

- [7] P. Baxter, J.-M. Lehn, A. DeCian, J. Fischer, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 92; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 69.
- [8] X. Sun, D. W. Johnson, D. L. Caulder, R. E. Powers, K. N. Raymond, E. H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1386; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1303.
- [9] A. J. Amoroso, J. C. Jeffery, P. L. Jones, J. A. McCleverty, P. Thornton, M. D. Ward, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1577; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1443.
- [10] C. Brückner, R. E. Powers, K. N. Raymond, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1937; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1837.
- [11] C. M. Hartshorn, P. J. Steele, *Chem. Commun.* **1997**, 541.
- [12] a) M. Fujita, D. Oguro, M. Miyazawa, H. Oka, K. Yamaguchi, K. Ogura, *Nature* **1995**, *378*, 469; b) T. Kusakawa, M. Fujita, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3327; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3142. c) Für analoge Metallkomplexe mit niedrigerer Symmetrie siehe: M. Fujita, S.-Y. Yu, T. Kusakawa, H. Funaki, K. Ogura, K. Yamaguchi, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2192; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2082.
- [13] N. Takeda, K. Umemoto, K. Yamaguchi, M. Fujita, *Nature* **1999**, *398*, 794.
- [14] B. F. Abrahams, S. J. Egan, R. Robson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3535.
- [15] P. J. Stang, B. Olenyuk, D. C. Muddiman, R. D. Smith, *Organometallics* **1997**, *16*, 3094.
- [16] B. Olenyuk, J. A. Whiteford, A. Fechtenkötter, P. J. Stang, *Nature* **1999**, *398*, 796.

Chemisch modifizierte Antisense-Oligonucleotide: neue Fortschritte auf dem Gebiet der Bindung von RNA und der Aktivierung der Ribonuclease H

Oliver Seitz*

Anfang dieses Jahres wurde das erste Medikament auf Oligonucleotid-Basis, das gegen Zytomegalie-Virus-Retinitis (Netzhautentzündung) wirksame Phosphorothioat ISIS-2922 (Fomivirsen), auf den Markt gebracht. 21 Jahre nach der Einführung des Antisense-Ansatzes könnte dieses neue Medikament als der endgültige Beweis dieses Prinzips dienen.^[1] Beim Antisense-Konzept bindet ein von außen zugegebenes Antisense-Oligonucleotid selektiv an die Ziel-mRNA und blockiert die Translation. Ein großer Teil der Attraktivität dieses Ansatzes beruht auf der Möglichkeit des Designs von RNA-bindenden Molekülen gemäß den gut bekannten Watson-Crick-Basenpaarungsregeln. Somit wäre es möglich, mit diesen maßgeschneiderten Molekülen praktisch jedes (pathogene) Protein nach Belieben auszuschalten. Phosphorothioate, die erste Generation der Antisense-Oligomere, haben eine relativ geringe Bindungsaffinität gegenüber der Ziel-RNA. Aufgrund ihrer erhöhten Membrangängigkeit und ihrer Nucleaseresistenz sind sie dennoch biologisch aktiv. Zudem erkennt Ribonuclease H (RNase H), ein Enzym, das RNA in DNA-RNA-Hybriden spaltet, auch Phosphorothioat-RNA-Hybride und ermöglicht so die Spaltung von mehreren mRNA-Molekülen pro Antisense-Oligomer. Anstatt einen vollständigen Überblick über die Fortschritte in der Antisense-Technologie zu geben, konzentriert sich dieses Highlight auf kürzlich erzielte Verbesserungen bei Schlüsselementen wie der Bindung an RNA und der Aktivierung der RNase H.

