

**SYNTHESE, EIGENSCHAFTEN UND ANWENDUNG
GALLENSÄURE DERIVATISIERTER ANTISENSE
OLIGONUKLEOTIDE GEGEN HEPATITIS C VIRUS RNA**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Thomas Lehmann
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main

April 2001

(D F 1)

Vom Fachbereich Chemie der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Walter E. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim W. Engels
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Griesinger

Datum der Disputation: 16. November 2001

Für Nicole

*Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an,
interessant zu werden,
wo sie aufhört.*

Justus von Liebig, Briefe

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1996 bis April 2000 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Joachim W. Engels am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Joachim W. Engels danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung, die sehr guten experimentellen Bedingungen und die gewährte akademische Freiheit. Durch seine Erfahrung und die stetige Bereitschaft zu anregenden Diskussionen hat er stets Einfluß auf die Gestalt dieser Arbeit genommen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang H. Caselmann und Herrn Dr. Matthias Serwe an der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität zu Bonn danke ich für die erfolgreiche, spannende und freundschaftliche Zusammenarbeit auf dem Hepatitis C Gebiet.

Herrn Prof. Jan Michalski, Herrn Dr. Wojciech Dabkowski und Frau Izabela Tworowska von der Polish Academy of Sciences in Lodz danke ich für die intensive Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Fluorphosphonate. Besonders möchte ich mich für die Einladung zu einem mehrwöchigen Forschungsaufenthalt nach Lodz und die mir entgegengebrachte Gastfreundschaft bedanken.

Darüber hinaus danke ich allen Angehörigen des Instituts und des Fachbereichs Chemie, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben. Besonderer Dank gilt:

Meinen Kolleginnen und Kollegen Karin Schwarzer, Dr. Uwe Parsch, Dr. Christian Wojczewski, Dr. Markus Schweitzer und Dr. Peter Schell für ihre Freundschaft, die angenehme Zusammenarbeit sowie stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Der NMR-Abteilung unter Leitung von Herrn Dr. G. Zimmermann, Herrn Olbrich, Frau Kaiser, Frau Schmid und Frau Langner für die Messung von zahlreichen NMR-Spektren sowie die fachkundigen Diskussionen bei allen NMR-spezifischen Fragestellungen.

Frau Kerstin Jahn Hofmann und Frau Beate Conrady für die Synthese und Aufreinigung zahlreicher Oligonukleotide sowie ihre Hilfe bei Trennproblemen und der Durchführung chromatographischer Analytik.

Frau Ilona Prieß und Frau Hannelore Brill für die Aufnahme der Massenspektren sowie Marianne Christof für die Durchführung der Elementaranalysen.

Herrn Dr. Peter Schell und Dr. Valentin Wittmann für die Erstellung computergestützter Literaturrecherchen.

Frau Karin Schwarzer und Herrn Dr. Matthias Serwe für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Allen nicht namentlich genannten Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt ferner:

Herrn Dr. G. Dürner und seinen Mitarbeitern danke ich für die Diastereomentrennungen.

Herrn Dr. E. Uhlmann, seinen Kollegen und Mitarbeitern danke ich für zahlreiche wissenschaftliche Gespräche.

Dem Graduiertenkolleg „Chemische und biologische Synthese von Wirkstoffen“ danke ich für ein Promotionsstipendium, für Forschungsgelder und die finanzielle Unterstützung beim Besuch von wissenschaftlichen Tagungen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Frau Nicole, meinen Familien und meinen Freunden für ihre Geduld und fortwährende Unterstützung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Nucleinsäuren sind die zentralen Moleküle des Lebens	1
1.2 Aufbau, Eigenschaften und Struktur der Nucleinsäuren	8
2. Das Antisense-Konzept	13
2.1 Strategien der artifiziellen Regulation der Genexpression	16
2.1.1 Das Antigen-Konzept	16
2.1.2 Der Ribozym-Ansatz	18
2.1.3 Der Aptamer-Ansatz	19
2.2 Antisense Oligonukleotide müssen chemisch modifiziert werden.....	20
2.2.1 Phosphorothioate	22
2.2.2 Methyl-, Benzyl- und Phenylphosphonate.....	24
2.2.3 Dephospho-Modifikationen	26
2.2.4 Zucker-Modifikationen	29
2.2.5 Oligonukleotid-Konjugate	30
2.2.6 Minimal modifizierte Oligonukleotide	31
2.3 Wirkmechanismen von Antisense Oligonukleotiden	32
2.4 Antisense Oligonukleotide müssen an die Target-RNA binden.....	35
2.5 Therapeutischer Einsatz von Antisense Oligonukleotiden	40
3. Zellaufnahme von Oligonukleotiden	43
3.1 Werden Oligonukleotide in das Cytoplasma transportiert ?.....	44
3.2 Nichtvirale Vektoren	46
3.3 Virale Vektoren	49
3.4 Cholesterol gekoppelte Oligonukleotide	50
3.5 Gallensäuren	51
3.5.1 Der enterohepatische Kreislauf.....	52
3.5.2 Funktion und Aufbau der Leber.....	53
3.5.3 Transportproteine der Hepatozyten	54

3.5.4 Drug Targeting und Membrantransport Gallensäure modifizierter Wirkstoffe	56
3.5.5 Gallensäure gekoppelte Oligonukleotide.....	57
4. Hepatitis-Viren.....	59
4.1 Was sind Viren ?	59
4.2 Die Virushepatitiden.....	62
4.2.1 Hepatitis A	63
4.2.2 Hepatitis B	64
4.2.3 Hepatitis D und E.....	64
4.3 Hepatitis C	65
4.3.1 Struktur und Replikation des HCV	66
4.3.2 HCV-Genotypen	70
4.3.3 Prävalenz, Übertragung und medizinische Diagnostik des HCV	71
4.3.4 Vermehrungszyklus des HCV und Krankheitsverlauf.....	73
4.3.5 Immunabwehr, antivirale Wirkstoffe und Therapien gegen HCV	75
4.3.6 Antisense-Strategien gegen HCV	80
5. Aufgabenstellung	83
6. Chemische Synthesen	85
6.1 Auswahl der Synthesestrategie.....	85
6.2 Darstellung von Cholsäurederivaten für die Festphasensynthese	88
6.2.1 Selektives Schützen der funktionellen Gruppen der Cholsäure.....	88
6.2.2 Einführen eines Linkers über die 3 α -Hydroxylfunktion	90
6.2.3 Schutzgruppenstrategie für die Säurefunktion der Cholsäure	92
6.2.4 Umsetzung des Allylester-Konzepts.....	94
6.2.4.1 Lösung der Schutzgruppenproblematik für die 7 α - und 12 α -Hydroxylgruppe.....	97
6.3 Darstellung von Taurocholsäurederivaten für die Festphasensynthese.....	101

6.4 Darstellung von analogen Cholesterol-Phosphoramiditen	104
6.4.1 Einführung des 2-Hydroxyethoxy-Linkers analog zur Cholsäurederivatisierung	105
6.4.2 Phosphitylierung des 3 β -(2-Hydroxyethoxy)-cholesterols.....	106
7. Synthese von Oligonukleotiden	109
7.1 Enzymatische Synthese von Oligonukleotiden	109
7.2 Chemische Synthese von Oligonukleotiden	109
7.3 In dieser Arbeit synthetisierte Oligonukleotide.....	110
7.3.1 Synthese von Phosphorothioaten	111
7.3.2 Synthese Phosphatrückgrat- und 5'-Cholsäure modifizierter Oligonukleotide	112
7.3.3 Synthese Phosphatrückgrat- und 5'-Taurocholsäure oder 5'-Cholesterol modifizierter Oligonukleotide	115
7.3.4 Synthese von kurzen Sequenzen: DNA-Hexamere	116
7.3.5 Dimersynthese in Lösung	117
8. Antisense Oligonukleotide gegen HCV.....	119
8.1 Übersicht der bisherigen Resultate	119
8.2 Auswahl der Zielsequenz.....	121
8.2.1 Beschreibung der Testsysteme.....	123
8.2.1.1 <i>In vitro</i> Translations-Assay	123
8.2.1.2 Zellkultur Translations-Assay	124
8.2.1.3 Kontroll-Plasmide	125
8.2.2 Ergebnisse der HCV-Inhibierung durch verkürzte Sequenzen.....	126
8.2.2.1 Ergebnisse der <i>in vitro</i> Translations-Assays	127
8.2.2.2 Ergebnisse des Zellkultur Translations-Assays.....	130
8.3 Gallensäure- und Cholesterol-gekoppelte Oligonukleotide gegen HCV	133
8.3.1 Analytik und Eigenschaften der Antisense Oligonukleotide gegen HCV	134
8.3.1.1 RP-HPLC und Lipophilie der Antisense Oligonukleotide.....	135
8.3.1.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Antisense Oligonukleotide	140
8.3.1.3 UV-Schmelzkurven der Antisense Oligonukleotide	142

8.3.2 Ergebnisse der HCV-Inhibierung mit Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten.....	148
8.3.2.1 Ergebnisse der <i>in vitro</i> Translations-Assays	148
8.3.2.2 Ergebnisse des Zellkultur Translations-Assays.....	150
9. Benzylphosphonate.....	153
9.1 Synthese der Benzylphosphonate	153
9.2 Eigenschaften der Benzylphosphonate.....	158
9.2.1 NMR-spektroskopische Studien isomerenreiner Benzylphosphonat Dimere	158
9.2.2 CD-spektroskopische Studien mit isomerenreinen d(CGCp _{Bn} GCG)-Hexameren	163
9.2.3 Hybridisierungsverhalten am Beispiel einer HCV-Hairpinstruktur	168
10. Fluorphosphonate.....	170
10.1 Synthese der Fluorphosphoramidite	170
10.2 Dimerkupplungen mit Fluorphosphoramiditen	173
10.3 Dimerkupplungen mit Trimethylsilylchlorid als Aktivator.....	176
10.4 Chemische Stabilität von Phosphor-Fluor-Bindungen	178
11. Zusammenfassung und Ausblick	180
12. Experimenteller Teil.....	184
12.1 Allgemeines.....	184
12.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel	184
12.1.2 Geräte und Ausrüstung	187
12.1.3 Chromatographie	188
12.1.4 NMR-Spektroskopie	190
12.1.5 Massenspektrometrie (MS).....	190
12.1.6 Weitere Analyseverfahren	191

