

38. Ein neuer Zugang zu 2'-O-Alkylribonucleosiden und Eigenschaften deren Oligonucleotide

von Pierre Martin

Zentrale Forschungslaboratorien der Ciba-Geigy AG, CH-4002 Basel

(30.XII.94)

A New Access to 2'-O-Alkylated Ribonucleosides and Properties of 2'-O-Alkylated Oligoribonucleotides

A general access to 2'-O-alkylated ribonucleosides using the key intermediate **5** is presented. The incorporation of 2'-O-'ethyleneglycol'- and 2'-O-'glycerol'-substituted (*i.e.*, 2'-O-(2-hydroxyethyl)- and 2'-O-(2,3-dihydroxypropyl)-substituted) ribonucleosides into oligonucleotides affords a new generation of oligonucleotides with high affinity for RNA, high specificity, and increased nuclease resistance.

1. Einleitung. – Die Hemmung der Translation durch die selektive Bindung von Antisens-Oligonucleotiden an komplementäre Boten-RNS erlaubt im Prinzip die rationale Planung einer neuen Generation von Heilmitteln [1–5]. Die zu überwindenden Hürden für eine praktische Anwendung sind hoch: Die Oligonucleotide müssen membranfähig und gegen Nucleasen stabil sein, eine hohe Affinität für RNS zeigen (Hybridisierung, Bildung stabiler Duplex-Strukturen) und eine hohe Diskriminierung (Spezifität) zwischen Zielsequenz und anderen Sequenzen aufweisen. Dies wird nur bei Verwendung von synthetisch abgewandelten Nucleinsäuren zu erreichen sein [4].

Oligonucleotide mit Substitution der 2'-OH-Gruppe der Ribose-Einheit durch 2'-O-Methyl-, 2'-O-Propyl- und 2'-O-Allyl-Einheiten zeigen erhöhte Nucleasestabilitäten ohne nennenswerte Affinitätsverluste¹⁾ [6]. Ein guter Zugang zu diesen bekannten 2'-O-Alkylribonucleosiden sowie anderen, neuen Derivaten wird hier beschrieben. Von den Oligonucleotiden, welche diese neuen Bausteine enthalten, zeigen insbesondere die Ethyleneglycol- und Glycerin-Derivate überraschende Eigenschaften, die ebenfalls hier diskutiert werden.

2. Synthese von 2-O-Alkylribonucleosiden. – *Ribose 5 als Zwischenprodukt.* Diverse Bemühungen zur Methylierung der 2'-OH-Gruppe von Ribonucleosiden sind bekannt geworden: mittels Organozinn-Verbindungen [7], Diazomethan [8], MeI/Ag₂O [9] und MeI/BEMP²⁾ bzw. NaH [10]. Um eine selektive Alkylierung in die 2'-Position zu erreichen, wird oft die teure 3',5'-überbrückende Disiloxan-Schutzgruppe von *Markiewicz* [11] verwendet, so auch für die Alkylierung mittels Allyl-bromid/BEMP oder Allyl-carbonat/Pd⁰ [12] sowie für die Alkylierung mit Bromoessigester [13]. Ein genereller Nachteil bei Verwendung von Ribonucleosiden als Ausgangsmaterial ist ausserdem die Beschränkung auf die natürlichen Ribonucleinbasen Uracil, Cytosin, Adenin und Guanin.

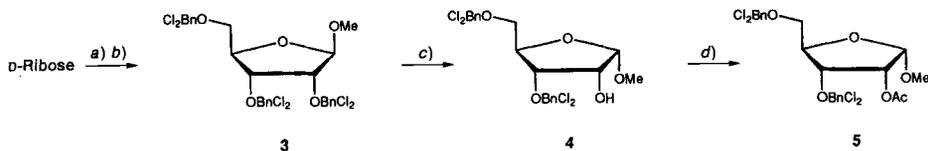
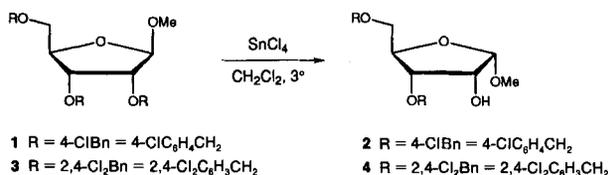
¹⁾ Im Falle der 2'-MeO-substituierten Oligonucleotide tritt eine Erhöhung der Affinität gegen RNS auf [6].

²⁾ 2-[(*tert*-Butyl)imino]-2-(diethylamino)perhydro-1,3-dimethyl-1,3,2-diazaphosphorin.

Eine attraktive Alternative ist eine 2',3'-differenziert substituierte Ribofuranose als Zwischenprodukt, die die Einführung beliebiger Basen ermöglicht, es aber erlaubt, das Problem der Anomerisierung/Isomerisierung bei der Glycosylierungsreaktion zu umgehen. Ausgangsprodukt sollte ein Ribofuranosyl-Derivat sein, welches in 2'-Position eine dirigierende *O*-Acylgruppe³⁾ und in 3'- und 5'-Position eine bei der späteren Alkylierung nicht wandernde⁴⁾ und stabile Schutzgruppe aufweist.

Eine interessante regiospezifische Debenzylierung des einfach zugänglichen tris(4-chlorobenzyl)-substituierten Ribose-Derivates **1** zu **2** ist in [16] beschrieben. Aufgrund der günstigeren Aufarbeitung in Vor- und Folgestufen (Kristallisation statt Chromatographie) verwendeten wir für diese Reaktion die 2,4-Dichlorobenzyl-Schutzgruppe (BnCl₂; vgl. *Schema 1*, **3**→**4**). Nach Acetylierung der freien 2'-OH-Gruppe in **4** steht mit **5** eine kristalline Ribofuranose zur Verfügung, die den oben gestellten Anforderungen genügt.

Schema 1



a) MeOH, H₂SO₄, 4°. b) 2,4-Dichlorobenzyl-chlorid, NaH, DMF, 40°. c) SnCl₄, CH₂Cl₂, 3°. d) Ac₂O, Pyridin, DMAP.

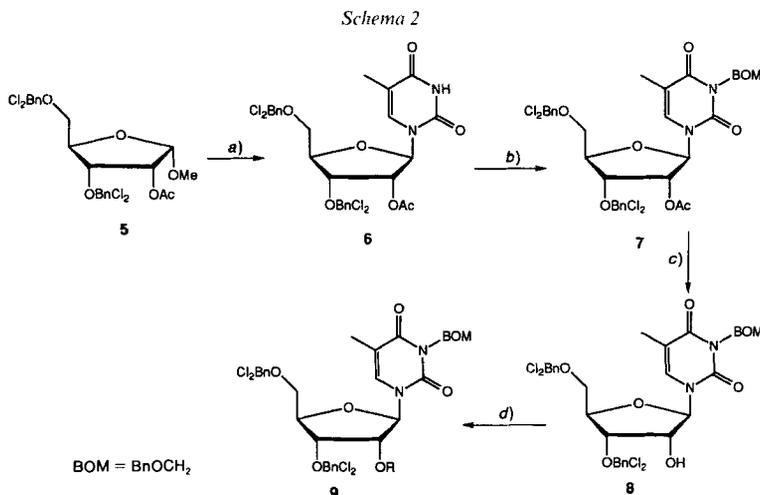
2'-O-Alkyl-β-D-ribofuranosylthymine. Die Ribosylierung von *in situ* erzeugtem Bis(trimethylsilyl)thymine mit **5** in Gegenwart von Trimethylsilyl-trifluoromethansulfonat (TfOSiMe₃) nach der Methode von *Vorbrüggen* [17] lieferte in über 70% Ausbeute das kristalline **6**, dessen N(3) anschliessend mit der [(Benzyloxy)methyl](BOM)-Gruppe geschützt wurde (→**7**). Nach der Abspaltung der 2'-*O*-ständigen Acetyl-Gruppe mit NaOMe konnte die freie 2'-OH-Gruppe in **8** mit einer grossen Zahl von Halogeniden oder Tosylaten in Gegenwart von NaH zu **9** alkyliert werden (vgl. *Schema 2* und *Tab. 1*).

Erwartungsgemäss ergaben die *O*-Alkylierungen mit aktivierten und primären Bromiden (bzw. Iodiden und Tosylaten) gute Ausbeuten. Diese sanken bei Verwendung von

³⁾ Nichtpartizipierende Gruppen in 2'-Stellung wie H, MeO *etc.* führen zu α/β-Gemischen [14] (ausser bei Verwendung von α-Halogen-Verbindungen unter Bedingungen der S_N2-Substitution).

⁴⁾ Die Disiloxan-Schutzgruppe nach *Markiewicz* [11] überlebt nach unseren Erfahrungen die Alkylierungsreaktion mittels NaH nicht ohne beträchtliche Freisetzung der 3'-OH-Gruppe. Die 3'- und 5'-*O*-Acyl-Schutzgruppen wandern im alkalischen Milieu in die freie 2'-OH-Position, vgl. z. B. [15].

Chloriden und von sekundären Halogeniden ab. Die nur mässigen Ausbeuten im Falle der Isopropyliden-geschützten Glycerin-Derivate (= 2'-O-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl-Derivate) **9k** und **9l** führen wir auf sterische Hinderung zurück. Für alle in *Tab. 1* wiedergegebenen β -Ribosylthymidin-Derivate weisen die kleinen Kopplungskonstanten $J(1',2')$ (0–4 Hz) und die relativ grossen Kopplungskonstanten $J(3',4')$ (6–9 Hz) auf eine ausgeprägte C(3')-endo-Konformation [18] hin.



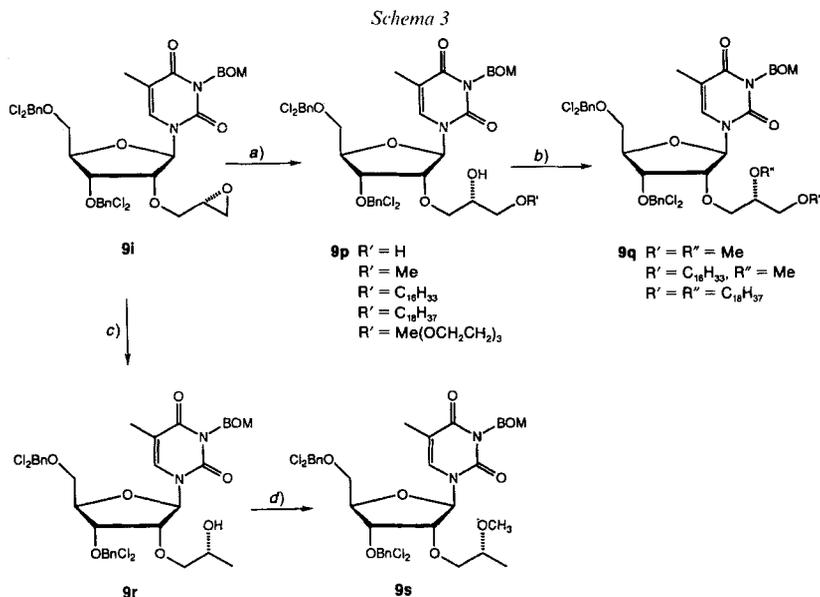
a) Thymin, Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA), TfOSiMe₃, ClCH₂CH₂Cl, 70°. b) (Benzyloxy)methyl-chlorid (BOM-Cl), 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), MeCN. c) NaOMe, MeOH. d) RX, NaH, THF, 30–70°.

Tab. 1. Alkylierung (RX, NaH, THF, 40–70°) von **8**. Vgl. Schema 2.