Flanagan und Mitarbeiter berichteten über eine eindrucksvolle Verstärkung der Wirksamkeit eines Antisense-Phos-

phorothioats (S-AON).^[2] Ihre 20mer-Einheit mit nur einer Basenmodifikation inhibierte die Expression des *c-ras*-Gens bei nanomolaren Konzentrationen. Dieses kam in einem 25fachen Anstieg der Antisense-Wirksamkeit gegenüber einem zuvor optimierten S-AON-20mer zum Ausdruck, das gegenwärtig in der klinischen Testphase II zur Behandlung von Krebs steht. Der modifizierte Heterocyclus basiert auf einem von Lin und Matteucci synthetisierten Cytosin-Analogon.^[3] Ein tricyclisches Phenoxazin **2** dient als starres Gerüst für das Anbringen von Gruppen, die sich für weitere Wechselwirkungen mit Nucleobasen eignen (Abbildung 1).

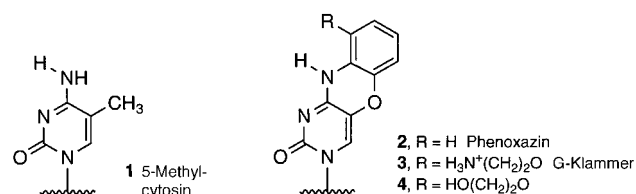


Abbildung 1. Cytosin-Analoga, die bei den Hybridisierungsexperimenten von Lin und Matteucci^[3] (Tabelle 1) verwendet wurden.

Durch Anhängen eines Aminoethoxy-Restes wurde das Phenoxazin mit starken Wasserstoffbrückenbindungs-Donoren versehen (\rightarrow 3), die sowohl die Watson-Crick- als auch die Hoogsteen-Basenpaarungsstellen von Guanin erkennen können; **3** wurde daher als „G-Klammer“ (G-clamp) bezeichnet (Abbildung 2). Die in Abbildung 1 gezeigten Analoga von Cytosin wurden in Antisense-Oligonucleotide (AONs) eingebaut und mit den komplementären Oligodesoxynucleotiden (ODNs) hybridisiert. Die Schmelztemperatur T_M , ein Maß für die thermische Stabilität von doppelsträngigen ODNs, wurde durch Analyse der temperaturabhängigen UV-Absorption bestimmt. Das eine G-Klammer enthaltende AON **3** wies eine deutlich erhöhte Stabilität auf (Tabelle 1),

[*] Dr. Oliver Seitz

Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee 2, D-76128 Karlsruhe
Fax: (+49) 721-608-4825
E-mail: seitz@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de

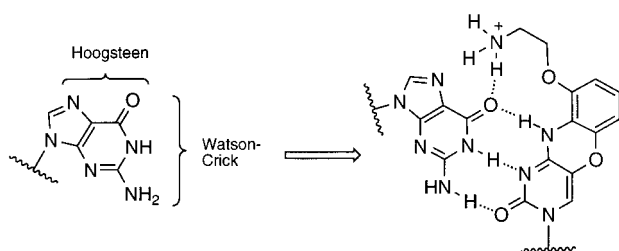


Abbildung 2. Vorgeschlagene Wechselwirkung zwischen der G-Klammer und den Watson-Crick- und den Hoogsteen-Basenpaarungsstellen von Guanosin.

Tabelle 1. Schmelztemperaturen T_M von Hybriden aus AONs, die an einer Position Phenoxazin-modifiziert sind, und komplementären ODNs oder ODNs, die eine falsche Base aufweisen.^[a]

| X | Y = G ^[b] | T_M [°C] (ΔT_M [°C]) | | Y = C ^[c] |
|----------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|
| | | Y = A ^[c] | Y = T ^[c] | |
| 1 (5-Me-C) | 50.5 | 32.0 (–18.5) | 30.0 (–20.5) | 29.0 (–21.5) |
| 2 (Phenoxazin) | 57.0 (+6.5) | 44.5 (–12.5) | 42.0 (–15.0) | 33.0 (–24.0) |
| 3 (G-Klammer) | 68.5 (+18.0) | 45.5 (–23.0) | 41.0 (–27.5) | 40.0 (–28.5) |
| 4 | 51.5 (+1.0) | – | – | – |