12.2 Einzelverbindungen	191
12.2.1 Cholsäurederivate	191
12.2.2 Geschützte Nukleoside	220
12.2.3 Benzylphosphonate	235
12.2.4 Fluorphosphonate.....	251
12.3 Synthese von Oligonukleotiden.....	264
12.3.1 Trägerabspaltung und Entschützen der Oligonukleotide.....	264
12.3.2 Aufreinigung der Oligonukleotide.....	266
12.4 Analytik der Oligonukleotide	270
12.4.1 Quantifizierung der Menge an Oligonukleotid in OD ₂₆₀ -Einheiten	270
12.4.2 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ in Oligonukleotiden	271
12.4.3 Berechnung der Molekülmasse von Oligonukleotiden.....	272
12.4.4 Analytische RP-HPLC von Oligonukleotiden	274
12.4.5 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Oligonukleotiden	274
12.4.6 Massenspektrometrie	275
12.5 Aufnahme von UV-Schmelzkurven	276
12.6 CD-Spektroskopie von Oligonukleotiden	279
13. Literaturverzeichnis	280
14. Anhang.....	312
14.1 Abbildungen ausgewählter NMR- und Massenspektren	312
14.2 Abkürzungen und Symbole	338
14.3 Publikationen und Poster	344

1. Einleitung

1.1 Nukleinsäuren sind die zentralen Moleküle des Lebens

Noch vor der Entdeckung des DNA-Doppelhelix-Modells durch James Watson und Francis Crick 1953 konnten Alfred Hershey und Martha Chase 1952 zeigen, daß bei Infektionen mit dem Bakteriophagen T4 nur die DNA, nicht aber die Proteinhülle in die Bakterienzelle eindringt. Damit war bewiesen, daß Nukleinsäuren die Träger der genetischen Information sind. Die Fähigkeit lebender Zellen, in einem chaotischen Universum eine hochgradige Ordnung aufrechtzuerhalten, beruht auf dieser genetischen Information, die ausgeprägt, aufrechterhalten, verdoppelt und gelegentlich verbessert wird. Verantwortlich dafür sind im wesentlichen vier genetische Prozesse: RNA- und Proteinbiosynthese, DNA-Reparatur, DNA-Replikation und genetische Rekombination. Heute lassen sich Gene mit Hilfe der Gentechnik gezielt manipulieren und enzymatische und chemische Methoden zur Herstellung synthetischer Nukleinsäuren und zu deren Sequenzierung wurden entwickelt. Außerdem spielen synthetische Nukleinsäuren heute eine große Rolle bei der Behandlung von Krankheiten, wie in dieser Arbeit noch gezeigt werden wird.

Die Entwicklung der klassischen Genetik ist unmittelbar mit dem Namen des Augustinermonchs Gregor Mendel verknüpft, der 1865 erkannte, daß Eigenschaften von Organismen nach bestimmten Regeln auf die Nachkommen vererbt werden (Mendel, 1866). Er zog den Schluß, daß es „Erbfaktoren“ geben müsse, die über die Keimzellen weitergegeben und neu kombiniert werden. Die chemische Substanz, die zur Ausprägung der von Mendel beobachteten phänotypischen Erbmerkmale führt, wurde erstmals 1868 von Friedrich Miescher aus den Zellkernen weißer Blutkörperchen isoliert. Richard Altman prägte 1889 den Namen Nukleinsäuren für diese Substanzklasse. Er bezeichnete damit die proteinfreie, phosphorhaltige Substanz, die er aus Zellkernen isolieren konnte. Kurz zuvor hatte Oscar Hertwig die Verschmelzung zweier Keimzellen beim Befruchtungsvorgang beobachtet und Wilhelm Roux und August Weismann entdeckten 1883 die Chromosomen als Träger der Erbanlagen. Erst in der Mitte des 20. Jahrhunderts sollte die molekulare Struktur eines Gens aufgeklärt werden.

Zuvor gelang dem Mikrobiologen Fred Griffith 1928 der Nachweis des „transformierenden Prinzips“ bei Untersuchungen an Pneumokokken. Er entdeckte, daß durch Hitze abgetötete, pathogene Pneumokokken der S-Form durch Vermischen mit lebenden, nicht-

pathogenen Pneumokokken der R-Form in die pathogene S-Form transformiert werden können. Er selbst klärte jedoch die chemische Natur der von ihm entdeckten Transformation nicht auf. Es blieb Oswald Avery, Colin MacLeod und Maclyn McCarty vorbehalten, die Desoxyribonukleinsäure als Überträger der genetischen Information zu identifizieren. Sie erkannten, daß die irreversible Transformation von R-Pneumokokken in die S-Form durch Behandlung mit reiner DNA erreicht werden konnte und daß lediglich bei Zugabe von Desoxyribonukleasen die Transformationsaktivität verschwand (Avery, 1944). Den endgültigen Nachweis, daß die DNA der Träger der genetischen Information ist, lieferten 1952 Alfred Hershey und Martha Chase. Sie markierten spezifisch die DNA des Bakteriophagen T4 mit dem Radioisotop ^{32}P und die Proteinhülle mit dem Radioisotop ^{35}S und infizierten ein Bakterium. Nach der Trennung von Bakterien und Phagen und anschließender Zentrifugation befand sich die Phagen-DNA hauptsächlich in den Bakterien, während die Phagenproteine im Überstand zu finden waren. Die markierten Phagenproteine wurden im Gegensatz zur markierten DNA nicht auf die Nachkommen übertragen (Hershey, 1952).

Anfang der fünfziger Jahre führten die Arbeiten von Alexander Todd zu einem besseren Verständnis der molekularen Zusammensetzung der DNA. Er konnte zeigen, daß die einzelnen Nukleoside über 5'-3'-Phosphodiesterbrücken miteinander verknüpft sind (Brown, 1952). Erwin Chargaff beobachtete, daß in der DNA der Anteil der Purinbasen Adenin und Guanin stets dem Anteil der Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin entspricht. Aus diesem Ergebnis geht die nach ihm benannte Chargaff-Regel hervor (Chargaff, 1951). Im Jahre 1953 gelang es schließlich James Watson und Francis Crick, die dreidimensionale Struktur der DNA aufzuklären (Watson, 1953a). Sie analysierten Röntgenbeugungsbilder von DNA-Fasern, die Rosalind Franklin und Maurice Wilkins aufgenommen hatten und leiteten daraus die doppelhelikale Struktur der DNA aus zwei antiparallelen Strängen ab. Für diese Arbeiten wurden Francis Crick, James Watson und Maurice Wilkins 1962 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Die Entdeckung der DNA-Doppelhelix ebnete den Weg zum molekularen Verständnis der Genfunktion. Der Bau von Molekülmodellen vermittelte ein Bild, wie die Stränge der Doppelhelix zusammengehalten werden. Danach paart Adenin spezifisch mit Thymin unter Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen und Guanin spezifisch mit Cytosin unter Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen, im Einklang mit der kurz zuvor aufgestellten Regel von Chargaff. Das Zucker-Phosphodiester Rückgrat befindet auf der Außenseite der Doppelhelix.

Bereits einen Monat nach Veröffentlichung der Struktur publizierten Watson und Crick eine Hypothese des Mechanismus für die Replikation der DNA (Watson, 1953b). Im

Jahre 1958 bewiesen Matthew Meselson und Franklin Stahl die semikonservative Replikation experimentell, indem sie die Eltern-DNA von *E. coli* durch Gabe von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als einziger Stickstoffquelle mit dem schweren Stickstoffisotop ^{15}N markierten. Danach wurden die Bakterien auf einem Medium mit $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ vermehrt und die Verteilung von ^{15}N und ^{14}N mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation aufgeklärt. Nach einer Generation wurde nur eine Bande erhalten. Die Doppelhelix der Eltern DNA war nicht als intakte Einheit erhalten geblieben, sondern mußte sich getrennt haben und nach den Regeln der Watson-Crick-Basenpaarung als Matrize für den Aufbau neuer Stränge gedient haben (Meselson, 1958). Das Enzym, das die schrittweise Addition von Desoxyribonukleotideinheiten an eine DNA-Kette katalysiert, ist die DNA-Polymerase, die 1958 von Arthur Kornberg aus *E. coli* isoliert wurde.