R	X	Ausbeute [%]	¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃) ^{a)}		MS (CI oder FAB)
			H–C(1')	typische Signale von R	
9a Me	I	98	5,95 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,5)	3,60 (<i>s</i> , Me)	726 [<i>M</i> + NH ₄] ⁺
b Pr	Br	67	5,96 (<i>s</i>)	0,90 (<i>t</i> , Me)	754 [<i>M</i> + NH ₄] ⁺
c CH ₂ =CHCH ₂	Br	88	5,96 (<i>d</i> , <i>J</i> < 1,5)		752 [<i>M</i> + NH ₄] ⁺
d i-Pr	Br	20	5,91 (<i>d</i> , <i>J</i> = 4,5)	1,20, 1,25 (2 <i>d</i> , <i>J</i> = 7, 2 Me)	771 [<i>M</i> + Cl] [–]
e MeOCH ₂ CH ₂	Br	83	5,93 (<i>s</i>)	3,26 (<i>s</i> , Me)	712 [<i>M</i> + NH ₄] ⁺
f Me(OCH ₂ CH ₂) ₂	Br	89	5,97 (<i>s</i>)	3,37 (<i>s</i> , Me)	814 [<i>M</i> + NH ₄] ⁺
g Me(OCH ₂ CH ₂) ₃	Br	76	5,97 (<i>s</i>)	3,34 (<i>s</i> , Me)	858 [<i>M</i> + NH ₄] ⁺
h Me(OCH ₂ CH ₂) ₄	Cl	24	5,96 (<i>s</i>)	3,39 (<i>s</i> , Me)	902 [<i>M</i> + NH ₄] ⁺
i [(2 <i>R</i>)-Oxiran-2-yl]methyl	TsO	72	5,91 (<i>s</i>)		785 [<i>M</i> + Cl] [–]
k [(4 <i>R</i>)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]methyl	TsO	35	5,91 (<i>s</i>)	1,33, 1,40 (2 <i>s</i> , 2 Me)	826 [<i>M</i> + NH ₄] ⁺
l [(4 <i>S</i>)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]methyl	TsO	34	5,92 (<i>s</i>)	1,33, 1,37 (2 <i>s</i> , 2 Me)	826 [<i>M</i> + NH ₄] ⁺
m 4-(Phthalimido)butyl	Br	64	5,93 (<i>d</i> , <i>J</i> < 1,5)		913 [<i>M</i> + NH ₄] ⁺
n MeOOCCH ₂	Br	97	5,92 (<i>s</i>)	3,77 (<i>s</i> , Me)	784 [<i>M</i> + NH ₄] ⁺
o C ₁₀ H ₂₁ (OCH ₂ CH ₂) ₃	Br	61	5,93 (<i>d</i> , <i>J</i> < 1,5)	0,89 (<i>t</i> , Me)	967 [<i>M</i> + H] ⁺

^{a)} δ in ppm, *J* in Hz.

Die Epoxy-Verbindung **9i**⁵⁾ erwies sich als ein wertvolles Zwischenprodukt. Unter BF_3 -Katalyse liess sich H_2O oder $\text{R}'\text{OH}$ endständig an **9i** addieren (\rightarrow **9p**, $\text{R}=\text{H}$, Me , $\text{Me}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3$, $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ etc.; vgl. *Schema 3*). Die so erhaltenen Glycerin-Derivate **9p** wurden zum Teil weiter zu **9q** alkyliert. Mit NaBH_4 , ebenfalls unter Zusatz von BF_3 , wurde das Epoxid **9i** ausschliesslich (endständig) zum Propylenglycol-Derivat **9r** reduziert, welches weiter zu **9s** alkyliert wurde. Nach Entfernen der BOM-Schutzgruppe (H_2 ,



a) $\text{R}'\text{OH}$, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 . b) $\text{R}'\text{X}$, NaH , THF, $50\text{--}70^\circ$. c) NaBH_4 , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, THF. d) MeI , NaH , THF, 30° .

Pd/C)⁶⁾ und den BnCl_2 -Gruppen in 3'- und 5'-Position (H_2 , Pd/C und NaOAc - oder MgO -Zusatz als HCl -Fänger)⁷⁾⁸⁾ wurden die freien Nucleoside **11** zur Verwendung als Monomer-Bausteine für die automatische Oligonucleotid-Synthese auf übliche Art und Weise [19] trityliert (mit 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-chlorid, $(\text{MeO})_2\text{TrCl}$) und in ihre diastereoisomeren Phosphoramidite **12** übergeführt (vgl. *Schema 4*).

Umwandlung von 2'-O-alkylierten Ribosylthyminen in 5-Methylcytidine. Statt der Ribosylierung von silyliertem Cytosin mit **5** und der Wiederholung der zu **6–12** analogen Stufen mit C statt T wurden die Ribosylthyminderivate **12** (Phosphoramidite!) mit 1,2,4-*H*-Triazol, POCl_3 , DMF und NEt_3 in THF direkt in die maskierten 5-Methylcytidine **13** übergeführt⁹⁾ (*Schema 4*). Die Triazolyl-Funktion in **13** wurde im Oligonucleotid

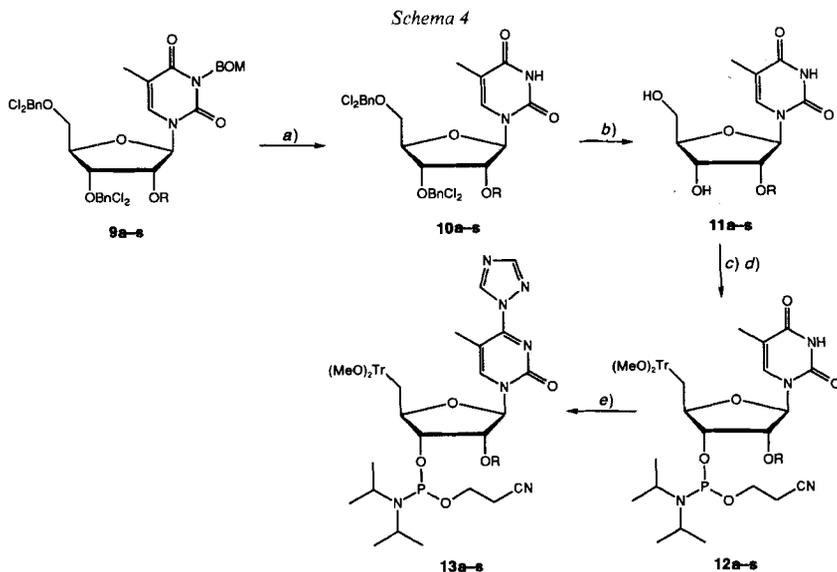
⁵⁾ Bei der Alkylierung mit (*R*)-Glycidyl-tosylat (= (*R*)-Oxiranmethyl-tosylat) bleibt die Konfiguration am Epoxid-Ring in **9i** erhalten, was durch die nachträgliche Transformation von **9i** zu **9k** bewiesen wurde.

⁶⁾ In den meisten Fällen musste das Hydriergemisch mit NaOMe nachbehandelt werden, um die primär entstehende *N*-(Hydroxymethyl)-Verbindung zu zersetzen.

⁷⁾ Ohne Basenzusatz erfolgte die Reduktion unter gleichzeitiger (säurekatalysierter) Abspaltung von Thymin.

⁸⁾ Die Reihenfolge der Reduktionsschritte ist die folgende: als erstes werden alle 4 Cl-Atome in **10** durch H-Atome ersetzt; dann wird die O^5 -Benzyl-Gruppe, am Schluss die O^3 -Benzyl-Gruppe abgespalten.

⁹⁾ Diese Umwandlung wurde erstmals in [20] beschrieben.



a) 1. H_2 , 5% Pd/C, THF; 2. NaOMe, MeOH. b) H_2 , 5% Pd/C, NaOAc oder MgO, MeOH, 3 bar, 45°. c) Dimethoxytrityl-chlorid ((MeO)₂Tr-Cl), Pyridin. d) Diisopropylammonium-tetrazolid, (2-Cyanoethyl)-*N,N,N',N'*-tetrakisopropylphosphorodiamidit, CH_2Cl_2 . e) 1*H*-1,2,4-Tetrazol, NEt_3 , $POCl_3$, MeCN.

bei der üblichen Ammoniak-Behandlung in die NH_2 -Gruppe umgewandelt¹⁰). In günstigen Fällen liessen sich die Triazolyl-Derivate 13 mit Hexan ausfällen; bei Vorhandensein von längeren Alkoxy-Ketten in der 2'-Position wurde durch rasche Chromatographie an Kieselgel gereinigt.

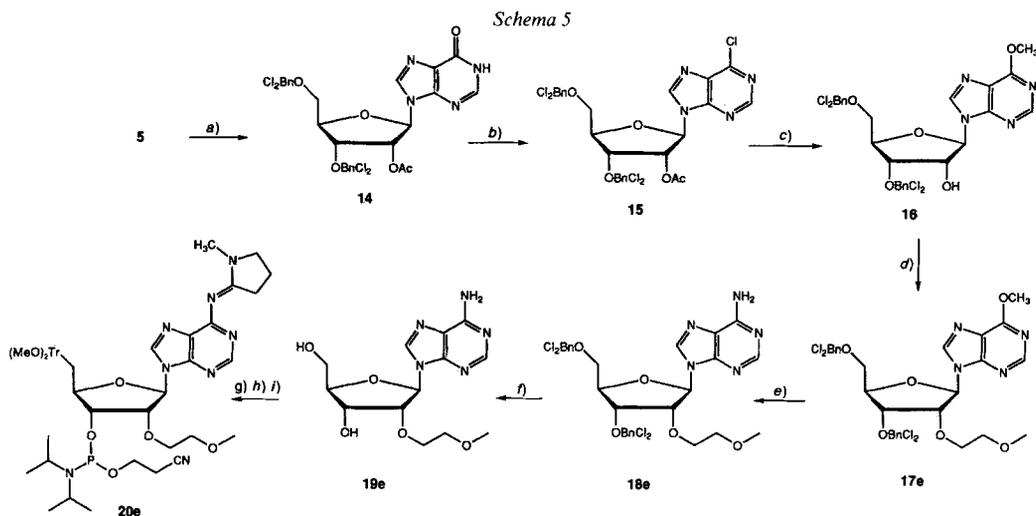
2'-*O*-Alkyladenosine. Obwohl die direkte Ribosylierung von *N*⁶-geschütztem Adenin mit 5 (in mässigen Ausbeuten) möglich ist, traten bei der späteren Alkylierung der 2'-OH-Funktion stets Probleme auf (*N*⁶-Alkylierung, Verlust der *N*⁶-Acyl-Schutzgruppe etc.). Bessere Erfahrungen machten wir mit der Ribosylierung von Hypoxanthin zum entsprechenden Inosin-Derivat 14 (Schema 5). Die anschliessende Überführung in die 6-Chloropurin-Verbindung 15¹¹) verlief in quantitativer Ausbeute. Die Freisetzung der 2'-OH-Gruppe mittels NaOMe/MeOH wurde am besten derart geführt, dass gleichzeitig das 6-ständige Cl-Atom durch die MeO-Gruppe substituiert wurde (→16). Verbindung 16 eignete sich gut für Alkylierungen der 2'-OH-Gruppe in Gegenwart von NaH als Base; mit (Bromoethyl)-methyl-ether bildete sich so z. B. 17e. Behandlung von 17e mit NH_3 bei 120° (→18e) und Entfernen der 2,4-Dichlorobenzyl-Schutzgruppen mittels H_2 /Pd/C in Gegenwart von MgO ergaben 19e¹²). Die Umwandlung des freien Adenosins 19e in den

¹⁰) Weder bei der Behandlung von 13 selbst noch von im Oligonucleotid eingebautem 13 mit konz. NH_3 -Lösung wurde die Konkurrenzreaktion (d. h. Rückreaktion) mit H_2O zu den entsprechenden Thymin-Derivaten 12 beobachtet.

¹¹) Diese Verbindung liess sich auch direkt durch Glycosylierung von allerdings teurem 6-Chloropurin mit 5 herstellen.

¹²) Die Reihenfolge der NH_3 -Behandlung und die reduktive Entfernung der 3',5'-Schutzgruppen kann auch umgekehrt werden. In der Folge wird der Übersichtlichkeit wegen nur die Sequenz mit der $MeOCH_2CH_2O$ -Gruppe in 2'-Position diskutiert (e-Reihe).

für die automatisierte Oligonucleotid-Synthese geeigneten Monomer-Baustein erfolgte am besten durch die Einführung der von *N*-Methylpyrrolidin hergeleiteten Amidin-Schutzgruppe [21] an N⁶ mit anschließender Tryptilyerung und Überführung in das Phosphoramidit **20e**.



a) Hypoxanthin, BSA, TfOSiMe₃, ClCH₂CH₂Cl, 70°. b) SOCl₂, DMF, CH₂Cl₂, 55°. c) NaOMe, MeOH, THF. d) (2-Bromoethyl)-methyl-ether, NaH, THF, 60°. e) NH₃, MeOH, 120°. f) H₂, 5% Pd/C, MgO, MeOH, 3 bar, 45°. g) 1-Methyl-2,2-dimethoxy-pyrrolidin, MeOH. h) (MeO)₂Tr-Cl, Pyridin. i) (2-Cyanoethyl)-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidit, Diisopropylammonium-tetrazolid, CH₂Cl₂.