[a] Puffer: 0.14 M KCl, 5 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, pH 7.2. Kontroll-AON: 5'-TCTCXTCTC-3'; Ziel-ODN: 3'-AGAGYAGAGAG₅-5'. [b] Komplementäres ODN, ΔT_M relativ zu T_M für X=1. [c] ODN mit einer falschen Base, ΔT_M relativ zu T_M für Y=G.

während das AON mit den nur zu schwachen Wasserstoffbrückenbindungen fähigen Hydroxygruppen (das Phenoxazin **4**) anstelle der Aminogruppen von **3** einen ähnlichen T_M -Wert wie die Stammverbindung (das 5-Methylcytosin **1**) hatte. Um jegliche nichtspezifischen, durch ionische Wechselwirkungen verursachten Effekte auszuschließen, untersuchten die Autoren die Abhängigkeit von T_M von der Salzkonzentration. Anziehende Coulomb-Wechselwirkungen werden normalerweise bei hohen Ionenstärken geschwächt. Die im Vergleich zum 5-Methylcytosin erhöhte Affinität der G-Klammer-modifizierten AONs war jedoch von der Salzkonzentration unabhängig (ΔT_M =16–18 °C im Bereich von 0.014–1.4 M KCl), wodurch die Annahme spezifischer Wasserstoffbrückenbindungen weiter gestützt wurde. Am wichtigsten ist, daß das G-Klammer-AON **3** empfindlicher gegenüber Fehlpaarungen ist als das 5-Methylcytosin-AON **1**, wie durch den Vergleich der T_M -Werte der Hybridisierung ohne und mit Basenfehlpaarung bestimmt wurde (Tabelle 1).

Die stark erhöhte Affinität und Spezifität des Basen-modifizierten G-Klammer-AON wurde in kürzlich durchgeführten In-vivo-Studien bestätigt.^[2] Nierenzellen von afrikanischen Grünen Meerkatzen (CV-1-Zellen) wurden mit einem Plasmid transfiziert, das das Gen für den Inhibitor p27^{kip1} der humanen Cyclin-abhängigen Kinase enthielt, und mit einem Cytofectin und dem Antisense-Phosphorothioat (S-AON) behandelt. Das G-Klammer-modifizierte S-AON **9** (Tabelle 2) inhibierte die p27^{kip1}-Expression um 96 % in einer Konzentration von 30 nM, wie durch Western-Blotting-Analyse von Zellextrakten gemessen wurde. Bei dieser Konzentration bewirkte das zuvor am stärksten wirksame S-AON **8**, das 11 C5-Propinyl-modifizierte Basen enthält (**5** und **6** in Abbildung 3), eine Inhibierung der p27^{kip1}-Expression von

Tabelle 2. RNase-H-Aktivität der Phosphorothioate **7–9**.

| Verb. | Sequenz | Basen-Modifikationen | RNase-H-Spaltung [%] ^[a] |
|-------|--|--------------------------|-------------------------------------|
| 7 | 5'-TGGCTCTCCTGC GCC-3' | keine | 21.7 |
| 8 | 5'-SGG 656566 SG 666 -3' | 5-Propinyluracil/Cytosin | 4.9 |
| 9 | 5'-TGGCTCTC 3 TGC GCC-3' | G-Klammer | 17.4 |

[a] Grad der Spaltung von komplementärer, radioaktiv markierter RNA 5 min nach Behandlung mit nucleären Extrakten aus HeLa-Zellen (Quelle von humaner RNase H).

