzinn, 0.7 Äquiv. α,β'-Azobisisobutyronitril (AIBN), Benzol, 20 h unter Rückfluß (79%); d) 2 Äquiv. NaOH (2 N), THF/H₂O (2/1), RT, 5 h (90%); e) 1.2 Äquiv. Benzylloxymethylchlorid (BOMCl), 1.2 Äquiv. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), MeCN, RT, 18 h (92%); f) 2.5 Äquiv. PPh₃, 2.5 Äquiv. Diisopropylazodicarboxylat, 3 Äquiv., ClCH₂COOH, Toluol, RT, 50 h (83%); g) 0.3 Äquiv. MeONa, MeOH, RT, 1 h (92%); h) 1.5 Äquiv. NaH, 1.5 Äquiv. Mel, THF, RT, 17 h (94%); i) 0.05 Äquiv. OsO₄, 1.1 Äquiv. N-Methylmorpholin-N-oxid, Aceton/H₂O (4/1), RT, 18 h (61%); j) H₂ (1 atm), Pd/C (10%), MeOH, RT, 18 h (83%); k) 1.1 Äquiv. NaIO₄, Dioxan/H₂O (3/1), RT, 18 h (81%); l) 6 Äquiv. NaClO₂, 4 Äquiv. 2-Methyl-2-butene, 4 Äquiv. NaH₂PO₄·H₂O, tBuOH/H₂O (5/3), RT, 30 min (92%).



Schema 4. a) 1.1 Äquiv. NEt_3 , 1.1 Äquiv. $O\text{-}(\text{1H-Benzotriazol-1-yl})\text{-}N\text{,}N\text{,}N'\text{,}N'\text{-tetramethyluroniumtetrafluoroborat}$, 0.5 Äquiv. $N\text{-Hydroxybenzotriazol}$, MeCN , RT, 1 h; b) 1 Äquiv. **12**, 1.5 Äquiv. NEt_3 , RT, 12 h (89%); c) $\text{PhSH}/\text{CF}_3\text{COOH}$ (1/3); $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 7 h (51%); c) 15 Äquiv. Ac_2O , Py, RT, 20 h (82%); d) 1 Äquiv. $m\text{CPBA}$, CH_2Cl_2 , -78°C (96%); e) 1.1 Äquiv. Thymine, 2.2 Äquiv. Bistrimethylsilylacetamide, 1 Äquiv. TMSOTf ($\text{Tf} = \text{Triflat}$), 1,2-Dichlorethan, 90°C , 2 h; dann 1.5 Äquiv. $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$, CHCl_3 , RT, 18 h (65%); f) 2 Äquiv. MeONa , MeOH , RT, 3 h (78%); g) 2.4 Äquiv. DMTCI, Py, RT, 24 h (76%); h) 5 Äquiv. Ac_2O , Py, RT, 20 h (48%); i) 1.5 Äquiv. $n\text{Bu}_4\text{NF}$, THF, RT, 3 h (94%); j) 2.3 Äquiv. $(i\text{Pr}_2\text{N})_2\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, 2.2 Äquiv. Diisopropylammoniumtetrazolid, CH_2Cl_2 , RT, 24 h (92%).

Tabelle 2. Schmelztemperatur T_m [°C] der Wildtyp-Duplices 1 und Differenzen ΔT_m [K] der Schmelztemperaturen von Duplices, die [5'→3']-Oligonucleotide mit den Modifikationen 2–6 enthalten, und der der Wildtyp-Duplices.

Sequenz [a]	Oligonucleotide	Modifikation:	1	2	3	4	5	6
			T_m		ΔT_m [b]			
A	TTTT*TCTCTCTCTT		51.6	+0.4	+2.1	0	-1.2	+2.6
B	T*TT*TT*CT*CT*CT*CT*CT		51.6	+0.6				
C	T*TT*TT*MeCT*MeCT*MeCT*MeCT*MeCT		56.9		+2.5			
D	GCGT*TT*TT*TT*TT*TGCG		50.2	-0.3	+2.0	+0.8		+3.0
E	TTTT*TCTCTCTCTT		42.3	-1.7	-2.2			
F	GCGT*TT*TT*TT*TT*TGCG		54.1	-1.5	+0.1	-1.5		+0.6