In den folgenden Jahren wurde der Fluß der genetischen Information vom Gen zum Protein aufgeklärt. Da die Erbanlagen im Zellkern abgelegt sind, die Biosynthese der Proteine aber ein cytoplasmatischer Prozeß ist, mußte ein Botenmolekül existieren, das die genetische Information der DNA ins Cytoplasma transportiert. 1961 identifizierten François Jacob und Jacques Monod eine kurzlebige Ribonukleinsäure: die messenger-RNA (mRNA) (Jacob, 1961). Zuvor hatte Francis Crick das zentrale Dogma der Molekularbiologie über den Informationsfluß in einer Zelle aufgestellt (Crick, 1958; Crick, 1970):

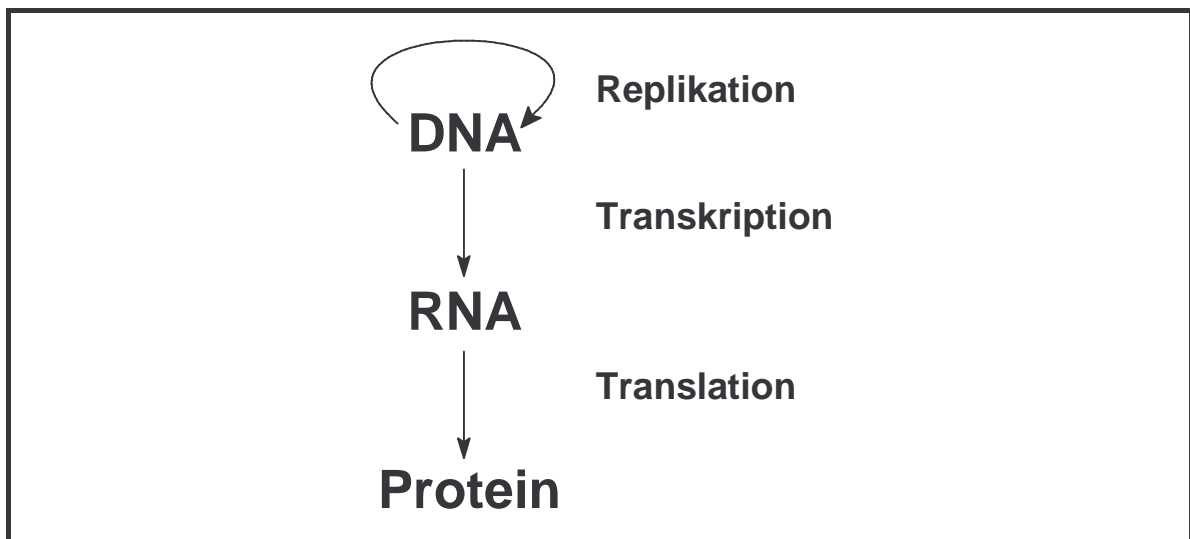


Abb. 1.1: Das zentrale Dogma der Molekularbiologie (Crick, 1970)

Die DNA ist für die Speicherung und Weitergabe der genetischen Information zuständig. Diese wird beim Prozeß der Transkription durch RNA-Polymerasen in die mRNA übersrieben. Die mRNA wird dann an den Ribosomen mit Hilfe eines Adaptermoleküls, der

transfer-RNA (tRNA), im Prozeß der Translation in eine Proteinsequenz übersetzt. Es wurde deutlich, daß nicht etwa die Struktur der mRNA, sondern allein die Abfolge der Basen für die Aminosäuren codierte. Da natürliche Proteine aus 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut werden, mußte mindestens eine Abfolge von drei Nukleotiden für eine Aminosäure codieren. Die Entschlüsselung des genetischen Codes, die Zuordnung von 64 möglichen Basentriplets zu den 20 zugehörigen Aminosäuren, wurde hauptsächlich von Marshall Nirenberg, Robert Holley und Gobind Khorana vorangetrieben, die für ihre Leistung 1968 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden (Nirenberg, 1963; Khorana, 1965). Sie erkannten, daß einige Aminosäuren von mehreren Basentriplets codiert wurden, d. h. der genetische Code ist degeneriert. Drei Codons entsprachen keiner Aminosäure und fungieren als Stopcodons. Das Basentriplett AUG codiert die Aminosäure Methionin und ist das Startsignal der Proteinbiosynthese. Bemerkenswert ist, daß dieser genetische Code nahezu universell ist und von fast allen Lebewesen verwendet wird.

In den frühen siebziger Jahren hat die Technik der DNA-Rekombination die Biochemie revolutioniert. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen konnten lange DNA- oder RNA-Stränge spezifisch geschnitten, mit Hilfe von Ligasen anschließend neuartig verknüpft werden. Die Namen von Herbert Boyer und Stanley Cohen sind mit diesen ersten gentechnologischen Arbeiten verbunden (Cohen, 1973). Heute sind die Isolierung von DNA aus Organismen, das Schneiden und Rekombinieren, das Einfügen chemisch synthetisierter Abschnitte und die Zurückübertragung in eine Zelle Standardoperationen. Heute ist man außerdem in der Lage, nicht nur Mikroorganismen, sondern auch Pflanzen und Tiere gentechnisch zu verändern. Die Gentechnologie hat die Biologie und Medizin revolutioniert und das methodische Repertoire der Wissenschaftler deutlich erweitert.

Zur Sequenzbestimmung von DNA-Molekülen wurden 1977 unabhängig voneinander zwei Sequenziermethoden entwickelt. Allan Maxam und Walter Gilbert bestimmten die Sequenz durch spezifische chemische Spaltung eines am 5'-Ende radioaktiv markierten Strangs (Maxam, 1977). Die wichtigere Methode ist die von Frederick Sanger verwirklichte Didesoxy-Methode. Dabei werden unterschiedlich lange Fragmente durch eine kontrollierte Unterbrechung der enzymatischen Replikation erzeugt. Der kontrollierte Abbruch erfolgt durch den Einbau eines 2',3'-Didesoxyribonukleosidtriphosphats, dem die 3'-Hydroxylgruppe für die Kettenverlängerung fehlt. Vier solche Ansätze, die alle vier Desoxyribonukleosidtriphosphate enthielten, aber jeweils nur ein Didesoxyanalogon, führten nach gelelektrophoretischer Auftrennung der erhaltenen Abbruchfragmente auf vier Bahnen zur Basensequenz (Sanger, 1977).

Auch heute noch werden die Sequenzieretechniken, die auf der Grundidee der Dideoxymethode beruhen, weiter verfeinert. Mit leistungsfähigen Sequenzierautomaten konnten bislang zahlreiche Vireng Genome und auch das aus etwa 13.500.000 Basenpaaren bestehende Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* 1996 vollständig sequenziert werden (Schuler, 1996; Goffeau, 1996). Mit großem Aufwand wird seit Ende der achtziger Jahre weltweit organisiert die vollständige Sequenzierung der etwa drei Milliarden Nucleotide des menschlichen Genoms betrieben. In wenigen Jahren wird der Abschluß des „human genome project“ (HUGO) zu einem besseren Verständnis komplexer zellulärer Zusammenhänge und der molekularen Mechanismen von Krankheiten beitragen. Auf der anderen Seite ist die gesellschaftliche Diskussion über die Ausnutzung dieser Daten und mögliche ethische Fragestellungen entbrannt.

1977 wurde entdeckt, daß die meisten eukaryotischen Gene Mosaiken aus Introns und Exons sind. Ein Beispiel für ein derartiges diskontinuierliches Gen eines höheren Organismus ist das β -Globin-Gen, das bedingt durch zwei Introns aus drei voneinander getrennten codierenden Sequenzen (Exons) besteht. Die Introns werden enzymatisch aus dem Primärtranskript herausgeschnitten und die Exons zur reifen mRNA verknüpft, ein Vorgang, der als Spleißen bezeichnet wird.

1981 wurde in der Arbeitsgruppe von Tom Cech die enzymatische Aktivität der Ribonukleinsäuren nachgewiesen. Die Vorstufe eines ribosomalen RNA Vorläufers in *Tetrahymena* war in der Lage, sich selbst zu spleißen (Cech, 1981). Dieses Ergebnis war überraschend, galt doch bislang die Vorstellung, daß ausschließlich Proteine als Enzyme wirken können. Besonderen Stellenwert unter diesen Ribozymen hat das 1987 von Olke Uhlenbeck entdeckte Hammerhead-Ribozym erlangt, da es sich aufgrund seiner geringen Größe leicht synthetisch herstellen läßt und als Therapeutikum zum spezifischen Schneiden von RNA verwendet werden kann (Uhlenbeck, 1987).

Die Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) durch Kary Mullis ermöglichte die *in vitro* Amplifikation ausgewählter DNA-Abschnitte (Saiki, 1985). Bei diesem Verfahren wird ein Stück doppelhelikaler DNA durch Hitze getrennt. Die im Überschuß vorhandenen Primer hybridisieren beim Kühlen mit den komplementären DNA-Sequenzen. Durch Inkubation mit einer DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate wird die DNA enzymatisch synthetisiert. Für die effiziente Vermehrung der DNA sind 20 bis 30 Reaktionszyklen erforderlich. Die PCR ist hochempfindlich. Kleinste Mengen DNA oder revers transkribierte RNA lassen sich auf diese Weise analysieren. Die PCR hat einen festen Platz in der Gerichtsmedi-

zin und der medizinischen Diagnostik, da sie das zellfreie Klonieren eines DNA-Abschnitts in wenigen Stunden ermöglicht.

Die routinemäßige chemische Synthese von Oligonukleotiden wurde erst durch die Übertragung auf einen festen Träger möglich. Dabei wird das Oligonukleotid Baustein für Baustein aufgebaut. Bei der heute verwendeten Phosphoramidit-Methode wird der Strang entgegen der enzymatischen Synthese durch Polymerasen in 3'→5'-Richtung verlängert. Die hier relevante Chemie wurde von Serge Beaucage und Marvin Caruthers (Beaucage, 1981; Caruthers, 1985; Caruthers, 1987; Beaucage, 1992; Beaucage, 1993) basierend auf der von Robert Letsinger (Letsinger, 1975; Letsinger, 1976) gefundenen Phosphitriester-Methode entwickelt. Die automatisierte Synthese nach der Phosphoramiditmethode wird auf Glas mit definierter Porenweite (CPG) als fester Phase durchgeführt. Das erste Nukleosid ist über seine 3'-Hydroxylgruppe über einen Linker mit der festen Phase verknüpft. Dessen geschützte 5'-Hydroxylgruppe wird mit dem *N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit eines geschützten Nukleosids unter 1*H*-Tetrazol Aktivierung zur Reaktion gebracht. Die dreiwertigen Phosphoramidite zeichnen sich durch leichten synthetischen Zugang, durch hohe Stabilität gegenüber Hydrolyse und Luftoxidation sowie gute Lagerfähigkeit in pulverisierter Form aus. Die Synthese an fester Phase bietet den Vorteil, daß überschüssige Reagenzien und Nebenprodukte durch Spülen mit Lösungsmittel entfernt werden können und eine Aufreinigung nach jedem Kupplungsschritt entfällt. Mit Hilfe moderner Syntheseautomaten dauert die Kupplung einer Base nur wenige Minuten. Die rasche Verfügbarkeit synthetischer Oligonukleotide beschleunigte die Erforschung ihrer Struktur, lieferte Primer für die enzymatische Oligonukleotidsynthese und hat die Anwendung von Oligonukleotiden als Therapeutika überhaupt erst ermöglicht.