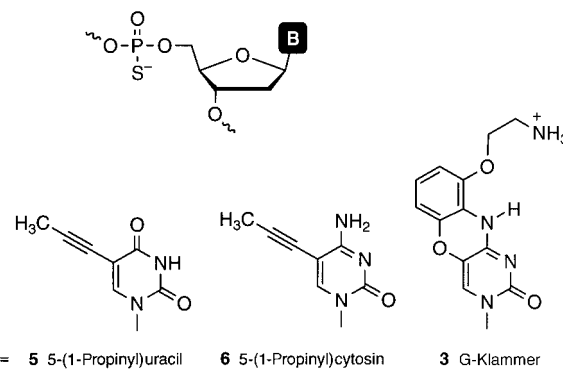


Abbildung 3. Die von Flanagan und Mitarbeitern^[2] in Antisense-Wirkstoffe (Tabelle 2) eingebauten Nucleobasen-Analoga.

67 %. Ein Vergleich der IC₅₀-Werte zeigte, daß der monosubstituierte Strang **9** dreimal so wirksam war wie der mehrfach substituierte Strang **8**. Das Kontroll-S-AON **7** wies unter diesen Bedingungen keine Inhibitoraktivität auf. Die Sequenzspezifität des G-Klammer-S-AON **9** wurde durch Transfektion der CV-1-Zellen mit dem Wildtyp-p27-Plasmid oder einem p27-Plasmid, das eine Einzelbasenpaarmutation enthielt, untersucht. Diese Mutation änderte das komplementäre Guanin in der transkribierten mRNA in eine Uracil-Gruppe. Das G-Klammer-S-AON **9** inhibierte die Expression der Einzel-Mutante von p27^{kip1} mit einem IC₅₀-Wert, der nur ein Fünftel des Wertes für die Inhibierung des p27^{kip1}-Wildtyps betrug. Im Unterschied dazu war die Inhibierung des p27^{kip1}-Wildtyps und der Mutante nahezu identisch, wenn das C5-Propinyl-substituierte S-AON **8** eingesetzt wurde. Die erhöhte Antisense-Aktivität des G-Klammer-S-AON **9** war bei Gel-shift-Assays noch offensichtlicher. Das weniger wirksame C5-Propinyl-substituierte S-AON **8** wies eine Affinität gegenüber der Ziel-RNA auf, die nahezu zweimal so hoch war wie die von **9**. Es wurde deshalb angenommen, daß die differentielle Induktion von RNase H eine wichtige Rolle spielt. Der RNase-H-Spaltungs-Assay zeigte, daß der G-Klammer-S-AON · RNA-Heteroduplex 3.5mal schneller abgebaut wurde als der C5-Propinyl-substituierte S-AON · RNA-Heteroduplex und fast genauso schnell wie der unmodifizierte Duplex mit **7** (Tabelle 2). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Aktivierung der RNase H von größter Wichtigkeit für die Antisense-Aktivität ist.

Nahezu alle Nuclease-resistenten Antisense-Oligonucleotide, die sich derzeit in klinischen Testphasen befinden, enthalten modifizierte Phosphodiesterückgrate. Die Veränderung der natürlichen D-2-Deoxyribose selbst kann jedoch ebenfalls AONs mit erhöhter Stabilität gegenüber dem Ab-

bau durch Nucleasen liefern. Leider war keines der einheitlich Zucker-modifizierten AONs in der Lage, die durch RNase H katalysierte Spaltung von mRNA zu induzieren. Damha und Mitarbeiter beschrieben eine Klasse von RNase-H-aktivierenden AONs, die auf Arabinose, dem 2-Epimer von Ribose, basierten.^[4] Es wurde gezeigt, daß die durch Substitution der 2'-OH-Gruppe von Arabinonucleinsäuren (ANAs) mit Fluor erhältlichen 2'-Desoxy-2'-fluor- β -D-arabinonucleinsäuren (2'F-ANAs) eine deutlich erhöhte Affinität gegenüber komplementärer RNA aufwiesen (Abbildung 4). Die Schmelz-