[a] A–D mit komplementärem RNA-Strang, E–F mit komplementärem DNA-Strang. [b] $\Delta T_m = [T_m(\text{modifiziertes Oligonucleotid}) - T_m(\text{Wildtyp})]/(\text{Zahl der modifizierten Dinucleoside})$.

wurde in sehr guten Ausbeuten an das Amin **12**^[16] gekoppelt. Die selektive Abspaltung der Isopropylidengruppe aus **26** gelang mit Thiophenol in CF_3COOH . Das erhaltene β -Thioglycosid ließ sich in 51% Ausbeute isolieren. Nach Acetylierung (Ac_2O , Py, RT) wurde das Thiophenylderivat durch Umsetzung mit gereinigter $m\text{CPBA}$ bei niedriger Temperatur selektiv zum Sulfoxid **27** oxidiert; so wurde die Bildung des Sulfons vermieden, das die anschließende Glycosylierungsreaktion nicht eingeht. Die zweite Thyminbase wurde durch

Glycosylierung des anomeren Phenylsulfoxids **27**^[18] stereoselektiv eingeführt (Ausbeute 65%), ohne daß Epimerisierung der bereits vorhandenen Thyminbase eintrat und ohne daß die Amidbindung (z. B. durch Cyclisierung) störte (Schema 4). Nach Austausch der Schutzgruppen wurde das Phosphoramidit **29** erhalten.

Die Schmelztemperaturen T_m der Duplices aus unseren modifizierten Oligonucleotiden und den komplementären RNA- und DNA-Strängen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt^[19]. Die T_m -Werte für Duplices, die die Oligonucleotide mit den Modifikationen 3–6 enthalten, können anhand der Tabelle mit denen für Oligonucleotide mit der Modifikation 2 und für den Wildtyp 1 verglichen werden^[1b, 13]. Ein 2'-OMe-Substituent an der unteren Zuckereinheit der Amide (Modifikationen 3 und 6) hat starke Auswirkungen auf den T_m -Wert der Duplices mit RNA (Sequenz A): Die Schmelztemperatur ist durch die zusätzliche 2'-OMe-Gruppe um 1.7 bzw. 2.2 K höher als beim Prototyp 2. Wenn die Modifikation 3 alternierend zu Phosphodiesterbindungen eingeführt wurde, nahm die Schmelztemperatur pro modifiziertem Dinucleosid um 2.5 K im Vergleich zum Wildtyp zu (Sequenz C). Bemerkenswert ist, daß die Zunahme der Schmelztemperatur, die durch die zusätzliche 2'-OMe-

Gruppe hervorgerufen wird, beim Amid-Rückgrat größer ist als beim nativen Phosphodiester-Rückgrat. So ist der T_m -Wert durch den 2'-OMe-Substituenten an Thymidin- und 5-Methylcytosinresten in Sequenz C nur um +1.0 K je Modifikation höher als bei den entsprechenden nativen 2'-Desoxyribofuranosiden^[20].

Eine 2'-OMe-Gruppe an der oberen Zuckereinheit hat viel geringere Auswirkungen als eine an der unteren Zuckereinheit (Modifikationen 4 bzw. 3). Der obere Zukerrest nimmt eine Konformation

ein, die der C3'-endo-Konformation des Prototyps 2 ähnelt. Daher hat die zusätzliche 2'-OMe-Gruppe der Modifikation 4 kaum Einfluß auf die Faltung des Ribofuranoseringes. Liegt dagegen eine 2'-OH-Gruppe vor, kann diese eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung mit dem Amid-Rückgrat eingehen. Dies würde zu einer Konformationsänderung des Rückgrats führen. Die negative Auswirkung des 2'-OH-Substituenten in Modifikation 5 wurde experimentell bestätigt ($\Delta T_m = -1.2$ K). Durch Methylierung beider 2'-OH-Gruppen (Modifikation 6; Sequenzen A und D) wurde die Schmelztemperatur um 2.6 bzw. 3.0 K verglichen mit dem Wildtyp erhöht.

Auffällig ist, daß die Modifikationen 2, 3, 4 und 6 die thermodynamische Stabilität von Duplices mit komplementären DNA-Strängen erheblich weniger verbessern (Sequenzen E und F) als die mit komplementären RNA-Strängen.