Heute lassen sich durch kombinatorische Synthese auf biologischen Chips ganze Bibliotheken von Oligonukleotiden auf kleinstem Raum an exakt bekannter Position synthetisieren. Diese von Stephen Fodor entwickelte Technologie eröffnet neue Möglichkeiten bei der DNA-Mutationsanalyse, beim Sequenzieren von Nukleinsäuren, in der medizinischen Diagnostik und möglicherweise auch beim Screening nach Angriffsstellen für therapeutische Oligonukleotide auf einer gefalteten RNA (Fodor, 1991; Fodor, 1993).

Das heutige Wissen über Struktur und Funktion von Oligonukleotiden führte zu einer stetig wachsenden Bedeutung dieser Verbindungsklasse bei der gezielten Anwendung in der Therapie von Krankheiten. Heute bereits haben chemisch modifizierte Nukleosidanaloga einen festen Platz bei der Behandlung von Tumoren oder viralen Erkrankungen. Therapeutische Oligonukleotide finden im Anti-Gen- oder Antisense-Konzept breite An-

wendung. Sie wirken wie auch die Ribozyme sequenzspezifisch, sind also direkt auf eine zu inhibierende Zielsequenz in den Erbanlagen, auf eine mRNA oder virale RNA zugeschnitten. Die Wirkung von Aptameren hingegen beruht auf der spezifischen Erkennung von Sekundärstrukturen. Die Wirkmechanismen therapeutischer Oligonukleotide werden in Kapitel 2 ausführlich besprochen.

1990 wurden erste klinische Studien zur somatischen Gentherapie am Menschen vorgenommen. Bei einer Gentherapie werden einem Organismus Zellen entnommen, in Kultur vermehrt, gentechnisch verändert und anschließend dem Patienten wieder eingepflanzt. Ein Beispiel für eine solche Reparatur eines defekten Gens ist der Adenosin-Desaminase Mangel, der zu einer lebensbedrohenden Immunschwäche führt. Durch Übertragung des intakten Gens für das Enzym Adenosin-Desaminase in Blutzellen wird die Ursache der Erkrankung kausal beseitigt. Von der routinemäßigen Durchführung gentherapeutischer Verfahren ist man trotz einiger Erfolge aber noch weit entfernt.

Mit einem Eingriff wie der Gentherapie sind eine Reihe ethischer Fragen verknüpft. Nach heutigen Vorstellungen ist das Einbringen genetischen Materials in einen Menschen nur zum Zweck der Korrektur eines Gendefekts ethisch vertretbar. Die Manipulation von Keimzellen oder eine Genmanipulation mit der Absicht, einem gesunden Menschen bessere Eigenschaften zu verleihen, ist eine Schreckensvision. Genmanipulierte (transgene) Pflanzen und Tiere hingegen, die besondere Eigenschaften besitzen oder gewisse Merkmale ausprägen, können durchaus erstrebenswert sein. Ein hohes Maß an Verantwortungsbewußtsein im Umgang mit diesen neuen Technologien ist gefordert (Primrose, 1990).

Durch intensive Forschung wurde in den vergangenen Jahrzehnten die zentrale Rolle der Nukleinsäuren bei der Speicherung und Weitergabe der genetischen Information aufgeklärt. Neben vielen überraschenden Erkenntnissen wie der Entdeckung der katalytischen Aktivität der RNA können Nukleinsäuren als wichtige Werkzeuge bei der Untersuchung zellulärer Prozesse oder als potente Wirkstoffe dienen. Die Vorstellung, DNA sei ein eher starres Molekül, ist der Erkenntnis von der großen Flexibilität, Dynamik und Vielfalt dieser Verbindungsklasse gewichen. Eine Darstellung der Grundlagen von Aufbau und Struktur dieser Verbindungsklasse wird im folgenden Abschnitt gegeben.

1.2 Aufbau, Eigenschaften und Struktur der Nucleinsäuren

Die DNA ist ein sehr langes, fadenförmiges Makromolekül aus zahlreichen Desoxyribonucleotiden, die jeweils aus einer Base, einem Zucker und einer Phosphatgruppe bestehen. Die Basen der DNA tragen die genetische Information, während die Zucker und Phosphatgruppen eine strukturelle Aufgabe erfüllen.

Die Desoxyribonucleoside sind über ihre 3'- und 5'-Hydroxylgruppen mittels Phosphodiesterbindungen mit dem jeweils benachbarten Desoxyribonucleosid verknüpft. Der Zuckeranteil der Desoxyribonucleotide ist die 2'-Desoxy-D-Ribose. Sie bildet zusammen mit den Phosphodiesterseinheiten das Rückgrat des Desoxyribonucleotids. Im Gegensatz zu den Ribonucleinsäuren (RNA), deren Zuckeranteil die D-Ribose ist, fehlt der DNA die 2'-Hydroxylfunktion mit weitreichenden Konsequenzen für deren Struktur. Über die 1'-Position der 2'-Desoxy-D-Ribose oder D-Ribose erfolgt die Verknüpfung zu den heterozyklischen Nucleobasen über eine β -N-glykosidische Bindung. Die Basen liegen somit oberhalb der Ebene des Zuckerrings und können zwei Hauptorientierungen annehmen: In der bei natürlichen Nucleosiden vorherrschenden *anti*-Konformation weist der Hauptteil des Heterozyklus vom Zucker weg. Die *syn*-Konformation wird nur bei Purinen in der Z-DNA gefunden. Hier ist der Heterozyklus in Richtung des Zuckers orientiert. Die *syn*- und *anti*-Konformation ist über den Torsionswinkel χ definiert (bei Purinen: O4'-C1'-N9-C4 und bei Pyrimidinen: O4'-C1'-N1-C2).

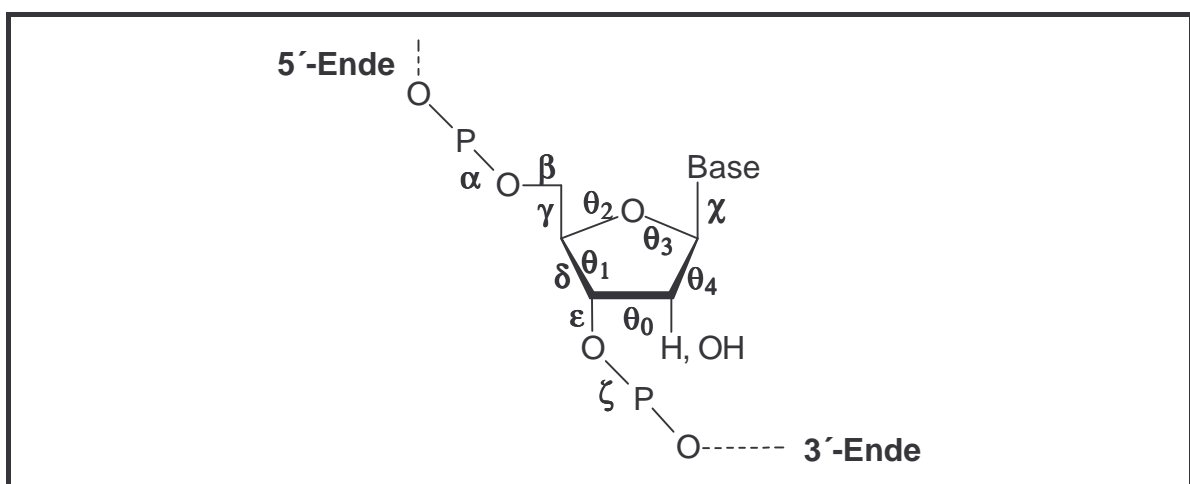


Abb. 1.2: Phosphatrückgrat der Nucleinsäuren mit Notationen der Torsionswinkel

Die stickstoffhaltigen Basen der Desoxyribonucleoside sind Derivate des Purins oder des Pyrimidins. Als Purine kommen in der DNA Adenin (A) und Guanin (G), als Pyrimidine

Thymin (T) und Cytosin (C) vor. In Ribonukleosiden tritt an die Stelle des Thymins Uracil (U), dem die Methylgruppe an der 5-Position fehlt. Eine Einheit aus Base und Zucker bezeichnet man als Nukleosid. In DNA-Molekülen kommen die vier Desoxynukleoside Desoxyadenosin dA, Desoxyguanosin dG, Desoxythymidin dT und Desoxycytidin dC vor. Die analogen Nukleoside der RNA heißen Adenosin rA, Guanosin rG, Uridin rU und Cytidin rC. Mit Phosphatgruppen veresterte Nukleoside bezeichnet man als Nukleotide. Zur Unterscheidung der Numerierung im Zuckerring und im Heterozyklus wird an die Kohlenstoffatome des Zuckers ein zusätzliches Apostroph angefügt (IUPAC, 1983).