2'-O-Alkylguanosine. Die beste bekannte Synthese von 2'-*O*-Methyl- und 2'-*O*-Allyl-guanosin ist die Biotransformation der entsprechenden 2-Aminoadenosine mit Adenosindesaminase [10] [12]. Da der Einfluss der Alkyl-Grösse in der 2'-*O*-Position auf die Erkennungsmöglichkeit des Enzyms und auf die kinetischen Grössen der enzymatischen Reaktion unbekannt ist, entschlossen wir uns zu einer chemischen Herstellung der Titelverbindungen (Schema 6). Bald wurde klar, dass für die 2'-*O*-Alkylierung (mittels NaH) von Guanosin das Schützen der OH-Gruppe an C(6) nötig und kritisch war; gute Erfahrungen machten wir mit der basenstabilen Benzyl-Gruppe. So wurde vorgängig zur Ribosylierung das bekannte *N*²-Isobutyryl-9-acetyl-geschützte Guanin [22] in einer Mitsunobu-Reaktion mit Benzylalkohol umgesetzt. Nach der Abspaltung der 9-Acetyl-Gruppe (→**21**) wurde *in situ* silyliert, mit **5** ribosyliert (→**22**) und mit gas-förmigem NH₃ in MeOH in der 2'-*O*-Position desacetyliert, wobei auch die *N*²-Isobutyryl-Gruppe abgespalten wurde (→**23**)¹³. Anschliessende Umsetzung von **23** mit *N*-Methyl-2,2-dimethoxy-pyrrolidin ergab in quantitativer Ausbeute das stabile Amidin **24**, das für die Alkylierung der 2'-OH-Funktion gut geeignet war. Die Reaktion mit (2-Bromoethyl)-methyl-ether in Gegenwart von NaH lieferte das Methoxyethoxy-Derivat **25e**¹⁴. Die Entfer-

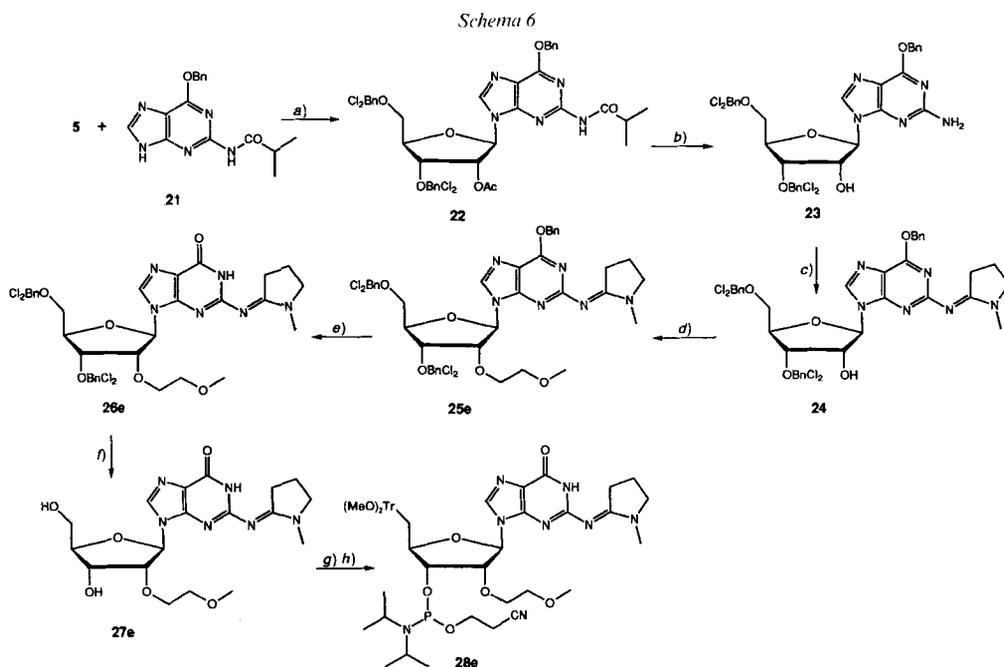
¹³) Wurde für die Freisetzung der 2'-*O*-Acetyl-Gruppe NaOMe statt NH₃ verwendet, wurde einerseits die Benzyloxy-Gruppe teilweise durch die MeO-Gruppe und andererseits die Isobutyryl-Gruppe durch die Acetyl-Gruppe ausgetauscht.

¹⁴) In der Folge wird nur die e-Reihe mit der MeOCH₂CH₂O-Gruppe in 2'-Position diskutiert.

nung der O^6 -Benzyl-Gruppe mit $H_2//Pd$ in THF und die Freisetzung der 3'- und 5'-OH-Funktionen mit $H_2//Pd$ in Gegenwart von MgO in MeOH ergaben das teilweise entschützte Guanosin **27e**, welches auf übliche Art und Weise [19] in das entsprechende Phosphoramidit **28e** übergeführt wurde.

Vor- und Nachteile der Synthese. Das auch in grossen Mengen¹⁵⁾ gut zugängliche Ribofuranose-Derivat **5** ist ein geeignetes Ausgangsprodukt für die Synthese einer Vielzahl von 2'-*O*-Alkyl-substituierten β -D-Ribonucleosiden. Vorteilhaft wirken sich die stabilen 2,4-Dichlorobenzyl-Schutzgruppen in 3'- und 5'-*O*-Position für die Alkylierung der 2'-OH-Gruppe einerseits und die Kristallinität vieler Zwischenprodukte andererseits aus. Im weiteren können neben den natürlichen auch unnatürliche Nucleinbasen (z. B. Thymin oder 5-Methylcytosin in der Ribose-Reihe) oder 'exotische' Heterocyclen mit **5** ribosyliert werden (letzteres ist hier nicht aufgezeigt).

Ein Nachteil der 2,4-Dichlorobenzyl-Schutzgruppe liegt darin, dass sie reaktiv entfernt werden muss: 2'-*O*-Alkylreste, welche reaktionsempfindliche Funktionalitäten (z. B. Doppelbindungen, Epoxide *etc.*) enthalten, können nicht unverändert beibehalten werden. Auch reaktionsempfindliche Nucleinbasen wie z. B. Uracil und Cytosin sollten mit Vorteil nicht verwendet werden (teilweise bis starke Hydrierung der C(5)–C(6)-Bindung).



a) BSA, $TfOSiMe_3$, Toluol, 100°. b) $NH_3(g)$, MeOH, 70°. c) 1-Methyl-2,2-dimethoxy-pyrrolidin, THF/MeOH. d) (2-Bromoethyl)-methyl-ether, NaH, THF, 70°. e) H_2 , Pd/C, MeOH. f) H_2 , Pd/C, MgO, MeOH. g) $(MeO)_2Tr$ -Cl, Pyridin, h) (2-Cyanoethyl)-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphoramidit, Diisopropylammonium-tetrazolid, CH_2Cl_2 .

3. Synthese der Oligonucleotide. – Die synthetisierten (2-Cyanoethyl)-phosphoramidite wurden nach Standardprotokollen [23] auf einem automatischen 'DNA synthesizer' (ABI 390) oligomerisiert. Bei Verwendung von modifizierten Nucleosiden wurde die

¹⁵⁾ Die Verbindungen **5** bzw. **6**, **14** und **22** wurden in unserem 'kg-Labor' in kg- bzw. 500-g-Mengen pro Ansatz hergestellt.

Kupplungszeit auf 12 min verlängert. Die 5'-(MeO)₂Tr-geschützten Oligonucleotide wurden mittels 'reversed-phase' HPLC gereinigt. Nach Abspaltung der (MeO)₂Tr-Gruppe (80% Essigsäure)¹⁶⁾ und zweimaligem Lyophilisieren aus 50% EtOH wurden die Oligonucleotide mittels Kapillar-Gelelektrophorese auf ihre Reinheit hin kontrolliert (in allen Fällen grösser als 95%) und mittels MALDI-TOF('matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight')-MS charakterisiert [24]. Für die Sequenzanalyse wurden die Oligonucleotide stichprobenweise einer zeitabhängigen, enzymatischen Abbaureaktion unterworfen (Doppelexperiment: 5'- bzw. 3'-Abbau mit Kalbsmilz-Phosphodiesterase bzw. mit Schlangengift-Phosphodiesterase) [24]. Die von beiden Seiten her stetig verkürzten Oligonucleotide wurden wiederum der MALDI-TOF-MS-Analyse unterzogen. Die folgenden modifizierten Oligonucleotide wurden hergestellt¹⁷⁾: 5'-d(T-T-T-T-t-C-T-C-T-C-T-C-T-C-T)-3', 5'-d(C-T-C-C-T-A-C-t-t-t-t-C-C-G-G-T-C-C)-3', 5'-d(t-C-C-A-G-G-t-G-t-C-C-G-C-A-t-C)-3', 5'-d(G-C-G-t-t-t-t-t-t-t-t-G-C-G)-3' und 5'-d(t-t-t-t-t-c-t-c-t-c-t-c-t-c-T)-3' für Affinitätsbestimmungen, 5'-d(T-C-C-A-G-G-T-G-T-C-C-G-t-t-t-C)-3' für die Bestimmung der Nuclease-Stabilität sowie 5'-d(C-T-C-G-T-A-C-C-t-T-T-C-C-G-G-T-C-C)-3' für Selektivitätsmessungen.

4. Hybridisierung mit komplementärer RNS oder DNS. – Für die Bestimmung der Affinitäten der hergestellten modifizierten Oligonucleotide zu komplementärer RNS verwendeten wir die spektrophotometrische Analyse. Die Absorptions- vs. Temperaturprofile (Schmelzkurven) wurden bei einer Einzel-Strang-Konzentration von je 4 μM bei pH 7.0 in 10 mM Phosphatpuffer, 100 mM NaCl und 0.1 mM EDTA aufgenommen. Die Schmelztemperaturen (T_m 's)¹⁸⁾ wurden aus der Form der Schmelzkurven nach [25] bestimmt. Als Vergleich zum verfremdeten Oligonucleotid (enthaltend 1–15 verfremdete Nucleoside) wurde jeweils auch die Schmelztemperatur des entsprechenden unmodifizierten Oligonucleotides ('wild type') mit dem RNS-Komplement bestimmt (T_m wild).

In den Tab. 2–6 sind die gemessenen T_m - sowie die ΔT_m - bzw. ΔT_m /Modifikation¹⁹⁾-Werte von verschiedenen modifizierten Oligonucleotiden – bei jeweils gleicher Sequenz – aufgelistet. In der in Tab. 2 wiedergegebenen Sequenz wurde ein dT durch verschiedene 2'-O-Alkyl-substituierte T ($T(\text{alk})^2 = t$) ersetzt, in jenen der Tab. 3 und 4 je vier und in jener der Tab. 5 zehn. In der DNS von Tab. 6 wurden von 15 möglichen dT und dC 14 durch $T(\text{alk})^2$ und $-m^2C(\text{alk})^2$ ($m = \text{Me}$) ersetzt. Dabei zeigen alle Oligonucleotide, in denen ein oder mehrere dT durch entsprechende 2'-MeO-Verbindungen ersetzt sind, die bekannte Affinitätssteigerung [6] ($\Delta T_m/\text{Mod. ca. } +0,7$ bis $+1,1^\circ$ je nach Sequenz). Überraschend ist die Affinitätssteigerung durch die Einführung von längererkettigen, mit O-Funk-

¹⁶⁾ Die Isopropyliden-Schutzgruppe in den Glycerin-Derivaten der k- und l-Reihe liess sich gleichzeitig mit der (MeO)₂Tr-Schutzgruppe in Gegenwart von 80% AcOH spalten.

¹⁷⁾ Kleinbuchstaben bedeuten 2'-O-Alkyl-substituierte Ribonucleoside, trotz dem den Formeln jeweils vorgestellten 'd' (2'-Deoxy). Das 'd' gilt jedoch für die übrigen Nucleoside (grosse Buchstaben).

¹⁸⁾ Die Schmelztemperatur (T_m) ist diejenige Temperatur, bei der die Hälfte der eingesetzten Oligonucleotide als Doppelstrang vorliegt (bzw. bei der die Hälfte des Doppelstranges in Einzelstränge dissoziiert ist).

¹⁹⁾ $\Delta T_m/\text{Modifikation} = [T_m - T_m(\text{'wild type'})]/n$; n = Anzahl der gleichartig verfremdeten Nucleinbausteine, die im modifizierten Oligonucleotid eingebaut sind. Der Ausdruck $\Delta T_m/\text{Mod.}$ ist für eine bestimmte Modifikation nicht konstant, sondern abhängig von der Sequenz des Oligonucleotids und innerhalb einer bestimmten Sequenz abhängig von der Position des eingebauten 'fremden' Nucleinbausteins (3'-Ende, Mitte etc.). Gleiche Modifikationen, in möglichst verschiedene Sequenzen eingebaut, erlauben gleichwohl das Aufstellen einer Rangfolge des Einflusses verschiedener Modifikationen auf die Hybridisierungseigenschaften.

Tab. 2. Hybridisierung von 5'-d(T-T-T-T-t-C-T-C-T-C-T-C-T-C-T)-3'¹⁷) mit komplementärer RNS

X ^{a)}	T _m [°C]	ΔT _m [°C]
H	51,8	
MeO	53,0	+1,2
i-Pr	51,7	-0,1
MeOCH ₂ CH ₂ O	53,0	+1,2
MeO(CH ₂ CH ₂ O) ₂	52,7	+0,9
MeO(CH ₂ CH ₂ O) ₃	52,9	+1,1
CH ₂ (OH)CH(OH)CH ₂ O ^{b)}	53,3	+1,5
MeOCH(Me)CH ₂ O ^{b)}	53,4	+1,0

^{a)} Vgl. Formel t. ^{b)} (R)-Konfiguration.