Molekülmechanik- und -dynamikstudien wurden mit dem AMBER-Kraftfeld^[21] durchgeführt, wie es im Programm DISCOVER 2.9.5 der Firma MSI (BIOSYM), San Diego, USA, implementiert ist. Die Konformation wurde an Octamerduplices der Form r[GA₆G] · d[CTTT*TTTC] mit einem modifizierten T*T-Dimer in der Mitte des DNA-Strangs analysiert; die Studien zur Moleküldynamik wurden mit alternierend modifizierten, 14 Basenpaare langen RNA·DNA-Duplices der Struktur r[G(A)₁₂G] · d[CT(T*T)₅TC] und den unterschiedlichen Amidmodifikationen durchgeführt^[1,6].

Ungeachtet der Modifikationen an C2' werden durch die Konformationsanalyse im allgemeinen die Befunde für die Verbindungen mit amidmodifiziertem Rückgrat ohne weitere C2'-Substituenten bestätigt. Die beiden energieärmsten Konformationen der Modifikationen 3–6 ähneln **a** (niedrigstes Energieniveau) bzw. **b** (zweitniedrigstes Energieniveau), wie dies in Abbildung 2 für die Modifikation 6 veranschaulicht ist. Wie

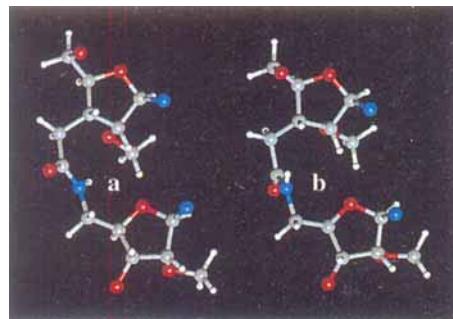


Abb. 2. Konformationen niedrigster Energie der Modifikation 6, die aus dem DNA-Strang des RNA·DNA-Octamer-Duplex herausgeschnitten wurde. Die Konformation **b** ist um $0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ energiereicher als **a** (wenn man die Energien des Octamer-Heteroduplex vergleicht) und unterscheidet sich hauptsächlich in den Torsionswinkeln $\beta(i)$ und $\zeta(i+1)$ (für Definitionen siehe Abb. 1).

beim Prototyp 2 ist die Konformation **b** im allgemeinen etwa $0.5\text{--}1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ energiereicher (bezogen auf den gesamten Octamerduplex). Die Konformation **a** weist mit $(\alpha, \beta, \gamma) \approx (t, t, t)$ eine Geometrie auf, die zum Teil in DNA-A-Helices als Variante der (g^-, t, g^+)-Standardkonformation des DNA-Rückgrats vorkommt^[22].

Die Moleküldynamik(MD)-Verläufe wurden für alle Modifikationen aufgezeichnet, wobei die energiearmen Konformationen als Ausgangsstrukturen verwendet wurden. Meist wird die klassische Watson-Crick-Basenpaarung über die gesamten MD-Verläufe beibehalten. Es wurden jedoch einige bemerkenswerte

Unterschiede zu der unsubstituierten Modifikation 2 festgestellt. Durch ein Sauerstoffatom an C2' der Furanose werden die Konformationsmöglichkeiten auf den Bereich der C3'-endo-Konformation mit einem Phasenwinkel für die Pseudorotation $P^{[23]}$ von etwa 18° beschränkt (Abb. 3). Daher verhalten sich die

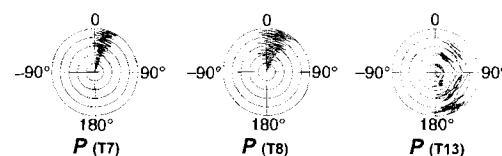


Abb. 3. Phasenwinkel der Pseudorotation $P^{[23]}$ der Basen T7, T8 und T13 im DNA-Strang (Modifikation 6) eines RNA·DNA-Duplex aus 14 Basenpaaren. Die Werte sind in Form von Polarkoordinaten mit P als Phase und der Zeit als radiale Koordinate aufgetragen; die Kreise repräsentieren Intervalle von je 20 Picosekunden. Die Zucker in T7 (i-Rest) und T8 (i + 1-Rest) bleiben in der C3'-endo-Konformation, während die unmodifizierte Desoxyribose in T13 zwischen den Konformationen C3'-endo und C2'-endo oszilliert.

i + 1-Reste in den Modifikationen 3 und 6 deutlich anders als in Modifikation 2. Führt man das Sauerstoffatom an C2' des Restes i ein, ist der Effekt weniger stark ausgeprägt, denn sogar in Modifikation 2 neigt dieser Zuckerrest eher zu einer Konformation vom A-Typ (der Durchschnittswert für P beträgt 86° für Konformation **a** und 48° für Konformation **b**)^[6].