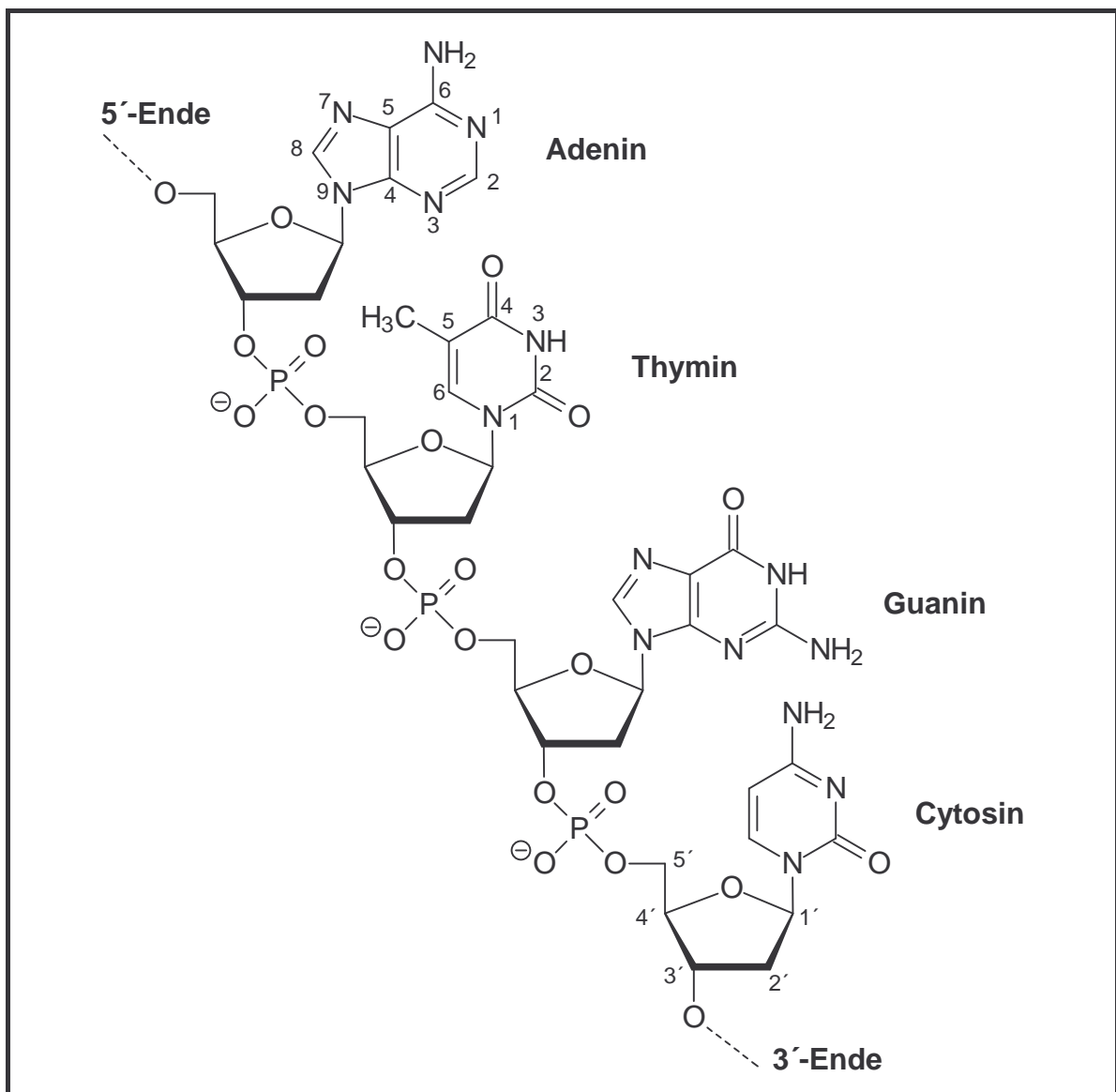


Abb. 1.3: Schematischer Aufbau der DNA mit Bezeichnung der Nucleobasen

Die fünfgliedrigen Furanoseringe der Zucker sind nicht planar. Durch die unterschiedliche Faltung (puckering) der Riboseeinheiten werden unterschiedliche Helixtypen gebildet. Die

Furanoseringe können so gefaltet sein, daß sich vier Atome coplanar in einer Ebene befinden, während das fünfte Atom um etwa 0,05 nm aus dieser Ebene herausragt (envelope-Konformation). Befinden sich die aus der Ebene herausstehenden Atome auf der selben Seite wie das C5'-Atom, werden sie mit *endo* bezeichnet. Stehen sie auf der gegenüberliegenden Seite, so nehmen sie die *exo*-Konformation ein. In Nukleinsäuren findet man stets die C2'-*endo*- oder C3'-*endo*-Konformation. Die C2'-*endo*-Konformation des Furanoseringes führt zur Ausbildung einer Helix der B-Form, während die C3'-*endo*-Konformation die Formierung einer Helix der A-Form induziert.

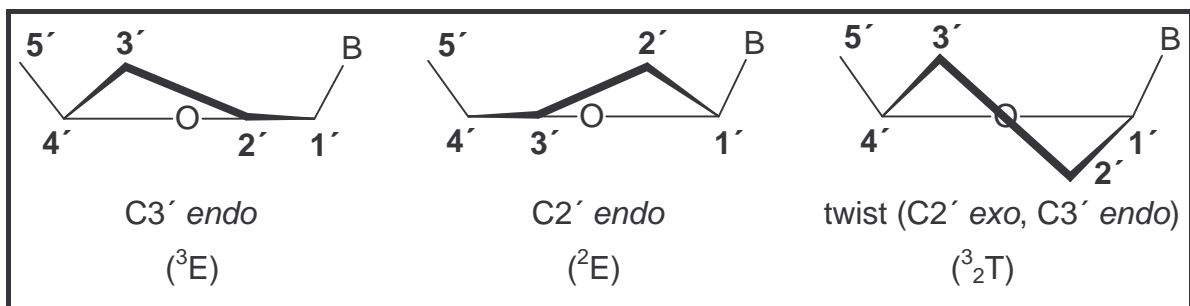


Abb. 1.4: Konformationen des Furanoserings

Das Rückgrat eines DNA-Moleküls ist nicht symmetrisch und weist an seinen Enden eine sekundäre 3'- und eine primäre 5'-Hydroxylgruppe mit unterschiedlichen Eigenschaften auf. DNA-Moleküle besitzen aufgrund ihres Phosphodiester-Rückgrats einen stark polyanionischen Charakter. Aufgrund dessen sind sie gut wasserlöslich und können durch Zugabe von Alkohol gefällt werden. Die exozyklischen Aminofunktionen und Ketogruppen der Heterobasen neigen nur zu einem Anteil von 10^{-4} pro Base zur Ausbildung von Amino-Imino-Tautomerien oder Keto-Enol-Tautomerien. Solche Tautomerien können zu unüblichen Basenpaarungen und damit zu Transitionen der Basensequenz führen. Eine markante Eigenschaft natürlich vorkommender DNA-Moleküle ist ihre Länge. Das Chromosom von *E. coli* ist ein einziges Molekül doppelsträngiger, helikaler DNA mit etwa vier Millionen Basenpaaren und einer molekularen Masse von 2.600.000 kd.

Wie gerade erwähnt, besitzen DNA-Moleküle die Fähigkeit, stabile Doppelhelices auszubilden. Das Prinzip der DNA-Doppelhelix wurde 1953 von Watson und Crick erkannt (Watson, 1953a; Watson, 1953b) und weist die folgenden wichtigen Eigenschaften auf:

- Zwei helikale Polynukleotidstränge sind um eine gemeinsame Achse gewunden. Die Stränge sind antiparallel angeordnet und die Helix ist rechtsgängig.

- Die Purin- und Pyrimidinbasen sind zum Inneren der Helix gekehrt, während die Phosphat- und Desoxyribosereste die äußere Oberfläche bilden. Die Ringebenen der Basen stehen senkrecht auf der Helixachse und die Zucker sind fast im rechten Winkel zu den Basen angeordnet.
- Die beiden Ketten werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin zusammengehalten. A-T-Basenpaare bilden zwei, C-G-Basenpaare drei Wasserstoffbrückenbindungen (Watson-Crick-Basenpaare). Die Doppelhelix wird zusätzlich durch π - π -Wechselwirkungen der gestapelten Basen eines Strangs stabilisiert.
- Die Reihenfolge der Basen auf einem Polynukleotidstrang ist in keiner Weise beschränkt. *In der Basensequenz liegt die genetische Information.*
- Dadurch, daß sich die glykosidischen Bindungen eines Basenpaars nicht diametral gegenüberliegen, entstehen eine große und eine kleine Furche.

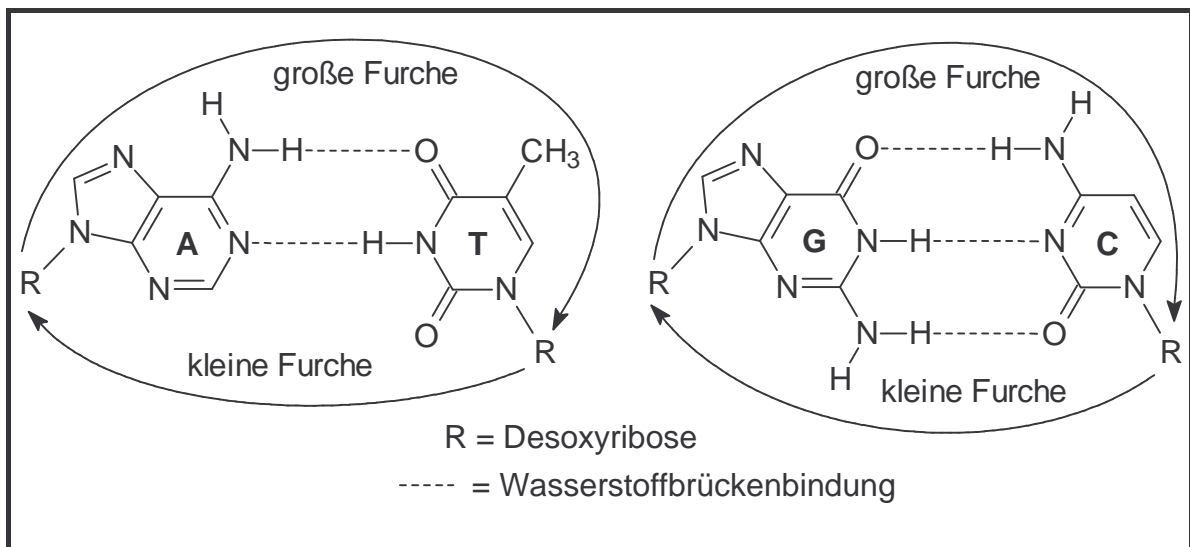


Abb. 1.5: Regeln für die Watson-Crick Basenpaarung

Eine Doppelhelix kann reversibel geschmolzen werden. Die Schmelztemperatur oder der T_m -Wert ist erreicht, wenn die Hälfte der Wasserstoffbrückenbindungen in einem Duplex verloren gegangen ist. Der Schmelzpunkt ist von der Basenzusammensetzung abhängig, da A-T-reiche Sequenzen thermodynamisch weniger stabil als G-C-reiche Sequenzen sind. *In vivo* wird die Doppelhelix durch spezifische Enzyme entspiralisiert. Das Schmelzen der hochkooperativen Struktur einer Doppelhelix läßt sich durch die Messung der Extinktion bei 260 nm verfolgen. Der Zusammenbruch der Basenpaarung führt dabei zu einer Erhöhung der Extinktion, ein Effekt, der als Hyperchromizität bezeichnet wird (Stryer, 1996).