Tab. 4. Hybridisierung von 5'-d(t-C-C-A-G-G-t-G-t-C-C-G-C-A-t-C)-3'¹⁷) mit komplementärer RNS

X ^{a)}	T _m [°C]	ΔT _m [°C]/Mod.
H	66,5	
MeO	70,9	+1,1
MeOCH ₂ CH ₂ O	70,1	+0,9
MeO(CH ₂ CH ₂ O) ₃	71,3	+1,2
CH ₂ (OH)CH(OH)CH ₂ O ^{b)}	71,4	+1,2

^{a)} Vgl. Formel t. ^{b)} (R)-Konfiguration.

Tab. 3. Hybridisierung von 5'-d(C-T-C-G-T-A-C-t-t-t-t-C-C-G-G-T-C-C)-3'¹⁷) mit komplementärer RNS

X ^{a)}	T _m [°C]	ΔT _m [°C]/Mod.
H	61,8	
MeO	65,0	+0,8
MeOCH ₂ CH ₂ O	65,4	+0,9
MeO(CH ₂ CH ₂ O) ₃	65,1	+0,8
CH ₂ (OH)CH(OH)CH ₂ O ^{b)}	65,5	+0,9

^{a)} Vgl. Formel t. ^{b)} (R)-Konfiguration.

Tab. 5. Hybridisierung von 5'-d(G-C-G-t-t-t-t-t-t-t-t-t-G-C-G)-3'¹⁷) mit komplementärer RNS

X ^{a)}	T _m [°C]	ΔT _m [°C]/Mod.
H	50,2	
MeO	61,2	+1,1
MeOCH ₂ CH ₂ O	62,3	+1,2
MeO(CH ₂ CH ₂ O) ₃	62,4	+1,2
CH ₂ (OH)CH(OH)CH ₂ O ^{b)}	62,5	+1,2
i-PrO	46,2	-0,4

^{a)} Vgl. Formel t. ^{b)} (R)-Konfiguration.

Tab. 6. Hybridisierung von 5'-d(t-t-t-t-t-c-t-c-t-c-t-c-t)-3'¹⁷) mit komplementärer RNS

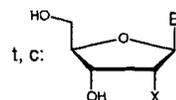
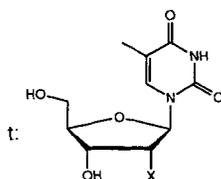
Base	X ^{a)}	T _m [°C]	ΔT _m [°C]/Mod.
Thy, Cyt	H	52,7	
Ura, Cyt	MeO	64,7	+0,8
Thy, 5-MeCyt	MeO	71,6	+1,4
Thy, 5-MeCyt	MeOCH ₂ CH ₂ O	76,9	+1,6
Thy, 5-MeCyt	MeO(CH ₂ CH ₂ O) ₃	76,8	+1,6
Thy, 5-MeCyt	MeOCH(Me)CH ₂ O ^{b)}	76,9	+1,6
Thy, Cyt	H	62,2 ^{c)}	
Thy, 5-MeCyt	MeO(CH ₂ CH ₂ O) ₃	93,5 ^{c)}	+2,1

^{a)} Vgl. Formel t.c. ^{b)} (R)-Konfiguration. ^{c)} In 'physiologischem' Puffer: 1 mM Spermin, 20 mM MOPS, 1 mM MgCl₂, 140 mM KCl, 10 mM NaCl.

Tab. 7. Hybridisierung von 5'-d(T-T-T-T-t-C-T-C-T-C-T-C-T-C-T)-3'¹⁷) mit komplementärer DNS

X ^{a)}	T _m [°C]	ΔT _m [°C]
H	42,8	
MeOCH ₂ CH ₂ O	40,0	-2,8
MeO(CH ₂ CH ₂ O) ₂	39,8	-3,0
MeO(CH ₂ CH ₂ O) ₃	39,4	-3,4
MeO(CH ₂ CH ₂ O) ₄	39,0	-3,8
CH ₂ (OH)CH(OH)CH ₂ O ^{b)}	40,6	-2,2

^{a)} Vgl. Formel t. ^{b)} (R)-Konfiguration.



tionen versehenen Substituenten in 2'-O-Stellung, da bekannterweise die Schmelztemperaturen von Oligonucleotiden, die längere 2'-O-Alkyl-Ketten enthalten, rasch absinken [6]. So zeigt z. B. die 2'-O-Nonyl-Substitution eine Erniedrigung der Schmelztemperatur von 2 bis 3°/Mod. [6], unsere etwa gleich lange 2'-O-[Me(OCH₂CH₂)₃]-Substitution aber eine Erhöhung um ca. 1,2°/Mod. Das Anbringen des 'Glycerin'-Restes in die 2'-Stellung bringt, trotz der Verzweigung der Kette²⁰), nochmals eine Verbesserung der Hybridisierungseigenschaften (ΔT_m 1,2–1,5°/Mod.).

Wird die O-Funktion in der Ethylenglycol-Kette um eine Position verschoben (z. B. 2'-O-(MeCH₂OCH₂) oder 2'-O-(MeOCH₂CH₂CH₂) statt 2'-O-(MeOCH₂CH₂), so sinken die T_m -Werte der entsprechenden Oligonucleotide auf jene Werte, die bei Verwendung der unverzweigten Alkoxy-Ketten (z. B. Me(CH₂)₂O) typisch sind (Resultate nicht gezeigt). Der O-Position innerhalb der 2'-O-Alkyl-Kette kommt demnach eine zentrale Rolle zu. Dasselbe gilt für Oligonucleotide mit 2'-O-Hydroxyalkyl-substituierten Alkyl-Ketten. Der Grund für die erhöhte Affinität von Oligonucleotiden mit 'Ethylenglycol'- und 'Glycerin'-Resten in 2'-Stellung²¹) ist vorerst unklar. Wird aus dem Duplex H₂O verdrängt oder H₂O anders angeordnet? Werden Kationen komplexiert und damit die negativen Ladungen des Phosphat-Rückgrats teilweise kompensiert²²)? Ist die Präorganisation des Einzelstranges geändert worden²³)? Diese Fragen führen zu weiteren Untersuchungen, die z. Z. im Gange sind.

Nur wenig wirkt sich der Einfluss der relativ grossen 2'-(i-PrO)-Gruppe auf die Hybridisierungseigenschaften aus: die Affinität sinkt nicht stark ab²⁴).

Aus der Tab. 6 sind neben dem Einfluss der 2'-O-Alkyl-Kette auch der zusätzliche Einfluss der Basenmodifikation auf die Hybridisierung ersichtlich. Der Ersatz von Uracil (Ura) durch Thymin (Thy) bzw. Cytosin (Cyt) durch 5-Methylcytosin bringt eine zusätzliche Erhöhung der ΔT_m -Werte um ca. 0,3 bis 0,6°/Modifikation. Eine noch deutliche Steigerung bringt der Ersatz der 5-Methyl-Gruppe in den Pyrimidin-Nucleosiden durch den Propin-1-yl-Rest [30]²⁵).

In Tab. 7 sind die Affinitätsdaten von 5'-d(T-T-T-T-t-C-T-C-T-C-T-C-T)-3' gegen sein DNS-Komplement zusammengestellt. Daraus ist ersichtlich, dass alle gemessenen modifizierten Oligonucleotide gegen DNS schlechter hybridisieren als unmodifizierte DNS. Zusätzlich ist die 'Rangfolge' eine andere als die aus der Messreihe der gleichen Sequenzen gegen RNS bestimmte (vgl. Tab. 5). Im Gegensatz zur Hybridisierung mit

²⁰) Endständige Verzweigung im Falle der 2'-O-Allyl-substituierten Oligonucleotide hat den völligen Verlust der Affinität zur Folge [26].

²¹) Die Kombination dieser Reste mit der 2'-Stellung der Ribose ist entscheidend. Die Platzierung z. B. der 'Ethylenglycol'-Reste in andere Positionen des Oligonucleotids (5-Stellung von U, Rückgrat, 2'-Stellung in carbocyclischen 4'-Desoxy-Analoga etc.) bringt keine Affinitätssteigerung, im Gegenteil [27].

²²) Einen Hinweis in diese Richtung geben die in Tab. 6 angegebenen Daten der Affinitätsmessung in physiologischem Puffer. Der T_m -Wert des Oligonucleotids mit der 2'-[MeO(CH₂CH₂O)₃]-Substitution steigt überproportional an.

²³) Über die Bedeutung der (konformationell bedingten) Präorganisation für die Hybridisierung vgl. [28].

²⁴) Zum Vergleich: Oligonucleotide mit 2'-O-[(t-Bu)Me₂Si]-Substitution zeigen einen drastischen Abfall der Schmelztemperaturen (ΔT_m /Mod. ca. -7°) [29]. Vgl. auch Fussnote 20.

²⁵) Wird (Propin-1-yl)³-dU statt dT in die Sequenzen der Tab. 3-5 eingebaut, werden die ΔT_m -Werte um 1,9 bis 2,6°/Modifikation erhöht. Die Kombination des 5-Propin-Restes mit 'unseren' neuen 2'-O-Alkyl-Resten bringt eine Erhöhung der T_m -Werte um durchschnittlich 3,5°/Mod. (Daten nicht gezeigt).

RNS wirkt sich der Einfluss der 2'-'Ethylen glycol'- und 2'-'Glycerin'-Substitutionen in modifizierten Oligonucleotiden gegen DNS ähnlich aus wie der Einfluss von unverzweigten 2'-O-Alkyl-Substituenten: je länger die Kette, desto schlechter die Affinität [6]. Der punktuelle Ersatz der CH₂-Gruppe in den Alkyl-Ketten durch ein O-Atom bzw. die gezielte Substitution von H in den Alkyl-Ketten durch OH führt demnach nur bei der Hybridisierung mit RNS zu dem gezeigten Effekt (Erhöhung der Affinität trotz langer Kette).

Daraus geht hervor, wie wichtig für die Evaluation von modifizierten Oligonucleotiden die Bestimmung ihrer Hybridisierungseigenschaften gegen ihr RNS-Komplement ist²⁶⁾.

5. Spezifität. – Neben einer hohen Affinität (Hybridisierung) müssen Oligonucleotide für den möglichen Einsatz als Therapeutika eine hohe Spezifität, d. h. eine hohe Diskriminierung zwischen Zielsequenz und anderen Sequenzen aufweisen. Spezifität der Hybridisierung ist besonders kritisch bei Systemen, in welchen ein 'Antisense'-Oligonucleotid zwischen zwei RNS-Sequenzen, die sich nur in einer einzigen Base unterscheiden, eingesetzt werden soll²⁷⁾.

Da mit modifizierten Oligonucleotiden eine hohe Affinität angestrebt wird, und diese durch den Einsatz der 2'-'Ethylen glycol'- und 2'-'Glycerin'-Derivate auch erreicht wird, besteht die Gefahr, dass derart modifizierte Oligonucleotide auch bei Fehlpaarung immer noch gute Hybridisierungseigenschaften zeigen.

Ein gutes Mass für die Spezifität der Basenpaarung ist die Differenz der Schmelztemperaturen zwischen dem korrekten Duplex und dem Duplex, in dem im RNS-Strang entweder *eine* falsche Base ('mismatch') oder *eine* Base weniger ('bulge') eingebaut ist [32].

Die Spezifität unserer modifizierten Oligonucleotide wurde wie folgt bestimmt: Mit der Oligonucleotid(DNS)-Sequenz 5'-d(C-T-C-G-T-A-C-C-t-T-T-C-C-G-G-T-C-C)-3'¹⁷⁾ mit modifiziertem T(alk)² (= t) in Position 9 wurden die Hybridisierungseigenschaften mit verschiedenen RNS's 3'-G-A-G-C-A-T-G-G-Y-A-A-G-G-C-C-A-G-G-5', in welchen gegenüber Position 9 der Oligonucleotid-Sequenz ein fehlerhaftes Nucleosid (Y) eingebaut wurde, untersucht. Als Standard wurde jeweils die Hybridisierung mit 'korrekter' RNS (Y = A) mitgemessen.

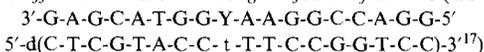
Aus Tab. 8 geht hervor, dass mit den drei gezeigten Modifikationen (2'-[MeO-(CH₂CH₂O)*n*], *n* = 1 und 3, und 2'-[CH₂(OH)CH(OH)CH₂O]) im Falle von (C + T)- und (U + T)-'mismatch' ein gleich grosser, und im Falle von (G + T)-'mismatch' und 'bulge' ein deutlich grösserer Affinitätsabfall als mit dem natürlichen DNS-Substrat erreicht wird.