In Abbildung 4 ist die gemittelte MD-Struktur des RNA·DNA-Duplex r[G(A)₁₂G] · d[CT(T*T)₅TC] veranschaulicht (T*T: Dimer mit Modifikation 6). Die Bänder symbolisieren das Rückgrat, dessen Lage durch MD-Momentaufnahmen in Abständen von zehn Picosekunden ermittelt wurde. Qualitativ betrachtet verhält sich der modifizierte Hybridduplex bei den MD-Simulationen konservativer als der korrespondierende unmodifizierte Duplex; dies ist hauptsächlich der eingeschränkten C3'-endo-Faltung der Furanosen im modifizierten DNA-Strang

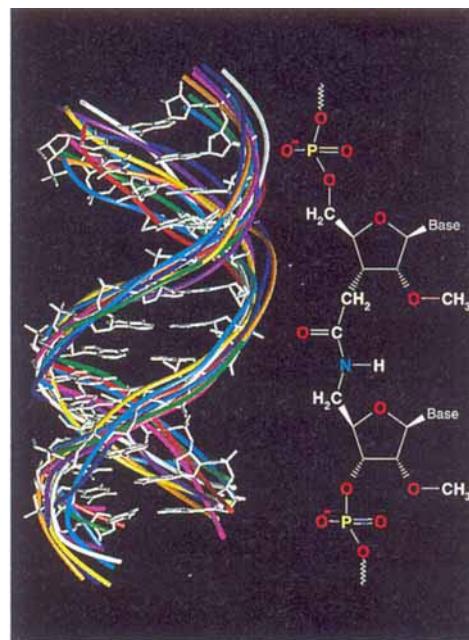


Abb. 4. RNA·DNA-Heteroduplex mit einem alternierend modifizierten DNA-Strang d[CT(T*T)₅TC]; T*T: Dimer mit der Modifikation 6, X = Y = OMe (siehe Abb. 1). Die Struktur entspricht der mit MD-Rechnungen ermittelten Durchschnittsstruktur. Wasserstoffbrückenbindungen sind nicht dargestellt. Die Bänder verlaufen durch die Rückgrate, deren Lage durch MD-Momentaufnahmen im Abstand von zehn Picosekunden ermittelt wurde.

zuzuschreiben. Die Modifikationen des DNA-Stranges haben keinen Einfluß auf den RNA-Strang^[7].

Wir haben Oligonucleotide modifiziert, wodurch deren Affinität für RNA-Stränge im Vergleich zu Oligonucleotiden mit dem Wildtyp 1 und dem Prototyp 2 deutlich zunahm. Durch Einführen einer 2'-OMe-Gruppe am unteren Zuckerrest in den Modifikationen 3 und 6 wurde die Schmelztemperatur T_m der Duplex mit RNA um 2.0–3.0 K erhöht. Der zweite 2'-OMe-Substituent am oberen Zuckerrest in der Modifikation 6 hat ebenfalls einen positiven, wenn auch weniger ausgeprägten Einfluß auf die thermodynamische Stabilität der Duplex mit dem komplementären RNA-Strang. Die sehr große Zunahme der Schmelztemperatur bei den Modifikationen 3 und 6 ist auf die Kompatibilität der bevorzugten Konformationen des Amid-Rückgrats mit der C3'-endo-Faltung der beiden Furanose-Ringe zurückzuführen. Diese Modifikationen sind sehr vielversprechend hinsichtlich einer Anwendung in der Antisense-Strategie, besonders weil die entsprechenden Oligonucleotide erheblich stabiler gegenüber Nucleasen sind.