Zu den bekanntesten helikalen Strukturen, die DNA- oder RNA-Moleküle ausbilden können, zählen die B-, A- und Z-Form. Eine B-DNA-Helix wird von DNA-Fasern bei einer relativen Feuchte von mehr als 95 % eingenommen. In physiologischen, gepufferten Kochsalzlösungen bilden komplementäre DNA-Stränge doppelhelikale Strukturen der B-Form. Die Struktur der B-DNA wurde intensiv am Dodekamer von Dickerson mit der Sequenz d(CGCGAATTCGCG) untersucht. Essentiell für die Ausbildung der B-Form sind hochgeordnete Wassermoleküle in beiden Furchen, die als Hydratationskamm (engl.: spine of hydration) an der Stabilisierung der B-DNA Doppelhelix beteiligt sind.

Bei Wasserentzug, der ein Zusammenbrechen des Hydratationskamms bewirkt, geht eine B-DNA Doppelhelix in die kompaktere A-Form über. Die A-DNA bildet wie die B-DNA eine rechtsgängige Doppelhelix aus antiparallelen Strängen, die ebenfalls dem Prinzip der Watson-Crick-Basenpaarung folgt.

Die Z-DNA weist eine von der A- und B-Form stark abweichende doppelhelikale Struktur auf. Sie wurde durch Röntgenbeugung von Einkristallen des selbstkomplementären Hexamers d(CGCGCG) und des Tetramers d(CGCG) entdeckt (Wang, 1979; Drew, 1980). Ihren Namen verdankt sie dem auffälligen Zickzackverlauf ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats. Die Umwandlung von CG-Copolymeren von der B- zur Z-DNA gelingt mit hohen Salz- oder Alkoholkonzentrationen und kann leicht CD-spektroskopisch untersucht werden (Dickerson, 1984; Johnston, 1992).

Für eine ausführliche Diskussion der DNA-Strukturen sei auf weiterführende Literatur verwiesen (Saenger, 1984; Stryer, 1996)

Die Ribonukleinsäuren zeichnen sich durch eine außergewöhnliche funktionelle Vielfalt beispielsweise als mRNA, rRNA, tRNA oder als katalytische RNA in Form von Ribozymen aus. Verbunden damit ist eine enorme strukturelle Variabilität der RNA im Gegensatz zur DNA, die sich in der Ausprägung verschiedener Sekundär- und Tertiärstrukturelemente widerspiegelt. Eine anschauliche Darstellung dieser Strukturen ist in Kapitel 4.3.1 (Abb. 4.3) gegeben.

2. Das Antisense-Konzept

Die Idee, auf der das Antisense-Konzept beruht, ist ebenso einfach wie genial. Dabei binden in vorhersagbarer Weise kurze, einzelsträngige Nukleinsäuren an komplementäre Bereiche einer mRNA oder viralen RNA und führen so zu einer Blockade der Übersetzung einer fehlerhaften genetischen Information. Die spezifische Erkennung einer Zielsequenz erfolgt durch DNA- oder RNA-Antisense Oligonukleotide nach den Regeln der Watson-Crick Basenpaarung. Voraussetzung für ein rationales Design dieser Wirkstoffklasse ist die Kenntnis der Basensequenz der zu inhibierenden Sense-RNA. Aufgrund der gewaltigen Fortschritte auf dem Gebiet der Sequenzierung konnten in den letzten Jahren viele für defekte Proteine codierenden Basensequenzen sowie virale Genome entschlüsselt werden.

Noch bevor in den achtziger Jahren die Antisense-RNA als natürliches Regulationsprinzip der Proteinbiosynthese oder DNA-Replikation zahlreicher Viren und Bakterien erkannt wurde (Uhlmann, 1990; Weintraub, 1990; Hjalt, 1992), synthetisierten Paul Zamecnik und Mary Stephenson 1978 ein Antisense Oligonukleotid, das die Replikation des Rous-Sarkom-Virus in infizierten Hühnerfibroblasten inhibierte (Zamecnik, 1978; Stephenson, 1978). Da viele Krankheiten wie Krebs oder virale Infektionen zunehmend besser auf molekularer Ebene verstanden werden, erhoffte man sich durch die Antisense-Strategie neue therapeutische Möglichkeiten. Die Behandlung viraler Infektionen ist häufig problematisch, da Viren zelluläre Prozesse zu ihrer Vermehrung ausnutzen. Medikamente gegen derartige Prozesse des Virusstoffwechsels beeinflussen gleichermaßen infizierte wie auch gesunde Zellen. Eine Antisense-Therapie, die virale Gene spezifisch inhibiert, kann im günstigsten Fall zur Heilung einer infizierten Zelle führen. Dennoch dauerte es bis 1998, bis ein erstes Präparat auf Basis des Antisense-Konzepts verfügbar war.

Mit der Entdeckung des zunächst einfachen Wirkmechanismus von Antisense Oligonukleotiden nach den klaren Regeln der Watson-Crick Basenpaarung wuchs die Zahl neuer Erkenntnisse, aber auch die der Schwierigkeiten beim Umgang mit diesen Therapeutika. Von Bedeutung war vor allem die Erkenntnis, daß Antisense Oligonukleotide nicht nur durch eine physische Blockade der Ribosomen wirken, sondern auch zelluläre Enzyme dabei eine wichtige Rolle spielen. Die im Organismus ubiquitär vorkommende RNase H kann in einem DNA-RNA-Heteroduplex selektiv den RNA-Strang spalten. Der gespaltene RNA-Strang wird danach rasch von Exonukleasen verdaut, während der Wirk-

stoff unverändert freigesetzt wird und durch die katalytische Aktivität der RNase H weitere RNA-Moleküle inaktivieren kann (Kanaya, 1993).

Eine der größten Schwierigkeiten stellte bis zur Entwicklung leistungsfähiger Syntheseautomaten die Synthese derartiger Makromoleküle dar. Heute können große Mengen von Oligonukleotiden für verschiedene Zwecke vollautomatisch nach der Phosphoramiditmethode in wenigen Stunden inklusive Aufreinigung und Analytik dargestellt werden.

Schnell erkannte man auch, daß therapeutische Oligonukleotide chemisch modifiziert werden müssen, um ihre enzymatische Stabilität gegenüber im Cytosol und Blutplasma vorkommenden Nukleasen zu erhöhen. Unveränderte DNA- oder RNA-Stränge unterliegen einem raschen enzymatischen Abbau. An die chemischen Modifikationen sind neben der Erhöhung der enzymatischen Stabilität weitere Anforderungen gestellt. So dürfen sie die Hybridisierungseigenschaften zu den Target-Strängen nicht negativ beeinflussen. Wünschenswert wäre sogar eine stärkere Bindung an das Zielmolekül. Besonders schwierig ist es, mit gegen Nukleasen geschützten Antisense Oligonukleotiden noch eine ausreichende Aktivierung der RNase H zu gewährleisten, die ein wichtiges Wirkprinzip der Antisense Technologie darstellt. Ein weiteres Problem ist die Generierung von Diastereozentren am Phosphoratom bei der Einführung von Phosphatrückgrat-Modifikationen. Vor allem aber dürfen synthetische DNA-Bausteine nicht toxisch wirken.

Die Auswahl einer Zielsequenz auf der zu inhibierenden RNA hängt von ihrer Funktionalität und ihrer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur ab. Oft werden ribosomale Bindungsstellen oder Startcodons als Zielsequenzen gewählt. Eine theoretische Vorhersage geeigneter Sequenzen ist jedoch aufgrund der komplexen Faltung von RNA-Molekülen selbst mit Hilfe von Computern sehr schwierig. Das Testen einer großen Zahl von unterschiedlichen Oligonukleotiden verschiedener Zielsequenzen, verschiedener Länge und mit voneinander abweichenden Modifikationen widerspricht dem eigentlichen Grundgedanken der Antisense Technologie als rationell herzustellende Substanzklasse. Es hat sich gezeigt, daß bereits die Verkürzung eines Antisense Oligonukleotids um ein Nukleotid oder eine Verschiebung um ein Nukleotid auf der Zielsequenz dramatische Auswirkungen auf deren Wirksamkeit haben kann. Diese Erkenntnisse erklären den langen Zeitraum von der Idee bis zur Anwendung der ersten, potenten Wirkstoffe.

Ein großes Problem stellt außerdem die Bioverfügbarkeit derartiger Wirkstoffe an ihrem Wirkort - nämlich im Inneren einer Zelle - dar. Ihr polyanionischer Charakter spricht gegen eine effiziente Zellaufnahme. Dennoch werden Oligonukleotide erfolgreich durch die Lipiddoppelschicht transportiert. Für verschieden modifizierte Oligonukleotide konnten

unterschiedliche Aufnahmewege gefunden werden. Die Strategien für eine verbesserte Internalisierung von Oligonukleotiden sind in Kapitel 3 ausführlich beschrieben.

Neben ihrer Bedeutung als wirksame Therapeutika haben sich Antisense Oligonukleotide als Werkzeuge bei der Aufklärung der Funktion von Genen bewährt. Mit ihrer Hilfe läßt sich die Expression einzelner Gene gezielt unterbinden und die Auswirkung auf Organismen untersuchen (Schlingensiepen, 1997).