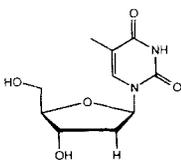
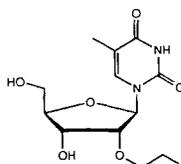
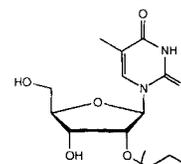
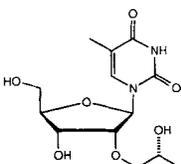
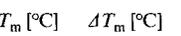
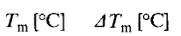
Oligonucleotide, die in 2'-Stellung 'Glycerin'- oder 'Ethylen glycol'-Reste tragen, zeigen demnach gesteigerte Spezifitätseigenschaften gegenüber natürlicher DNS, obwohl sie

²⁶⁾ Viele Arbeitsgruppen vermessen die Paarungseigenschaften ihrer modifizierten Oligonucleotide gegen (leichter zu handhabende) DNS. Die Affinitätssteigerung mit RNS-ähnlichen Oligonucleotiden gegen DNS dürfte kaum auftreten, da der DNS·RNS-Hybrid meist weniger stabil als der RNS·RNS-Duplex ist [31]. Zudem sind solche Daten für eine mögliche Anwendung im Antisense-Gebiet bedeutungslos: DNS liegt als Doppelstrang vor; die modifizierten Oligonucleotide sollten allenfalls im Hinblick auf eine mögliche Triplex-Bildung untersucht werden.

²⁷⁾ Z. B. kann der Unterschied zwischen einem normalen Proto-Onkogen und einem aktivierten Onkogen aus einer einzigen Punktmutation bestehen.

Tab. 8. Spezifität: Affinitätsverlust bei Paarung mit fehlerhafter RNS ('mismatch', 'bulge').



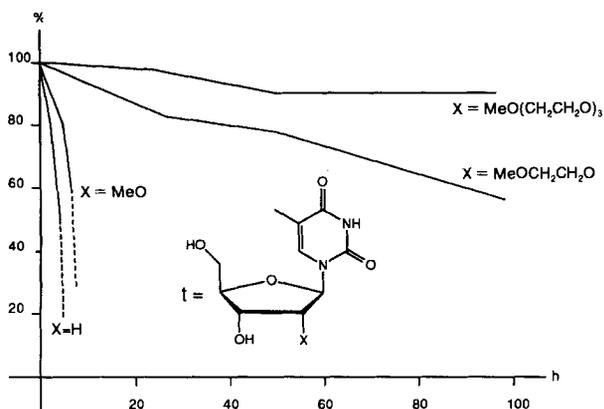
Y	t		t		t		t	
								
	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
A	63,3		65,0		64,1		65,0	
C	54,5	-8,8	55,8	-9,2	55,1	-9,0	55,7	-9,3
G	61,6	-1,7	61,4	-3,6	59,5	-4,6	60,6	-4,4
U	55,8	-7,5	57,5	-7,5	55,9	-8,2	56,4	-8,6
('bulge')	59,4	-3,9	57,8	-7,2	56,4	-7,7	56,5	-8,5

in ihren Hybridisierungseigenschaften für komplementäre RNS diejenigen von DNS deutlich übertreffen²⁸).

6. Nuclease-Stabilität. – Neben guten Hybridisierungseigenschaften und hoher Spezifität ist die Bioverfügbarkeit der Oligonucleotide ein entscheidender Faktor für die Realisierung der Antisens-Therapie, d.h. die modifizierten Oligonucleotide müssen zellgängig und in biologischem Milieu (Serum, Cytoplasma) gegen Nucleasen stabil sein. Für die Bestimmung der relativen Stabilität gegen enzymatische Hydrolyse des Phosphordiester-Rückgrats wurden verschiedene Oligonucleotide der Sequenz 5'-d(T-C-C-A-G-G-T-G-T-C-C-G-t-t-C)-3', in der drei dT durch modifizierte Nucleoside t ersetzt sind, mit Serum aus Kalbsföten (enthält potente 3'-Exonucleasen) bei 37° inkubiert²⁹. Nach gewissen Zeitabschnitten wurden Proben entnommen, gequetscht und bis zur Messung bei -20° gelagert. Die Proben wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, und die jeweiligen Spaltprodukte wurden mittels P-Gehalt quantifiziert²⁹. Das Verhältnis der Summe der Konzentrationen des völlig intakten Oligonucleotids zur Zeit t (c_n) und des durch Abspaltung des natürlichen C-Bausteins vom 3'-Ende entstehenden Fragmentes zur Zeit t (c'_{n-1}) zur Ausgangskonzentration des völlig intakten Oligonucleotids ($c_n^{t=0}$) wird gegen die Zeit graphisch aufgetragen (Fig.). Oligonucleotide, die mit der 2'-(MeOCH₂CH₂O)- und der 2'-[MeO(CH₂CH₂O)₃]-Gruppe versehen sind, zeigen eine extrem erhöhte Stabilität gegenüber der 2'-Deoxy-Reihe oder jene der mit der 2'-MeO-Gruppe substituierten Oligonucleotide. Während in der natürlichen 2'-Deoxy-Reihe sowie den 2'-MeO-Analogen nach wenigen h kein 16- bzw. 15-Mer vorhanden ist, sind nach 96 h vom [MeO(CH₂CH₂O)₃]-substituierten 16- und 15-Mer noch 90%, vom (MeOCH₂CH₂O)-Derivat noch ca. 60% vorhanden.

²⁸) Beachte: Diese positiven Daten erlauben keine Aussage über die Kinetik ('on-rate', 'off-rate') bei Fehlpaarung. Die Denaturisierungsgeschwindigkeit bei Fehlpaarung sollte extrem höher sein als bei korrekter Paarung, sonst bleibt das Oligonucleotid im riesigen Überschuss von 'falscher' RNS stecken. Dem kann teilweise durch Verwendung kürzerer Oligonucleotid-Stränge entgegengewirkt werden [33].

²⁹) Für experimentelle Details vgl. [34].



Figur. Nuclease-Stabilität von 5'-d(T-C-C-A-G-G-T-G-T-C-C-G-t-t-t-C)-3'¹⁷ in Kalbsfötenserum (nach [34])

7. Zusammenfassung. – Das einfach zugängliche Ribose-Derivat **5** ist ein gut geeignetes Zwischenprodukt für die Synthese einer Vielzahl von 2'-O-Alkyl-substituierten Nucleosiden, wie dies im Falle von T- und m⁵C-Derivaten breit und im Falle der A- und G-Analogen punktuell gezeigt wurde. Der Einbau der neu hergestellten Monomeren, die in 2'-Stellung 'Ethylenglycol'- und 'Glycerin'-Reste tragen, in Oligomere führt zu einer neuen Klasse von Oligonucleotiden, die folgende Eigenschaften in sich vereinen: hohe Bindungsaffinität zu RNS, hohe Spezifität, d. h. hohe Diskriminierung zwischen Zielsequenz und anderen Sequenzen, und potente Nuclease-Stabilität. Inwieweit diese Klasse neuer Oligonucleotide als Therapeutika Verwendung finden wird, hängt im weiteren von ihrer Zellmembran-Gängigkeit (die 'Ethylenglycol'- und 'Glycerin'-Derivate mit zusätzlich angebrachten lipophilen Resten lassen dies erhoffen) und von ihrer biologischen Wirkung in verschiedenen Indikationen ab. Diese Untersuchungen sind z. Z. im Gange.

Dr. Tammo Winkler danke ich für die Interpretation von ¹³C-NMR-Spektren sowie für NOE-Messungen, Dr. Uwe Piele für die Herstellung, Reinigung und Charakterisierung der Oligonucleotide, Dr. Dieter Hüskens und Dr. Sue Freier, ISIS Pharmaceutical, Carlsbad (Kalifornien), für die Bestimmung der Schmelztemperaturen und der Nuclease-Stabilitäten, meinen beiden Laborantinnen, Gisela Bernauer und Claudia Kaltenbach, für ihren Einsatz in der Synthese der Monomeren, Dr. Eginhard Steiner und Kurt Auer für die Bereitstellung von **5** in kg-Mengen, sowie Dr. Heinz Moser und Dr. Karl-Heinz Altmann für das stete Interesse und die vielen Diskussionen an und um diese Arbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [35]. Oligonucleotid-Synthese, s. [23]; Charakterisierung der Oligonucleotide, s. [24]; Bestimmung der Schmelztemperaturen, s. [25]; Bestimmung der Nuclease-Stabilität, s. [34].

Methyl-2,3,5-iris-O-(2,4-dichlorobenzyl)-β-D-ribofuranosid (3). Zur gekühlten (0°) Lsg. von 25,0 g (0,166 mmol) D-Ribose in 500 ml MeOH werden 2,5 ml konz. H₂SO₄-Lsg. getropft. Die Lsg. wird 16 h im Kühlschrank (4°) stehen gelassen. Dann wird mit gas-förmigem NH₃ neutralisiert, der gebildete Niederschlag abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Das erhaltene farblose Öl (28,0 g) wird in 280 ml DMF gelöst und in eine Vorlage von 13,5 g (0,563 mol) NaH in 130 ml DMF eingetragen und auf 60° erwärmt. Nach Abklingen der H₂-Entwicklung werden bei 40° 110,0 g (0,563 mol) 2,4-Dichlorobenzyl-chlorid zugetropft. Das Gemisch wird 16 h weitergerührt und dann mit 15 ml MeOH versetzt und auf Eiswasser (600 ml) gegossen. Der klumpige Niederschlag wird abfiltriert und mit

MeCN digeriert: 83,11 g (76%) **3**. Schmp. 89–90°. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 3,37 (s, MeO); 3,70 (m, CH₂(5)); 3,97 (d, J = 5, H–C(2)); 4,16 (m, H–C(3)); 4,37 (m, H–C(4)); 4,60–4,70 (3 AB, je CH₂); 5,0 (s, H–C(1)); 7,15–7,4 (m, 9 arom. H). MS: 638 (M⁺).

Methyl-3,5-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-α-D-ribofuranosid (4). Die Lsg. von 66,5 g (0,104 mol) **3** in 700 ml CH₂Cl₂ wird auf 0° gekühlt und tropfenweise mit 27,1 g (0,104 mol) SnCl₄ in 50 ml CH₂Cl₂ versetzt. Nach dem Zutropfen wird die Lsg. 26 h bei 3° stehen gelassen, dann erneut mit 2 ml SnCl₄ versetzt und wieder bei 3° stehen gelassen. Nach insgesamt 35 h wird die Lsg. vorsichtig auf 700 ml ges. NaHCO₃-Lsg. gegossen. Nach Verdünnung mit 400 ml CH₂Cl₂ wird der Sn-haltige Niederschlag abfiltriert. Die org. Phase des Filtrates wird getrocknet (MgSO₄) und eingedampft: 125,9 g rohes **4**, das 2,4-Dichlorobenzyl-chlorid enthält. Das Rohöl wird direkt in die nächste Stufe eingesetzt. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 2,92 (d, J = 14, OH); 3,50 (s, MeO); 3,62 (m, CH₂(5)); 3,85 (m, CH); 4,20 (m, 2 H); 4,56, 4,70 (je AB, je CH₂); 4,94 (d, J = 5,5, H–C(1)); 7,1–7,4 (m, 6 arom. H).

Methyl-2-O-acetyl-3,5-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-α-D-ribofuranosid (5). Zur Lsg. von 125,9 g rohem **4** in 1 l Pyridin werden 25,5 g Ac₂O und 1 g 4-(Dimethylamino)pyridin gegeben. Nach 17 h Rühren wird auf 1 l H₂O gegossen, mit konz. HCl-Lsg. angesäuert und mit AcOEt extrahiert. Der Extrakt wird getrocknet (MgSO₄) und eingedampft und der Rückstand mit kaltem Hexan zur Kristallisation gebracht: 54,5 (79%, über 2 Stufen). Schmp. 65°. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 2,16 (s, Ac); 3,47 (s, MeO); 3,60 (AB von ABX, CH₂(5')); 4,08 (m, CH); 4,28 (m, CH); 4,58, 4,63 (je AB, je CH₂); 4,93 (dd, J = 5, 7, H–C(2)); 5,12 (d, J = 5, H–C(1)); 7,15–7,4 (m, 6 arom. H). MS: 522 (M⁺).