Eingegangen am 21. Juni 1996 [Z 9251]

Stichworte: Amide · Antisense-Oligonucleotide · Desoxyzucker · Molecular Modeling · Nucleinsäuren

- [1] a) J. Lebreton, A. De Mesmaeker, A. Waldner, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6383; b) A. De Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreton, P. Hoffmann, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, *Angew. Chem. 1994*, *106*, 237; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 226; c) I. Idziak, G. Just, M. J. Damha, P. A. Giannaris, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5417; d) S. Wendeborn, R. M. Wolf, A. De Mesmaeker, *ibid.* **1995**, *36*, 6879; e) G. Stork, C. Zhang, S. Gryaznov, R. Schultz, *ibid.* **1995**, *36*, 6387; f) L. De Napoli, A. Iadonisi, D. Montesarchio, M. Varra, G. Piccialli, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1647; g) M. J. Robins, S. Sarker, M. Xie, W. Zhang, M. A. Peterson, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3921.
- [2] a) E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543; b) S. T. Crooke, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1993**, *32*, 329; c) A. De Mesmaeker, R. Haener, P. Martin, H. E. Moser, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 366; d) A. De Mesmaeker, K.-H. Altmann, A. Waldner, S. Wendeborn, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 343.
- [3] Siehe z. B. a) Y. Shoji, S. Akhtar, A. Periasamy, B. Herman, R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5543; b) R. Fathi, Q. Huang, G. Coppola, W. Delaney, R. Teasdale, A. M. Krieg, A. F. Cook, *ibid.* **1994**, *22*, 5416.
- [4] C. Moulds, J. G. Lewis, B. C. Froehler, D. Grant, T. Huang, J. F. Milligan, M. D. Matteucci, R. W. Wagner, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5044.
- [5] M. J. J. Blommers, U. Pieles, A. De Mesmaeker, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4187.
- [6] V. Fritsch, A. De Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreton, M. J. J. Blommers, R. M. Wolf, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 321.
- [7] V. Fritsch, R. M. Wolf, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1994**, *11*, 1161, zit. Lit.
- [8] Beispiele für Rückgrat-Modifikationen mit 2'-substituierten Furanosiden: a) X. Cao, M. D. Matteucci, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 807; b) B. Meng, S. H. Kawai, D. Wang, G. Just, P. A. Giannaris, M. J. Damha, *Angew. Chem. 1993*, *105*, 733; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 729; c) E. R. Kandimalla, J. Temsamani, S. Agrawal, *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 1031.
- [9] W. Guslchbauer, K. Jankowski, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 1421.
- [10] H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6131; b) E. A. Lesnik, C. J. Guinossi, A. M. Kawasaki, H. Sasmor, M. Zounes, L. L. Cummins, D. J. Ecker, P. D. Cook, S. M. Freier, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7832.
- [11] J. Huang, E. B. McElroy, T. S. Widlanski, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3520.
- [12] L. J. McBride, R. Kierzek, S. L. Beauchage, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2040.
- [13] J. Lebreton, A. Waldner, C. Lesueur, A. De Mesmaeker, *Synlett* **1994**, 137.
- [14] R. F. Schinazi, M. S. Chen, W. H. Prusoff, *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1273.
- [15] M. Saiah, M. Bessodes, K. Antonakis, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4317.
- [16] Die Oligonucleotide wurden nach einer Standardvorschrift für Phosphoramidit-Reaktionen auf einem ABI-390-DNA-Synthesizer hergestellt nach M. J. Gait, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL, Oxford, 1984, allerdings wurden die Kopplungszeiten auf 10 min verlängert. Die DMT-Oligonucleotide wurden durch HPLC gereinigt (Säule: Nucleosil-RP-C₁₈, 10 µm, 10 × 250 mm; Laufmittel A: 50 mM Triethylammoniumacetat (TEAA), pH 7.0; Laufmittel B: 50 mM TEAA, pH 7.0, in 70% Acetonitril; eluiert wurde mit einem Gradienten von A:B = 85:15 bis 55:45 in 45 min). Nach der Reinigung durch HPLC wurden die Oligonucleotide durch Kapillargelektrophorese überprüft (Konzentration: 35 µg Oligonucleotide pro mL; Injektion bei 2 kV;

Trennung bei 9 kV; Kapillare: effektive Länge 30 cm, Innendurchmesser 100 µm, Polyacrylamid 10% T; Puffer: 100 mM H₃PO₄, 100 mM 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (Tris), 2 mM Ethylenediamintetraacetat (EDTA), 7 M Harnstoff, pH 8.8. Das Molekulargewicht der einzelnen Oligonucleotide wurde massenspektrometrisch überprüft (MALDI-TOF: U. Pieles, W. Zürcher, M. Schär, H. Moser, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3191). Die Oligonucleotide wurden aus einer 2,4,6-Trihydroxyacetophenon-Matrix (Nachweis negativ geladener Ionen) mit Diammoniumhydrogencitrat als Zusatz (25 mM Endkonzentration) desorbiert.