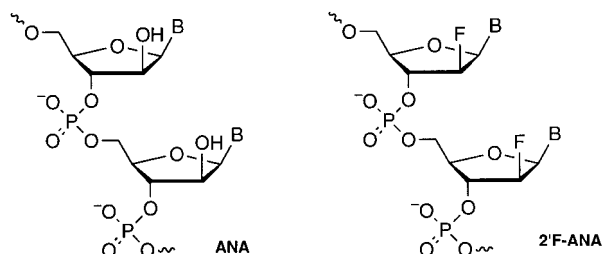


Abbildung 4. Strukturformeln von Arabinonucleinsäuren (ANAs) und 2'-Desoxy-2'-fluorarabinonucleinsäuren (2'F-ANAs). – (B = Nucleobase).

punkte der Heteroduplexe aus RNA und den 2'F-ANAs **10** und **14** waren z. B. signifikant erhöht im Vergleich zu denen der mit den ANAs **11** und **15** oder den DNA-Strängen **12** und **16** gebildeten Hybriden (Tabelle 3). Der höhere T_M -Wert der Heteroduplexe von RNA mit den 2'F-ANAs **10** und **14**

Tabelle 3. Schmelztemperaturen T_M der Duplexe aus Arabinonucleinsäuren und RNA sowie der Kontroll-Duplexe DNA · RNA und S-ODN · RNA.^[a]

| AON-Sequenz | Rückgrat-Modifikation | T_M [°C] |
|---------------------------|-------------------------------|------------------|
| 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' | 2'F-ANA, 10 | 44 |
| | ANA, 11 | – ^[b] |
| | DNA, 12 | 39 |
| | S-DNA, 13 | 21 |
| 5'-TTATATTTTTCCTTCCC-3' | 2'F-ANA, 14 | 65 |
| | ANA, ^[c] 15 | 32 |
| | DNA, 16 | 51 |
| | S-DNA, 17 | 38 |

[a] Puffer: 0.14M KCl, 5mM Na₂HPO₄, 1M MgCl₂, pH 7.2. [b] Nicht detektierbar. [c] Enthält Uracil anstelle von Thymin.

verglichen mit den entsprechenden Hybriden der Phosphorothioaten **13** und **17** ist ebenfalls erwähnenswert. Weiterhin ähneln die Circular-Dichroismus(CD)-Spektren der ANA · RNA- und 2'F-ANA · RNA-Duplexe stark denen der zugrundeliegenden DNA · RNA-Duplexe, was in beiden Fällen das Vorhandensein einer Helix vom A-Typ nahelegt. Man nimmt an, daß die spezifische Erkennung der A-Helix von DNA · RNA-Duplexen durch RNase H die selektive Hydrolyse dieser Duplexe sogar in Gegenwart von RNA · RNA- oder DNA · DNA-Duplexen induziert. Tatsächlich induzierte die 2'F-ANA **10** die durch RNase H katalysierte Spaltung der radioaktiv markierten Ziel-RNA, ähnlich wie das AON **12** und das S-AON **13**. Weder die Duplexe der epimeren 2'-Desoxy-2'-fluorribonucleinsäuren (2'F-RNAs) noch die entsprechenden Duplexe mit RNA, noch RNA allein wurden

gespalten. Interessanterweise waren ANA · RNA-Duplexe schlechte Substrate für RNase H, ein Ergebnis, das auf die geringe Stabilität dieser Duplexe zurückgeführt wurde. Die 2'F-ANAs sind die erste Klasse von einheitlich Zucker-modifizierten Antisense-Oligonucleotiden, die eine erhöhte Affinität gegenüber ihrer Ziel-RNA aufweisen und dabei die RNase H unvermindert induzieren können. Man muß jedoch anmerken, daß dieses Kriterium auch von Antisense-Oligomeren erfüllt wird, die ein uneinheitliches Rückgrat haben. So sind auch Chimären aus DNA und Peptidnucleinsäuren (PNAs) Substrate für RNase H.^[5]