1-[2'-O-Acetyl-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-β-D-ribofuranosyl]thymine (6). Zur Aufschlammung von 24,06 g (0,191 mol) Thymin in 100 ml Dichloroethan werden 116,4 g (0,572 mol) BSA (Bis(trimethylsilyl)acetamid) gegeben und 10 min unter Rückfluss erhitzt. Die jetzt klare Lsg. wird auf 50° abgekühlt, und dann werden 50,0 g (95,4 mmol) **5** und 27,5 g (0,124 mol) TfOSiMe₃ (Trifluoromethansulfonsäure-(trimethylsilyl)ester) zugegeben. Die Lsg. wird 20 h bei 70° gerührt, abgekühlt und auf 300 ml ges. NaHCO₃-Lsg. gegossen. Nach Filtration wird die org. Phase abgetrennt, getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Der Rückstand wird mit wenig kaltem MeOH zur Kristallisation gebracht: 43,15 g (73%) **6**. Schmp. 111–112°. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1,66 (s, Me); 2,13 (s, Ac); 3,82 (AB von ABX, CH₂(5')); 4,22 (m, H–C(4')); 4,30 (m, H–C(3')); 4,5–4,7 (2 AB, 2 CH₂); 5,38 (dd, J = 4, 3, H–C(2')); 6,10 (d, J = 5, H–C(1')); 7,2–7,45 (m, 7 arom. H); 8,26 (s, NH). MS: 616 (M⁺).

1-[2'-O-Acetyl-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-β-D-ribofuranosyl]-3-[(benzyloxy)methyl]thymine (7). Zu einer Suspension von 70,0 g (113 mmol) **6** in 700 ml MeCN werden unter Rühren 20,7 g (136 mmol) DBU gegeben (→Lsg.). Dann werden innert 1 h 21,2 g (136 mmol) (Benzyloxy)methyl-chlorid (BOM-Cl) zugegeben. Nach 10 h Weiterrühren werden erneut 5 ml DBU und 5 ml BOM-Cl zugegeben. Nach total 10 h Rühren wird das Gemisch auf H₂O gegossen und mit AcOEt extrahiert (3 × 200 ml). Die org. Phase wird mit ges. NaCl-Lsg. und H₂O gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und eingedampft: 89,1 g (> 100%; enthält noch AcOEt) **7**. Gelber Honig, der direkt in die nächste Reaktion eingesetzt werden kann. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1,55 (s, Me); 2,12 (s, Ac); 3,85 (AB von ABX, CH₂(5')); 4,2–4,35 (m, H–C(4'), H–C(3')); 4,5–4,7 (2 AB, 2 CH₂); 5,39 (dd, J = 4, 3, H–C(2')); 5,50 (s, CH₂); 6,06 (d, J = 4, H–C(1')); 7,2–7,5 (m, 7 arom. H). MS: 771 ([M + Cl]⁺).

3-[(Benzyloxy)methyl]-1-[3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-β-D-ribofuranosyl]thymine (8). Die Lsg. von 61,0 g (82,6 mmol) **7** und 15 ml 30% MeONa/MeOH-Lsg. in 200 ml MeOH wird 3 h bei RT. gerührt. Nach dem Einengen um die Hälfte wird auf H₂O gegossen und mit AcOEt extrahiert. Der Extrakt wird mit H₂O gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und eingedampft: 56,1 g (98%) honigartiges **8**, welches für Alkylierungen direkt weiterverwendet werden kann. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1,69 (s, Me); 3,00 (d, J = 8, OH); 3,82 (AB von ABX, CH₂(5')); 4,15–4,3 (m, H–C(4'), H–C(3'), H–C(2')); 4,5–4,8 (m, 2 CH₂); 5,48 (AB, CH₂); 5,92 (d, J = 5,5, H–C(1')); 7,2–7,4 (m, 7 arom. H). MS: 694 (M⁺).

Alkylierung von 8: Allgemeine Vorschrift. Die Lsg. von 12,0 g (17 mmol) **8** in 120 ml THF wird mit 0,41 g NaH (100%) auf 60° erwärmt, bis keine H₂-Entwicklung mehr beobachtbar ist. Dann wird auf RT. abgekühlt und 17 mmol Alkylierungsmittel zugetropft (bei Feststoffen in wenig THF gelöst). Je nach Reaktivität wird die Reaktionstemp. zwischen 20 und 70° gehalten. Oftmals ist eine nachträgliche Zugabe von NaH und Alkylierungsmittel notwendig, um die Reaktion zu Ende zu bringen. Das Gemisch wird dann auf H₂O gegossen und mit AcOEt extrahiert. Der Extrakt wird getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel chromatographiert. Die erhaltenen Verbindungen **9** sind aus Tab. 1 ersichtlich.

BF₃-Katalysierte Addition von R'OH an das Epoxid 9i: Allgemeine Vorschrift. Zur Vorlage von 5,1 g (6,78 mmol) **9i**, 20 mmol Alkohol R'OH (bzw. H₂O) und 50 ml CH₂Cl₂ werden bei RT. 0,96 g (6,78 mmol) BF₃·OEt₂ getropft (Spritze). Nach 16 h Weiterrühren wird die Lsg. auf H₂O gegossen und die org. Phase getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel chromatographiert. Eine allfällige Überführung der erhaltenen 1-[2'-O-(3-Alkoxy-2-hydroxypropyl)-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-β-D-ribofuranosyl]-3-[(benzyloxy)methyl]thymine (**9p**) in 1-[2'-O-(3-Alkoxy-2-alkoxypropyl)-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-β-D-

ribofuranosyl]-3-[(benzyloxy)methyl]thymine (**9q**) wird unter Bedingungen, wie sie für die Alkylierung von **8** beschrieben sind, durchgeführt. Resultate: Tab. 9.

Tab. 9. Herstellung und Daten von **9p** und **9q**

R'	R''	Isolierte Ausbeute [%]	¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃)					MS
			H-C(1')	H-C(6) (s)	Me-C(5) (s)	BnOCH ₂ -N(3) (AB)	Übrige Me	
9p	H	89	5,93 (s)	7,63	1,58	5,48	–	786 ([M + NH ₄] ⁺)
	Me	97	5,94 (d, J = 1,5)	7,65	1,62	5,50	3,35 (s)	817 ([M + Cl] [–])
	C ₁₆ H ₃₃	–	5,92 (s)	7,62	1,60	5,47	0,89 (t)	1027 ([M + Cl] [–])
	C ₁₈ H ₃₇	–	5,94 (s)	7,64	1,64	5,50	0,90 (t)	1020 (M [–])
9q	Me(OCH ₂ CH ₂) ₃	88	5,98 (s)	7,65	1,59	5,48	3,33 (s)	888 ([M + NH ₄] ⁺)
	Me	94	5,94 (d, J = 1,5)	7,64	1,61	5,50	3,30 (s)	831 ([M + Cl] [–])
	C ₁₆ H ₃₃	96	5,92 (s)	7,63	1,59	5,44	3,42 (s)	1024 ([M + NH ₄] ⁺)
	C ₁₈ H ₃₇	C ₁₈ H ₃₇	55	5,93 (s)	7,64	1,62	5,50	3,40 (s) 0,88 (t)

3-[(Benzyloxy)methyl]-1-{3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-2'-O-[(R)-2-hydroxypropyl]-β-D-ribofuranosyl}thymine (**9r**). Zur Lsg. von 7,1 g (9,44 mmol) **9i** in 70 ml THF werden 0,43 g (11,33 mmol) NaBH₄ gegeben. Dann werden 0,5 g (3,52 mmol) BF₃·OEt₂ zugespritzt. Das Gemisch wird 26 h bei RT. gerührt, dann auf H₂O gegeben und mit AcOEt extrahiert. Der Extrakt wird getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel (Hexan/AcOEt 1:1) filtriert. Eindampfen ergibt 6,92 g (97%) **9r**. Öl. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): u. a. 1,16 (d, J = 7, Me); 1,62 (s, Me); 5,47 (AB, NCH₂O); 5,92 (s, H-C(1')); 7,68 (s, H-C(6)). MS: 787 ([M + Cl][–]).

3-[(Benzyloxy)methyl]-1-{3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-2'-O-[(R)-2-methoxypropyl]-β-D-ribofuranosyl}thymine (**9s**). Die Lsg. von 6,88 g (9,15 mmol) **9r** in 70 ml THF wird mit 0,27 g (11 mmol) NaH (100%) versetzt und 30 min auf 60° erwärmt. Dann wird auf 35° gekühlt und 1,58 g (11 mmol) MeI zugegeben. Nach 3 h Weiterühren werden erneut 0,2 g NaH und 0,5 g MeI zugegeben. Nach total 5 h Rühren bei 35° wird das Gemisch auf H₂O gegossen und mit AcOEt extrahiert. Der Extrakt wird mit ges. NaCl-Lsg. und H₂O gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel chromatographiert (Hexan/AcOEt 1:1). 5,91 g (84%) **9s**. Sirup. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): u. a. 1,13 (d, J = 7, Me); 1,60 (s, Me); 3,33 (s, MeO); 5,49 (AB, NCH₂O); 5,95 (d, J = 1,5, H-C(1')); 7,64 (s, H-C(6)). MS: 784 ([M + NH₄]⁺).

Entfernung der BOM-Schutzgruppe von **9**: Allgemeine Vorschrift. Das Gemisch aus 10 mmol **9**, 70 ml THF und 0,7 g 5% Pd/C wird bei RT. und Normaldruck hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wird das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird für die Abspaltung der CH₂OH-Gruppe an N(3) in 60 ml MeOH aufgenommen, mit 30% NaOMe/MeOH auf pH 11 gestellt und bei RT. über Nacht gerührt. Die Lsg. wird auf H₂O gegossen, mit 2N HCl auf pH 5 gestellt und mit AcOEt extrahiert. Der Extrakt wird getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Die Ausbeuten an **10** sind quantitativ. Daten der 1-(2'-O-Alkyl-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-β-D-ribofuranosyl)thymine **10**: Tab. 10.

Entfernung der 2,4-Dichlorobenzyl-Schutzgruppen in **10**: Allgemeine Vorschrift. Die Lsg. von 10 mmol **10** in 175 ml MeOH wird mit 44 mmol NaOAc (H₂O-frei) oder 30 mmol MgO und über 1,2 g 5% Pd/C bei 45° unter Normaldruck hydriert. Das Hydriergemisch wird filtriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird zur Entfernung von Salzen über Kieselgel (AcOEt/MeOH 4:1) filtriert und das Filtrat eingedampft: 1-(2'-O-Alkyl-β-D-ribofuranosyl)thymine **11**. Resultate: Tab. 11.

Tritylierung von **11**: Allgemeine Vorschrift. Vor der eigentlichen Tritylierung werden 10 mmol **11** in 50 ml Pyridin aufgenommen und wieder eingedampft. Dieser Vorgang wird wiederholt. Der Rückstand wird in 35 ml Pyridin aufgenommen und mit 10 mmol 4,4'-Dimethoxytrityl-chlorid versetzt. Das Gemisch wird bei RT. gerührt, bis kein Edukt mehr vorhanden ist (normalerweise ca. 5 h; DC: Toluol/AcOEt 1:1 + 1% NEt₃). Das Gemisch wird auf H₂O gegossen und mit CH₂Cl₂ extrahiert, der Extrakt getrocknet (MgSO₄) und eingedampft und der Rückstand über Kieselgel (Toluol/AcOEt 1:1 + 1% NEt₃) chromatographiert. Ausbeuten: 47–91%.