Die Vorteile einer Therapie mit Antisense Oligonukleotiden liegen auf der Hand. Die meisten Therapeutika entfalten ihre Wirkung durch Wechselwirkung mit Proteinen wie Enzymen oder Rezeptoren. Ursache vieler Krankheiten ist aber häufig eine fehlerhafte, genetische Information, die beispielsweise zur Überexpression oder Biosynthese defekter Proteine führt (Engels, 1991a). Durch den Einsatz therapeutischer Antisense Oligonukleotide würden unerwünschte Proteine durch Blockade ihrer defekten mRNA erst gar nicht gebildet. Durch Transkription eines Gens werden im Zellkern etwa 100 bis 10.000 Kopien einer Botenribonukleinsäure (mRNA) synthetisiert, die nach ihrem Übertritt in das Cytoplasma von den Ribosomen in 10.000 bis 1.000.000 Proteinmoleküle translatiert werden. Die Zahl der zu inhibierenden Moleküle auf der Stufe der mRNA liegt somit um den Faktor 100 niedriger, da ein mRNA-Molekül mehrfach in ein Protein übersetzt werden kann.

Ein Säuger genom besteht aus etwa 3×10^9 Basenpaaren. Statistisch gesehen kommt die Sequenz eines 16mer Oligonukleotids bei einer Bausteinkomplexität von vier nur einmal im menschlichen Genom vor, so daß eine Sequenz dieser Länge eine hohe Bindungsspezifität aufweisen sollte. Da jedoch zu einem Zeitpunkt niemals alle Gene aktiviert sind und nicht alle Bereiche auf einer mRNA zugänglich sind, sollten auch kürzere Oligomere ausreichend spezifisch wirken (Bennett, 1998; Uhlmann, 1998a).

Zahlreiche Hürden für eine Arzneimittelentwicklung auf der Basis von Antisense Oligonukleotiden konnten in den vergangenen Jahren überwunden werden. Eine ausreichende metabolische Stabilität und Zellaufnahme sowie die Herstellbarkeit im technischen Maßstab sind gewährleistet. Der Wirksamkeitsnachweis am Menschen ist erbracht. Aufgrund ihrer aufwendigen klinischen Erprobung dominieren für eine therapeutische Anwendung bislang Indikationen gegen Krebs oder virale Infektionen. In den kommenden Jahren ist mit der Zulassung weiterer Präparate zu rechnen. In den folgenden Abschnitten sollen andere Strategien der artifiziellen Regulation der Genexpression sowie einige Aspekte des Antisense-Konzepts und die damit verbundenen Schwierigkeiten detaillierter diskutiert werden.

2.1 Strategien der artifiziellen Regulation der Genexpression

In Abbildung 2.1 sind schematisch die Möglichkeiten der artifiziellen Regulation der Genexpression aufgezeigt. Wie bereits für die Antisense Technologie einleitend skizziert, bieten synthetische Oligonukleotide einen vielversprechenden Ansatz, in den Informationsfluß der Nukleinsäuren gezielt einzugreifen. Neben dem Antisense-Konzept gibt es drei weitere wichtige Strategien. Die Bedeutung des Antigen-Konzepts sowie der Ribozym- und Aptamer-Ansatz werden im folgenden kurz dargestellt.

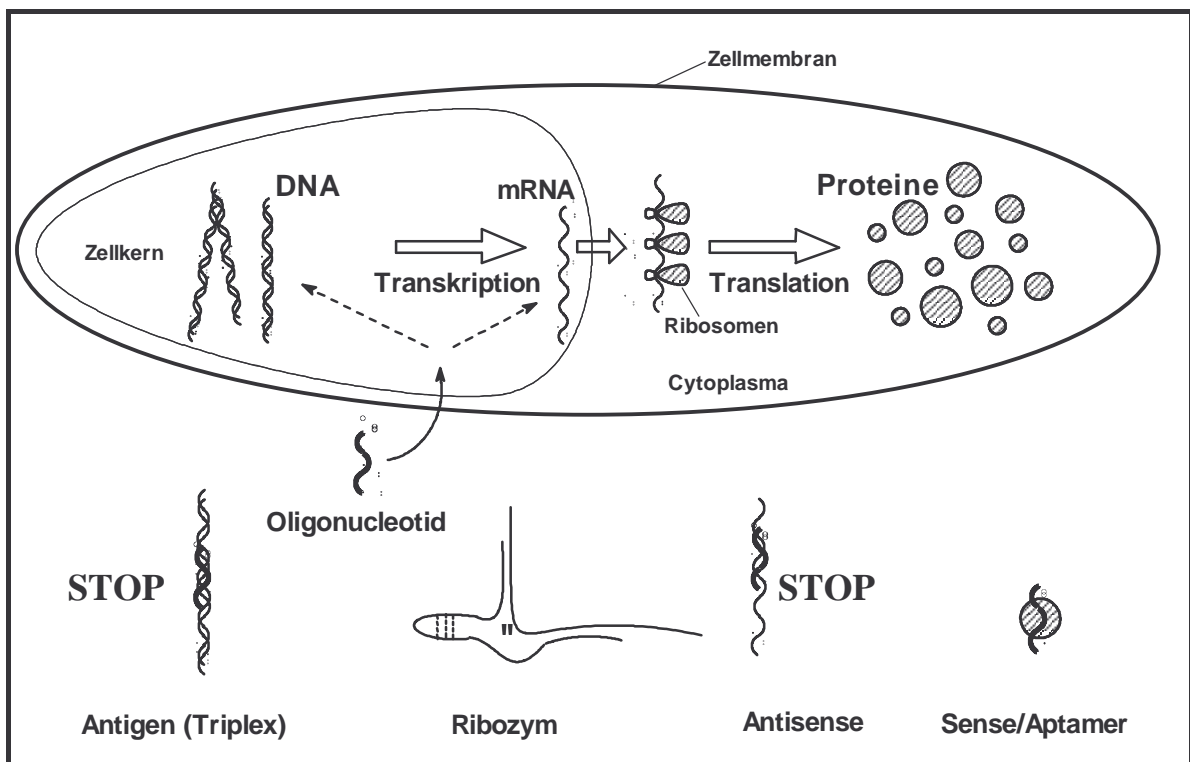


Abb. 2.1: Möglichkeiten des Eingriffs in die Genexpression in einer eukaryotischen Zelle

2.1.1 Das Antigen-Konzept

Das molekulare Ziel für Antigen Oligonukleotide ist die doppelsträngige DNA im Zellkern (Abb. 2.1). Dabei bindet ein Oligonukleotid mittels Hoogsteen- oder reversen Hoogsteen Wasserstoffbrücken an die Doppelhelix unter Ausbildung einer Tripelhelix. Der dritte Strang liegt in der großen Furche der Doppelhelix (Moser, 1987). Hoogsteen Wasserstoffbrücken mit allen Nukleotiden in der *anti*-Konformation führen zu einer parallelen Ausrichtung des dritten Polypyrimidin-Strangs in bezug auf den Homopurin-Strang des Watson-Crick-Duplex. Dieses parallele Bindungsmotiv wird auch nach der Anordnung der

Triaden als Pyrimidin-Purin-Pyrimidin Motiv bezeichnet. Reverse Hoogsteen Wasserstoffbrücken ergeben eine antiparallele Anordnung des dritten Polypurin-Strangs in bezug auf den Homopurin Strang des Watson-Crick-Duplex. Hier spricht man vom antiparallelen Bindungsmotiv oder Purin-Purin-Pyrimidin Motiv. Im Gegensatz zu Pyrimidinen verfügen Purine nach erfolgter Watson-Crick Basenpaarung über zwei weitere Donor- und Akzeptorstellen, über die eine Hoogsteen Basenpaarung möglich ist. Deshalb ist die Tripelhelixbildung bislang auf Polypurinsequenzen angewiesen.

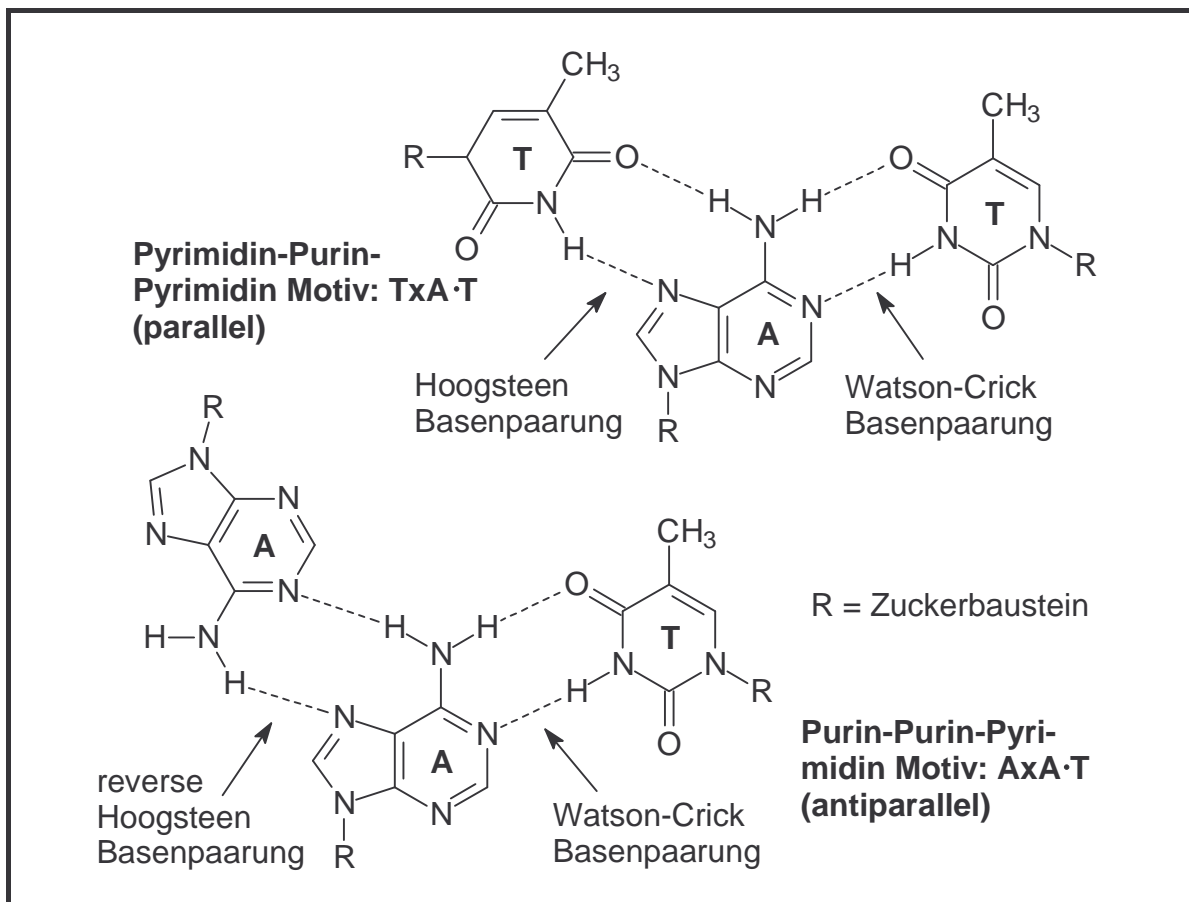


Abb. 2.2: Beispiele für Basentriaden des Pyrimidin-Purin-Pyrimidin Motivs und des Purin-Purin-Pyrimidin Motivs