Obwohl die Bedeutung der Induktion von RNase H betont wurde, steht immer noch zur Diskussion, ob eine hochaffine Bindung an mRNA allein genügen könnte, um die Translation zu inhibieren. Eine deutliche Erhöhung der Bindungsaffinität für RNA und der Nucleaseresistenz wäre hier von zentraler Bedeutung. Bemerkenswerterweise wurden für Modifikationen mit veränderten Internucleotid-Bindungen wie für 3'-Thioformacetal-,^[6] Methylen(methylimino)- (MMI)^[7] und Methylenamid-Spacer^[8] stabile Hybridbindungen mit RNA gefunden. Ähnlich weisen auch Zucker-modifizierte Oligomere wie 2'-O-Alkylribonucleoside,^[9] Hexitolnucleoside^[10] oder α -Nucleoside^[11] eine hohe Affinität der Bindung an RNA auf. Zu den erfolgreichen Beispielen, bei denen das gesamte Ribose-Phosphat-Rückgrat durch ein künstliches Rückgrat ersetzt wurde, gehören Morpholinphosphorodiamidate^[12] und Peptidnucleinsäuren.^[13] Ein alternativer, von Leumann et al. eingeführter Ansatz nutzt ODN-Analoga mit erhöhter Starrheit.^[14] Die eingeschränkte konformative Flexibilität verringert die Entropie ΔS der Paarung, was in einer günstigeren Standardenthalpie ΔG der Duplexbildung resultiert. Diesbezüglich wurden mehrere Basenpaarungssysteme beschrieben.^[15] Das jüngste Beispiel eines konformativ eingeschränkten Watson-Crick-Basenpaarungssystems, die fixierten Nucleinsäuren (locked nucleic acids, LNAs), wurde von Wengel und Mitarbeitern vorgestellt (Abbildung 5).^[16]



Abbildung 5. Strukturformel einer fixierten Nucleinsäure (LNA; links) und postulierte Fixierung der Zuckereinheit in der gewellten C3'-endo-Konformation (rechts).

Die Methylenbrücke, die das 2'-Sauerstoffatom mit dem 4'-Kohlenstoffatom verbindet, fixiert den Zucker in der für den RNA · RNA-Duplex vom A-Typ charakteristischen C3'-endo-Konformation, wie anhand des CD-Spektrums eines LNA · RNA-Duplex gezeigt wurde.^[17] Die Hybridisierung des LNA-Nonamers **19** mit dem komplementären DNA-Nonamer ergab einen Duplex mit einer beispiellosen thermodynamischen Stabilität. Der T_M -Wert war um 36 °C größer als der des Duplex aus **18** und seinem komplementären DNA-Oligonucleotid (Tabelle 4).^[18] Das Hybrid **19** · RNA hatte sogar eine noch größere thermische Stabilität ($\Delta T_M = 46$ °C) im Vergleich zum DNA · RNA-Duplex. Die Einführung einer ein-

Tabelle 4. Schmelztemperaturen T_M von LNA·DNA-, LNA·RNA- und LNA·LNA-Duplexen sowie von DNA·DNA- und DNA·RNA-Kontroll-Duplexen.^[a]

| Verb. | AON-Sequenz | AON-Typ | komplemen- täres ODN | T_M [°C] (ΔT_M [°C]) |
|-----------|---------------------------------|---------|-------------------------|---------------------------------|
| 18 | 5'-d(GTG ATATGC)-3' | DNA | DNA | 28 (–) |
| | | | RNA | 28 (–) |
| 19 | 5'-GTG ATATG ^{Me} C-3' | LNA | DNA | 64 (36) |
| | | | RNA | 74 (46) |
| | | | LNA | 93 ^[b] (> 65) |

[a] Puffer: 0.1M NaCl, 10mM Na₂HPO₄, pH 7.0. [b] Ein Puffer niedriger Ionenstärke (1mM Na₂HPO₄, pH 7.0) mußte verwendet werden, weil die Duplex-Dissoziation bei Verwendung des Standardpuffers nicht detektiert werden konnte.