Tab. 10. Daten von 10

R	¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃)			MS (CI oder FAB)
	H–C(1') (<i>d</i> , <i>J</i> = 1–2 Hz)	H–C(6)	Me–C(5)	
10a Me	5,98	7,63	1,62	606 ([M + NH ₄] ⁺)
b Pr	5,97	7,66	1,61	634 ([M + NH ₄] ⁺)
d i-Pr	5,92	7,64	1,61	634 ([M + NH ₄] ⁺)
e MeOCH ₂ CH ₂	5,98	7,64	1,60	650 ([M + NH ₄] ⁺)
f Me(OCH ₂ CH ₂) ₂	5,98	7,62	1,62	694 ([M + NH ₄] ⁺)
g Me(OCH ₂ CH ₂) ₃	5,96	7,61	1,60	738 ([M + NH ₄] ⁺)
h Me(OCH ₂ CH ₂) ₄	5,97	7,63	1,63	782 ([M + NH ₄] ⁺)
k [(4 <i>R</i>)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]methyl	5,94	7,65	1,61	706 ([M + NH ₄] ⁺)
l [(4 <i>S</i>)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]methyl	5,94	7,65	1,61	706 ([M + NH ₄] ⁺)
o C ₁₀ H ₂₁ (OCH ₂ CH ₂) ₃	5,89	7,54	1,54	864 ([M + NH ₄] ⁺)
q MeOCH ₂ CH(MeO)CH ₂	5,98	7,62	1,61	675 ([M – H] [–])
s C ₁₆ H ₃₃ OCH ₂ CH(MeO)CH ₂	5,97	7,62	1,62	904 ([M + NH ₄] ⁺)
s MeCH(MeO)CH ₂	6,00	7,64	1,62	645 ([M – H] [–])

Tab. 11. Herstellung und Daten von 11

R	¹ H-NMR (250 MHz, CDCl ₃)				MS (CI oder FAB)
	Ausbeute [%]	H–C(1') (<i>d</i> , <i>J</i> = 5–6 Hz)	H–C(6)	Me–C(5)	
11a Me	84	5,77 ^a	7,69 ^a	1,66 ^a	271 ([M – H] [–])
b Pr	95	5,72 ^b	7,53 ^b	1,92 ^b	318 ([M + NH ₄] ⁺)
d i-Pr	95	5,60 ^a	7,67 ^a	1,58 ^a	335 ([M + Cl] [–])
e MeOCH ₂ CH ₂	94	5,85 ^a	7,81 ^a	1,78 ^a	317 ([M – H] [–])
f Me(OCH ₂ CH ₂) ₂	91	5,73 ^b	7,63 ^b	1,91 ^b	378 ([M + NH ₄] ⁺)
g Me(OCH ₂ CH ₂) ₃	71	5,76 ^c	7,70 ^c	1,69 ^c	422 ([M + NH ₄] ⁺)
h Me(OCH ₂ CH ₂) ₄	78	5,86 ^c	7,83 ^c	1,78 ^c	468 ([M + NH ₄] ⁺)
k [(4 <i>R</i>)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]methyl	89	5,71 ^c	7,71 ^c	1,62 ^c	371 ([M – H] [–])
l [(4 <i>S</i>)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl]methyl	83	5,66 ^b	7,48 ^b	1,93 ^b	371 ([M – H] [–])
o C ₁₀ H ₂₁ (OCH ₂ CH ₂) ₃	86	5,63 ^a	7,57 ^a	1,56 ^a	529 ([M – H] [–])
q MeOCH ₂ CH(MeO)CH ₂	73	5,78 ^a	7,75 ^a	1,66 ^a	359 ([M – H] [–])
s C ₁₆ H ₃₃ OCH ₂ CH(MeO)CH ₂	76	5,84 ^a	7,76 ^a	1,72 ^a	569 ([M – H] [–])
s MeCH(MeO)CH ₂	92	5,83 ^a	7,78 ^a	1,74 ^a	329 ([M – H] [–])

^a) DMSO. ^b) CDCl₃. ^c) MeOD.

1-[2'-O-Alkyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]thymine-3'-[2-cyanoethyl]-N,N-diisopropylphosphoramidite **12**: Allgemeine Vorschrift. Zur vorgelegten Lsg. von 6,6 mmol Diisopropylammonium-tetrazolid und 6,1 mmol (2-Cyanoethyl)-N,N,N,N'-tetraisopropylphosphordiamidit in 50 ml CH₂Cl₂ werden 5,5 mmol trityliertes **11** in 50 ml CH₂Cl₂ getropft. Dann wird bei RT. gerührt, bis nach DC (Toluol/AcOEt 4:1 + 1% NEt₃) kein Edukt mehr vorhanden ist. Das Gemisch wird mit CH₂Cl₂ verdünnt und auf eine ges. NaHCO₃-Lsg. gegossen, die org. Phase getrocknet (MgSO₄) und eingedampft und der Rückstand chromatographiert (Kieselgel, Laufmittel wie DC). Das erhaltene ölige Diastereoisomerengemisch (1:1) wird in *t*-BuOMe gelöst und mit Pentan in der Kälte ausgefällt: **12**. ³¹P-NMR (Ausbeute in Klammern; CDCl₃): **12a** (96%): 150,86, 150,25; **12b** (83%): 150,14, 149,95; **12d** (78%): 149,95, 149,63; **12e** (89%): 150,14, 150,02; **12f** (83%): 150,07, 149,75; **12g** (72%): 149,95, 149,88; **12h** (88%): 150,14, 150,03; **12k** (87%): 150,09, 150,02; **12l** (83%): 150,08, 149,91; **12o** (91%): 150,12, 150,06; **12q** (R = MeOCH₂CH(MeO)CH₂; 73%): 150,92, 150,76; **12q** (R = C₁₆H₃₃OCH₂CH(MeO)CH₂; 95%): 150,10, 150,02; **12s** (90%): 150,82, 150,74.

1-[2'-O-Alkyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl]-5-methyl-4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pyrimidin-2(1H)-on-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite] **13**: Allgemeine Vorschrift. Zu einer gekühlten Vorlage von 3,82 mmol **12**, 6,17 g (89,4 mmol) 1,2,4-1H-Triazol- und 9,4 g (93 mmol) NEt₃ in 50 ml MeCN werden 1,53 g (9,9 mmol) POCl₃ getropft (Temp. sollte 30° nicht übersteigen). Die weisse Suspension wird 16 h bei RT. gerührt. Das Gemisch wird auf eine ges. NaHCO₃-Lsg. gegossen und mit AcOEt extrahiert, der Extrakt mit ges. NaCl-Lsg. und H₂O gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und eingedampft und der Rückstand aus CH₂Cl₂ mit Pentan gefällt oder über Kieselgel (Toluol/AcOEt 4:1 + 1% NEt₃) chromatographiert: **13**. ³¹P-NMR (CDCl₃; Ausbeute in Klammern): **13a** (92%): 150,67, 149,71; **13b** (63%): 150,49, 149,75; **13e** (90%): 150,25, 149,43; **13g** (98%): 150,34, 149,47; **13k** (92%): 150,80, 149,61; **13o** (96%): 150,48, 149,60; **13q** (R = C₁₆H₃₃OCH₂CH(MeO)CH₂; 73%): 150,73, 149,33; **13s** (76%): 150,30, 150,07.

9-[2'-O-Acetyl-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)- β -D-ribofuranosyl]hypoxanthin (= 2-O-Acetyl-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)inosin; **14**). Zu einer Suspension von 2,6 g (19,08 mmol) Hypoxanthin in 50 ml Dichloroethan werden 5,8 g (28,6 mmol) BSA gegeben und 30 min unter Rückfluss gehalten. Die jetzt klare Lsg. wird auf 40° gekühlt und mit 5,0 g (9,54 mmol) **5** und 2,8 g (12,4 mmol) TfOSiMe₃ versetzt. Nach 7 h Rühren bei 70° wird (nach Abkühlen) das Gemisch auf ges. NaHCO₃-Lsg. gegossen. Die Sn-haltigen Niederschläge werden abfiltriert. Die org. Phase des Filtrats wird getrocknet (MgSO₄) und eingedampft und der Rückstand über Kieselgel chromatographiert (AcOEt/MeOH 2:1): 3,8 g (63%) **14**. Weisses Pulver. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 8,25, 8,14 (2s, H-C(2), H-C(6)); 7,15–7,4 (m, 6 arom. H); 6,22 (d, J = 4, H-C(1')); 5,74 (t, H-C(2')); 4,3–4,7 (m, 6 H); 3,80 (AB von ABX, CH₂(5')); 2,14 (s, Me). MS: 625 ([M - H]⁻).

9-[2'-O-Acetyl-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)- β -D-ribofuranosyl]-6-chloro-9H-purin (**15**). Zu einer kochenden Lsg. von 33,7 g (53,6 mmol) **14** in 900 ml CH₂Cl₂ werden gleichzeitig je 21,25 ml DMF und 42,5 ml SOCl₂ getropft. Nach 2,5 h werden erneut 10 ml SOCl₂ und 5 ml DMF zugetropft. Nach insgesamt 5,5 h Kochen wird abgekühlt und das Gemisch auf ges. NaHCO₃-Lsg. gegossen. Die org. Phase wird mit H₂O gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und eingedampft: 33,3 g (96%) rohes **15**. Sirup. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 8,74, 8,46 (2s, H-C(2), H-C(8)); 7,15–7,4 (m, 6 arom. H); 6,31 (d, J = 4, H-C(1')); 5,82 (dd, J = 4, 5, H-C(2')); 4,3–4,7 (m, 6 H); 3,80 (AB von ABX, CH₂(5')); 2,16 (s, Me). MS: 644 (M⁺).

9-[3',5'-Bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)- β -D-ribofuranosyl]-6-methoxy-9H-purin (**16**). Zur Lsg. von 30,4 g (47 mmol) **15** in 100 ml THF und 200 ml MeOH wird eine Lsg. von 16,9 g NaOMe in MeOH (30%) getropft und 3 h bei RT. gerührt. Das Gemisch wird auf H₂O gegossen und mit AcOEt extrahiert. Der Extrakt wird getrocknet (MgSO₄) und eingedampft: 25,4 g (90%) **16**. Sirup. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 8,49, 8,17 (2s, H-C(2), H-C(8)); 7,15–7,4 (m, 6 arom. H); 6,10 (d, J = 6, H-C(1')); 4,40–4,80 (m, 8 H); 4,20 (s, Me), 3,75 (AB von ABX, CH₂(5')). MS: 598 (M⁺).

9-[3',5'-Bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-2'-O-(2-methoxyethyl)- β -D-ribofuranosyl]-6-methoxy-9H-purin (**17e**). Zu einer 60° heissen Aufschlammung von 1,17 g (48,7 mmol) NaH (100%) in 50 ml THF werden 25,4 g (42,3 mmol) **16** in 200 ml THF innert 30 min getropft. Dann werden 6,76 g (48,7 mmol) (2-Bromoethyl)-methyl-ether zugegetropft. Nach 4 h und nach 8 h Rühren bei 60° werden erneut je 0,5 g NaH und 1,9 ml Bromid zugegeben. Nach total 9 h Rühren wird das Gemisch nach Abkühlen vorsichtig auf H₂O gegossen und mit AcOEt extrahiert. Der eingedampfte Extrakt wird chromatographiert (Kieselgel, Hexan/Aceton 2:1): 21,7 g (78%) **17e**. Schweres Öl. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 8,52, 8,24 (2s, H-C(2), H-C(8)); 7,15–7,5 (m, 6 arom. H); 6,27 (d, J = 4,5, H-C(1')); 4,4–4,7 (m, 8 H); 4,20 (s, Me); 3,7–4,0 (m, CH₂, CH₂(5')); 3,50 (m, CH₂); 3,37 (s, Me). MS: 656 (M⁻).

3',5'-Bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-2'-O-(2-methoxyethyl)adenosin (**18e**). Der Lsg. von 12,27 g (18,6 mmol) **17e** in 400 ml MeOH wird im 1-l-Autoklaven 200 ml gas-förmiges NH₃ aufgedrückt. Nach 6 h Erhitzen auf 120° (max. 45 bar) wird das abgekühlte Gemisch eingedampft und chromatographiert (Kieselgel, AcOEt/MeOH 9:1): 10,62 g (89%) **18e**. Weisses Schaum. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 8,33, 8,14 (2s, H-C(2), H-C(8)); 7,15–7,50 (m, 6 arom. H); 6,21 (d, J = 4, H-C(1')); 5,22 (br. s, NH₂); 4,3–4,8 (m, 8 H); 3,70–3,95 (m, CH₂, CH₂(5')); 3,55 (m, CH₂); 3,28 (s, Me). MS: 641.

2'-O-(2-Methoxyethyl)adenosin (**19e**). Die Lsg. aus 3,15 g (4,89 mmol) **18e** und 50 ml MeOH wird bei 35°/3 bar über 0,6 g 5% Pd/C und mit 0,587 g (14,7 mmol) MgO-Zusatz hydriert. Nach 30 h wird erneut 0,6 g Pd/C zugegeben. Nach total 65 h sind 100% H₂ aufgenommen worden. Man filtriert und dampft ein. Der Rückstand wird chromatographiert (Kieselgel, AcOEt/MeOH 4:1): 1,47 g (92%) **19e**. Weisses Pulver. ¹H-NMR (250 MHz, (D₆)DMSO): 8,49, 8,13 (2s, H-C(2), H-C(8)); 7,47 (br. s, NH₂); 5,99 (d, J = 7, H-C(1')); 5,44 (t, OH-C(5')); 5,18 (d, OH-C(3')); 3,5–4,6 (m, 9 H); 3,35 (s, Me). MS: 360 ([M + C]⁻).

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-(2-methoxyethyl)-N⁶-(1-methylpyrrolidin-2-yliden)adenosin-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (**20e**). Zuerst werden 1,44 g (4,43 mmol) **19e** in 50 ml Pyridin gelöst und wieder eingedampft. Dieser Vorgang wird wiederholt. Der Rückstand wird in 15 ml MeOH gelöst und mit 0,84 g (5,76 mmol) 2,2-Dimethoxy-1-methylpyrrolidin versetzt. Nach 19 h Rühren bei RT. wird die Lsg. eingedampft.