- [17] J. S. Pudlo, L. B. Townsend, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3101.
- [18] L. Chanteloup, J. M. Beau, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5347.
- [19] Die thermische Denaturierung der DNA/RNA-Hybride wurde mit einem Gilford-Response-II-Spektralphotometer (Ciba-Corning Diagnostics, Oberlin, OH, USA) bei 260 nm oder mit einem Varian-Cary-3-UV/Vis-Spektralphotometer verfolgt. Die Extinktion wurde für jeden Strang (4 µm) in 10 mM Natriumphosphat (pH 7.0) mit 100 mM Na⁺-Gesamtconzentration (mit NaCl auf die Endkonzentration ergänzt) und 0.1 mM EDTA in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Die T_m -Werte wurden ermittelt, indem an die Kurven (Extinktion gegen Temperatur) ein Zweiphasenmodell mit linearen Basislinien für die Steigungen angepaßt wurde (S. M. Freier, D. D. Albergo, D. H. Turner, *Biopolymers* **1983**, *22*, 1107). Alle Werte sind aus mindestens drei Experimenten gemittelt. Der absolute Fehler der T_m -Werte liegt bei ± 0.5 K.
- [20] P. Martin, *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 486.
- [21] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 230.
- [22] a) C. A. Frederick, G. J. Quigley, M.-K. Teng, M. Coll, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, A. H.-J. Wang, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *181*, 295; b) B. Ramakrishnan, M. Sundaralingam, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11458; c) *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 43.
- [23] S. T. Rao, E. Westhof, M. Sundaralingam, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1981**, *37*, 421.

In-situ-Nachweis transienter Phänomene bei Reaktionen an Zeolithkatalysatoren mit Hilfe der Positronenemission

Rutger A. van Santen*, Bruce G. Anderson, R. H. Cunningham, A. V. G. Mangnus, L. J. van IJzendoorn und M. J. A. de Voigt

Zeolithen finden in der petrochemischen Industrie als saure Festphasenkatalysatoren für die Überführung von Kohlenwasserstoffen in Treibstoffe mit hoher Oktanzahl durch Isomerisierungs- und Crack-Reaktionen breite Anwendung^[1]. Ein stabiler Betrieb unter milden Bedingungen wird durch Zugabe von Edelmetallen zu den sauren Zeolithen ermöglicht. So läßt sich nach dem Zusatz von Platin zum Zeolithen H-Mordenit n-Heptan zu seinen Strukturisomeren bei einer Betriebstemperatur von 240 anstelle von 400 °C isomerisieren^[2]. Wie das Platin im aktiven Katalysator vorliegt und die Verteilung der reaktiven Intermediate auf der Oberfläche hängen stark von der Vorbehandlung und den Reaktionsbedingungen ab. Daher ist eine In-situ-Messung erforderlich.

Die Positronenemissions-Tomographie (PET) ist eine nicht-invasive, in situ durchzuführende radiochemische Technik, die in der Nuklearmedizin zur Analyse biomedizinischer Funktionen Anwendung findet^[3, 4]. Sie wurde kürzlich von Bridgwater

[*] Prof. Dr. R. A. van Santen, Dr. B. G. Anderson, Dr. R. H. Cunningham
Department of Chemical Engineering and Chemistry
Schuit Institute of Catalysis
Eindhoven University of Technology
P.O. Box 513, 5600 MB Eindhoven (Niederlande)
Telefax: Int. + 40/245 50 54
E-mail: TGTABA@CHEM.TUE.NL
Ir. A. V. G. Mangnus, Dr. L. J. van IJzendoorn, Prof. Dr. M. J. A. de Voigt
Department of Technical Physics
Schuit Institute of Catalysis