zigen Basenfehlpaarung führte zu einer Abnahme des T_M -Wertes um 12–14 °C, eine zufriedenstellende Selektivität, die der sehr hohen Bindungsaffinität von LNA gegenüber der Ziel-DNA oder -RNA Rechnung trägt. Bislang stellt die LNA·LNA-Hybridisierung das thermisch stabilste Duplexsystem vom Nucleinsäure-Typ dar, wie anhand des T_M -Wertes von 93 °C für den Duplex von **19** mit seinem komplementären LNA-Strang deutlich wird.^[17]

Die hier beschriebenen Beispiele zeigen, daß die Schlüsselemente der Antisense-Technologie, wie die Affinität und Selektivität der RNA-Bindung, die RNase-H-Induktion und auch die Nucleaseresistenz, noch verbessert werden können. Der gemeinsame Einsatz dieser verschiedenen Strategien bietet vielversprechende Möglichkeiten für die Entwicklung einer neuen Generation von Antisense-Wirkstoffen, was vielleicht am besten durch die erfolgreiche Kombination der Phosphorothioat-Methode mit der Verwendung von G-Klammer-modifizierten Basen demonstriert wurde.

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3466–3469

Stichwörter: Antisense-Wirkstoffe • Nucleinsäuren • Nucleobasen • Ribonucleasen • Translation

- [1] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 280–284.
- [2] W. M. Flanagan, J. J. Wolf, P. Olson, D. Grant, K.-Y. Lin, R. W. Wagner, M. D. Matteucci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 3513–3518.
- [3] K.-Y. Lin, M. D. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8531–8532.
- [4] M. J. Damha, C. J. Wilds, A. Noronha, I. Brukner, G. Borkow, D. Arion, M. A. Parniak, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12976–12977.
- [5] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2954–2983; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2796–2823.
- [6] R. J. Jones, K.-Y. Lin, J. F. Milligan, S. Wadwani, M. D. Matteucci, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2983–2991.
- [7] F. Morvan, Y. S. Sanghvi, M. Perbost, J.-J. Vasseur, L. Bellon, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 255–256.
- [8] A. De Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreas, P. Hoffmann, V. Fritsch, R. Wolf, S. Freier, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 237–240; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 226–229.
- [9] a) H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 6131–6148; b) K. H. Altmann, N. M. Dean, D. Fabbro, S. M. Freier, T. Geiger, R. Haner, D. Husken, P. Martin, B. P. Monia, M. Muller, F. Natt, P. Nicklin, J. Phillips, U. Piele, H. Sasmor, H. E. Moser, *Chimia* **1996**, 50, 168–176.
- [10] C. Hendrix, H. Rosenmeyer, I. Verheggen, F. Seela, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 110–121.
- [11] C. Gagnor, J.-R. Bertrand, S. Thenet, M. Lemaître, F. Morvan, B. Rayner, C. Malvy, B. Lebleu, J.-L. Imbach, C. Paoletti, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 10419–10436.
- [12] H. Wang, D. D. Weller, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 31, 7385–7388.
- [13] B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 5–23.
- [14] Bicyclo-DNA: M. Tarköy, M. Bolli, C. J. Leumann, *Helv. Chim. Acta* **1994**, 77, 716–744. Tricyclo-DNA: R. Steffens, C. J. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3249–3255.
- [15] A. Eschenmoser, *Science* **1999**, 284, 2118–2124.
- [16] S. K. Singh, P. Nielsen, A. A. Koshkin, J. Wengel, *Chem Commun.* **1998**, 455–456.
- [17] A. A. Koshkin, P. Nielsen, M. Meldgaard, V. K. Rajwanshi, S. K. Singh, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 13252–13253.
- [18] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, 54, 3607–3630.