Zur Entfernung von MeOH wird erneut 2 mal in Pyridin aufgenommen und eingedampft. Der Rückstand wird in 15 ml Pyridin gelöst und mit 1,50 g (MeO)₂Tr-Cl versetzt. Das Gemisch wird 20 h bei RT. gerührt, dann auf H₂O gegossen und mit AcOEt extrahiert. Der eingedampfte Extrakt wird chromatographiert (Kieselgel, AcOEt/MeOH/NEt₃ 90:10:1). Der erhaltene Schaum (1,71 g) wird in 6 ml CH₂Cl₂ gelöst und zu einer Suspension aus 1,52 g (4,84 mmol) (2-Cyanoethyl)-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidit, 0,96 g (5,6 mmol) Diisopropylammonium-tetrazolid und 6 ml CH₂Cl₂ getropft. Nach 7 h wird erneut 0,2 Phosphorodiamidit und 0,12 g Tetrazolid zugegeben. Nach total 72 h Rühren wird das Gemisch auf ges. NaHCO₃-Lsg. gegossen, die wässr. Phase mit AcOEt extrahiert und die vereinigte org. Phase getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Chromatographie (Kieselgel, AcOEt/NEt₃: 98/2) ergibt **20e** als Diastereoisomerenmischung (1:1), das aus CH₂Cl₂ mit Pentanzusatz als weisses Pulver anfällt (1,95 g, 49%). ³¹P-NMR (250 MHz, CDCl₃): 150,427, 149,874. MS: 909 ([M + H]⁺).

*O*⁶-Benzyl-N²-isobutyrylguanin (**21**). Zu einer Suspension von 23,65 g (0,09 mol) 9-Acetyl-N²-isobutyrylguanin [**22**], 14,6 g (0,135 mol) Benzylalkohol, 35,4 g (0,135 mol) PPh₃ und 860 ml Dioxan werden unter Rühren 23,5 g (0,135 mol) Diethyl-azodicarboxylat in 40 ml Dioxan getropft. Nach 48 h Weiterrühren bei RT. wird das Gemisch filtriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird in 1 l EtOH/H₂O 1:1 aufgenommen und 1 h rückflusiert, die heisse Suspension abfiltriert und der Kristallkuchen mit Et₂O gewaschen und getrocknet: 11,61 g (42%) **21**. Schmp 132–133°. ¹H-NMR (250 MHz, (D₆)DMSO): 10,23 (s, NH); 8,11 (s, H–C(8)); 7,2–7,45 (m, 5 arom. H); 5,48 (s, CH₂); 3,10 (br. s, NH); 2,72 (sept., Me₂CH); 0,96 (d, J = 7, Me₂CH). MS: 322 ([M + NH₄]⁺).

2'-O-Acetyl-O⁶-benzyl-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-N²-isobutyrylguanin (**22**). Unter Rühren werden zur Suspension aus 7,97 g (25,6 mmol) **21** in 140 ml Toluol 31,25 g (153,6 mmol) BSA gegeben und auf 100° erwärmt. Nach 1 h tritt Lsg. ein; es werden 13,4 g (25,6 mmol) **5** und 7,4 g (33,2 mmol) TiOSiMe₃ zugegeben. Das Gemisch wird weitere 3 h auf 100° gehalten. Nach dem Abkühlen wird auf 250 ml ges. NaHCO₃-Lsg. gegossen, die org. Phase klarfiltriert (von 3,57 g (45%) nicht reagiertem **21**), die wässr. Lsg. mit AcOEt extrahiert und der Extrakt mit obiger filtrierter Phase vereinigt, getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel chromatographiert (Toluol/AcOEt 4:1): 9,6 g (47%) **22**. Weisser Schaum. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 8,02 (s, H–C(8)); 7,83 (s, NH); 7,15–7,55 (m, 11 arom. H); 6,10 (d, J = 4, H–C(1')); 5,78 (dd, H–C(2')); 5,62 (AB, CH₂); 5,05, 4.35 (2m, 2 CH); 4,73, 4,61 (je AB, je CH₂); 3,87 (AB von ABX, CH₂(5')); 3,00 (sept., Me₂CH); 2,13 (s, Ac); 1,25 (d, J = 7, Me₂CH). MS: 802 ([M + H]⁺).

*O*⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)guanin (**23**). Im 1-l-Autoklaven werden zu 7,60 g (9,5 mmol) **22** in 270 ml MeOH 60 g gas-förmiges NH₃ aufgedrückt und 48 h bei 70° gehalten (max. 8 bar). Die Lsg. wird klarfiltriert und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel chromatographiert (Toluol/AcOEt 2:1): 5,2 g (80%) **23**. Weisser Schaum. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 7,83 (s, H–C(8)); 7,15–7,55 (m, 11 arom. H); 5,96 (d, J = 7, H–C(1')); 5,55 (AB, CH₂); 4,93 (br. s, NH₂); 4,50–4,80 (m, 5 H); 4,30 (m, 3 H); 3,73 (AB von ABX, CH₂(5')). MS: 690 ([M + H]⁺).

*O*⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-N²-(1-methylpyrrolidin-2-yliden)guanin (**24**). Zu einer Lsg. von 23,5 g (34 mmol) **23** in 200 ml MeOH und 50 ml THF werden 5,4 g (37 mmol) 2,2-Dimethoxy-1-methylpyrrolidin gegeben und bei RT. gerührt. Nach 16 h werden erneut 2,7 g des Pyrrolidins zugegeben. Nach total 24 h Rühren wird die Lsg. eingedampft: 28,0 g (> 100%) **24**. Gelbes Harz, welches direkt in die folgende Stufe eingesetzt werden kann. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): u. a. 8,01 (s, H–C(8)); 6,14 (d, J = 5,5, H–C(1')); 5,57 (s, C₆H₂CH₂); 3,75 (AB von ABX, CH₂(5')); 3,02 (s, MeN). MS: 771 ([M + H]⁺).

*O*⁶-Benzyl-3',5'-bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-2'-O-(2-methoxyethyl)-N²-(1-methylpyrrolidin-2-yliden)guanin (**25e**). Die Suspension von 12,91 g (16,7 mmol) **24**, 140 ml THF und 0,48 g (20,1 mmol) NaH wird 10 min gerührt und dann mit 2,80 g (20,1 mmol) (2-Bromoethyl)-methyl-ether versetzt. Danach wird 18 h unter Rückfluss erhitzt, und erneut werden 0,24 g NaH und 1,4 g Bromid zugegeben. Nach total 23 h wird abgekühlt und das Gemisch auf 200 ml H₂O gegossen und mit AcOEt extrahiert. Der Extrakt wird mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und eingedampft: 12,9 g (93%) **25e**. Gelbes Harz. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): u. a. 8,08 (s, H–C(8)); 6,31 (d, J = 4,5, H–C(1')); 5,62 (s, C₆H₅CH₂); 3,28 (s, MeO); 3,11 (MeN). MS: 829 ([M + H]⁺).

3',5'-Bis-O-(2,4-dichlorobenzyl)-2'-O-(2-methoxyethyl)-N²-(1-methylpyrrolidin-2-yliden)guanin (**26e**). Die Lsg. von 12,6 g (15,16 mmol) **25e** in 150 ml MeOH wird über 2,5 g 5% Pd/C bei RT. und Normaldruck hydriert. Nach 1 h wird kein weiteres H₂ aufgenommen. Das Gemisch wird klarfiltriert und eingedampft: 11,05 g (98%) **26e**. Braunes Harz. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 9,13 (br. s, NH); 7,92 (s, H–C(8)); 6,09 (d, J = 4,5, H–C(1')); 3,28 (s, MeO); 3,04 (s, MeN). MS: 739 ([M + H]⁺).

2'-O-(2-Methoxyethyl)-N²-(1-methylpyrrolidin-2-yliden)guanin (**27e**). Die Lsg. von 5,29 g (7,14 mmol) **26e** und 100 ml MeOH wird über 857 mg MgO und 0,5 g 10% Pd/C bei Normaldruck und RT. hydriert. Nach Aufnahme von 98% H₂ kommt die Hydrierung zum Stillstand. Das Gemisch wird filtriert und eingedampft und der Rückstand über Kieselgel chromatographiert (AcOEt/MeOH 4:1): 2,08 g (69%) **27e**. Weisser Schaum.

¹H-NMR (250 MHz, (D₆)DMSO): u. a. 8,02 (s, H–C(8)); 5,77 (d, J = 6, H–C(1')); 3,12 (s, MeO); 2,91 (s, MeN). MS: 421 ([M–H][–]).

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-(2-methoxyethyl)-N²-(1-methylpyrrolidin-2-yliden)guanosin-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit] (**28e**). Wie für **12** und **20e** beschrieben, wird **27e** in **28e** übergeführt. ³¹P-NMR (250 MHz, CDCl₃): 150,798, 150,474. MS: 925 ([M + H]⁺).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. M. Weintraub, *Sci. Am.* **1990**, 262, 40.
- [2] C. Helène, S. Toulme, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1049, 99.
- [3] J. S. Cohen, *Antivir. Res.* **1991**, 16, 121.
- [4] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 543; K. Englisch, D. H. Gauss, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 629.
- [5] J. F. Milligan, M. D. Matteucci, J. C. Martin, *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 1923.
- [6] E. A. Lesnik, C. J. Guinosso, A. M. Kawasaki, H. Sasmor, M. Zounes, L. L. Cummins, D. J. Ecker, P. D. Cook, S. M. Freier, *Biochemistry* **1993**, 32, 7832.
- [7] D. Wagner, J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt, *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 24.
- [8] G. Ekborg, P. J. Garegg, *J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides* **1980**, 7, 57.
- [9] H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 6131.
- [10] B. S. Sproat, A. Iribarren, B. Beijer, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 41; E. Wagner, B. Oberhauser, A. Holzner, H. Brunar, G. Issakides, G. Schaffner, M. Cotten, M. Knollmüller, Ch. R. Noe, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 5965.
- [11] W. T. Markiewicz, *J. Chem. Res. (S)* **1979**, 24.
- [12] B. S. Sproat, A. Iribarren, R. G. Garcia, B. Beijer, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 733.
- [13] T. H. Keller, R. Häner, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 884.
- [14] E. Lukevics, A. Zablocka, 'Nucleoside Synthesis (Organosilicon Methods)', Ellis Horwood Series, 1991.
- [15] T. Kempe, F. Chow, W. I. Sundquist, T. J. Nardi, B. Paulson, S. M. Peterson, *Nucleic Acids Res.* **1982**, 10, 6695.
- [16] O. R. Martin, K. G. Kurz, S. P. Rao, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 2922.
- [17] U. Niedballa, H. Vorbrüggen, *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 3654, 3660, 3664, 3668, 3672.
- [18] F. J. M. van de Ven, C. W. Hilbers, *Eur. J. Biochem.* **1988**, 178, 1.
- [19] N. D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster, *Nucleic Acids Res.* **1984**, 12, 4539.
- [20] T. R. Webb, M. D. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2764.
- [21] S. L. Beaucage, P. I. Radhakrishnan, *Tetrahedron* **1992**, 48, 2223.
- [22] T. F. Jenny, K. C. Schneider, S. A. Benner, *Nucleosides Nucleotides* **1992**, 11, 1257.
- [23] 'Oligonucleotide Synthesis – a Practical Approach', Ed. M. J. Gait, IRL Press, Oxford, 1984.
- [24] U. Piesles, W. Zürcher, M. Schär, H. E. Moser, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 3191.
- [25] S. M. Freier, D. D. Albergo, D. H. Turner, *Biopolymers* **1982**, 22, 1107.
- [26] A. M. Iribarren, B. S. Sproat, P. Neuner, I. Sulston, U. Ryder, A. I. Lamond, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 7747.
- [27] P. Martin, A. De Mesmaeker, A. Waldner, K.-H. Altmann, unveröffentlichte Resultate.
- [28] A. Eschenmoser, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 218; J. Hunziker, H. J. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Göbel, R. Krishnan, B. Jann, C. Leumann, A. Eschenmoser, *ibid.* **1993**, 76, 259.
- [29] S. M. Freier, *ISIS Pharmaceutical*, Carlsbad (Kalifornien), private Mitteilung.
- [30] B. C. Froehler, S. Wadwani, T. J. Terhorst, S. R. Gerrard, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5307; B. C. Froehler, R. J. Jones, X. Cao, T. J. Terhorst, *ibid.* **1993**, 34, 1003.
- [31] W. Saenger, 'Principles of Nucleic Acid Structure', Springer Verlag, New York, 1984.
- [32] S. M. Freier, W. F. Lima, Y. S. Sanghvi, T. Vickers, M. Zounes, P. D. Cook, D. J. Ecker, 'Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA', Eds. R. P. Erickson and J. G. Izant, Raven Press, New York, 1992.
- [33] D. Herschlag, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, 6921.
- [34] G. D. Hoke, K. Draper, S. M. Freier, C. Gonzales, V. B. Driver, M. C. Zounes, D. J. Ecker, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 3373.
- [35] P. Martin, T. Winkler, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 1678.