Einen wesentlichen Vorteil Tripelhelix bildender Oligonukleotide stellt die Beeinflussung der Genexpression bereits auf der Ebene der Gene dar. Da in einer diploiden Zelle nur zwei Kopien eines Gens vorliegen, sollte eine geringere Dosis an Oligonukleotid gegenüber dem Antisense-Konzept für eine Inhibierung des Gens ausreichen. Von Nachteil ist der Transport des Wirkstoffs bis in den Zellkern und die Limitierung der Zielsequenzen auf Polypurinsequenzen der Doppelhelix. Letzteres Problem kann durch die Ausweitung der Erkennungssequenzen in Zukunft möglicherweise umgangen werden. Tripelhelikale Strukturen

aktivieren keine Enzyme, die das unerwünschte Gen hydrolysieren. Das therapeutische Anwendungspotential ist dem der Antisense Oligonukleotide ähnlich. Interessant erscheint vor allem die Therapie von Krebserkrankungen sowie die Bekämpfung doppelsträngiger DNA-Viren.

2.1.2 Der Ribozym-Ansatz

Ribozyme wurden 1987 entdeckt (Uhlenbeck, 1987). Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle und eröffnen neben der Antisense Technologie eine weitere Möglichkeit zur sequenzspezifischen Spaltung einer Phosphodiesterbindung von mRNA oder viraler RNA. Unter einer Vielzahl bisher gefundener Ribozyme zeichnet sich das Hammerhead-Ribozym durch seine geringe Zahl an Ribonukleotiden aus. Bereits ein Oligomer aus 30 Bausteinen ist in der Lage, eine Phosphodiesterbindung sequenzspezifisch zu spalten. Seinen Namen verdankt es seiner zweidimensionalen Struktur, die eine Ähnlichkeit mit dem Kopf eines Hammerhais vermittelt. Die katalytisch aktive Domäne des Hammerhead-Ribozyms wurde in RNA-Pflanzenviren entdeckt (Uhlenbeck, 1987; Forster, 1987). Seine Sekundärstruktur wird durch drei aufeinander zulaufende, basengepaarte Helices gebildet, die durch zwei hochkonservierte, einzelsträngige Regionen und ein hochkonserviertes, ungepaartes Nukleotid, der Spaltstelle, verknüpft sind (Symons, 1992). Die Hammerhead Konsensus Sequenz wurde durch den Vergleich verschiedener, natürlich vorkommender Hammerhead-Ribozyme erhalten (Abb. 2.3). Charakteristisch sind 14 hochkonservierte Nukleotide im einzelsträngigen Bereich. Mutationsexperimente zeigten einen vollständigen Verlust katalytischer Aktivität beim Austausch bereits eines dieser Nukleotide (Ruffner, 1990). Die Zielsequenz auf der RNA muß das Spaltungstriplett NUH tragen, um eine effiziente Katalyse zu ermöglichen. GUC ist das mit Abstand effektivste Spaltungstriplett (Shimayama, 1995).

Das Hammerhead-Ribozym ist das am besten untersuchte Ribozym und aufgrund seiner Länge leicht chemisch zu synthetisieren. Da Ribozyme aus RNA-Bausteinen aufgebaut sind, unterliegen sie einem raschen Abbau durch Nukleasen im Serum und Cytosol. Durch chemische Modifikationen an den Phosphodiesterbindungen oder den Ribosezuckern läßt sich ihre enzymatische Stabilität unter weitgehendem Erhalt der katalytischen Aktivität erheblich steigern. Bewährt haben sich 2'-Fluoro- oder 2'-Methoxyethoxy-Modifikationen an den Ribosezuckern. 5'-Terminale Beschwefelung einer Phosphodi-

estereinheit des Ribozyms bietet Schutz vor 5'-Exonukleasen (Heidenreich, 1994; Beigelmann, 1995; Scherr, 1997b).

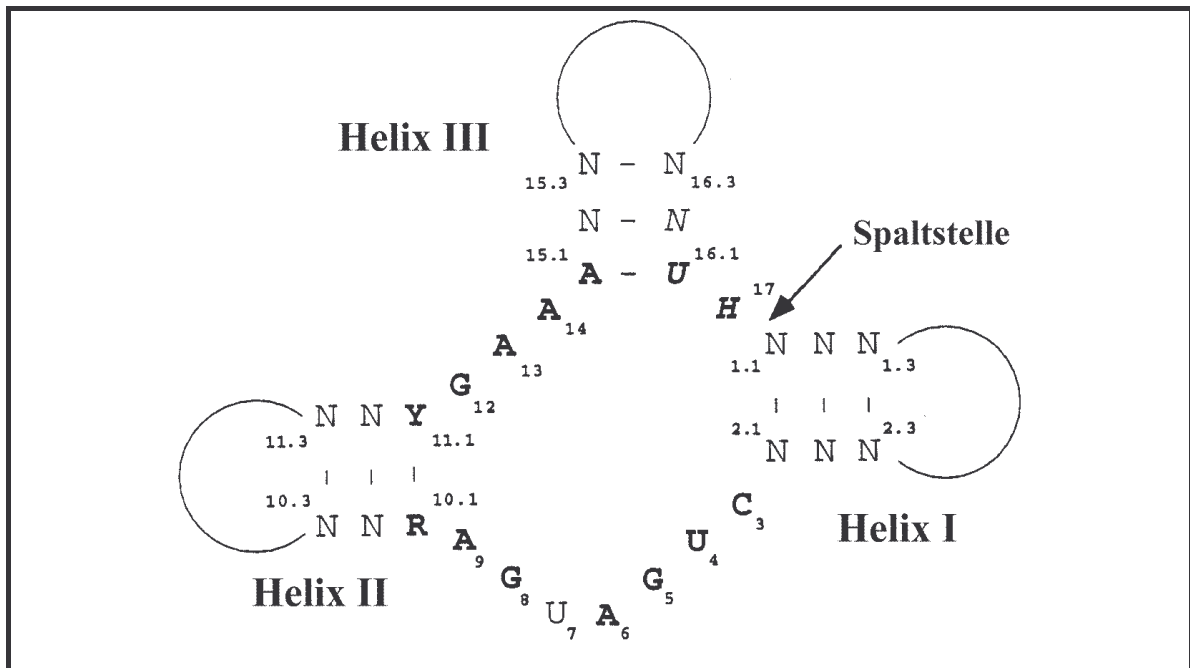


Abb. 2.3: Die Hammerhead-Konsensus-Sequenz im Ribozym-Substrat-Komplex: konservierte Nucleotide sind fett gedruckt, A = Adenosin, U = Uridin, G = Guanosin, C = Cytidin, R = Purinribonucleotid, N = beliebiges Nucleotid, H = Adenosin, Cytidin oder Uridin, Numerierung der Nucleotide und Helices nach (Hertel, 1992; Birikh, 1997)

Das Hammerhead-Ribozym zeigt nur in Gegenwart zweiwertiger Metallionen eine katalytische Aktivität. Zum einen stabilisieren zweiwertige Metallionen die Struktur, zum anderen sind sie direkt am Katalyseschritt beteiligt (Scott, 1995; Scott, 1996; Burlina, 1999). Hammerhead-Ribozyme konnten bereits erfolgreich gegen das N-ras Onkogen (Scherr, 1997a) oder auch gegen das HIV-Virus (Klebba, 2000) eingesetzt werden.

2.1.3 Der Aptamer-Ansatz

Als Aptamere bezeichnet man Nucleinsäurerezeptoren, die organische Moleküle erkennen können. Zumeist handelt es sich um einzelsträngige RNA oder DNA-Stränge, die vornehmlich Proteine, aber auch Peptide, organische Farbstoffe, Aminosäuren, biologische Cofaktoren, Antibiotika oder gar komplette Viren komplexieren können (Patel, 1997). So lassen sich mit dem Aptamer-Ansatz beispielsweise Transkriptionsfaktoren inhibieren, die für die Regulation und Expression verschiedener Gene verantwortlich sind (Stull, 1995).

Die Bindung an das Zielmolekül wird dabei spezifisch über die Sekundärstruktur der Nukleinsäure vermittelt und nicht wie bei den bisher beschriebenen Verfahren über die Sequenz eines zu inhibierenden Oligonukleotids. Die Suche nach Aptameren erfolgt über die Herstellung kombinatorischer Zufallsbibliotheken einzelsträngiger RNA oder DNA und unter Anwendung von *in vitro* Selektionsmethoden. In Abhängigkeit ihrer Sequenz findet man in einer Bibliothek eine hohe konformationelle Komplexität, die die hohe Affinität einiger Nukleinsäuren zu einem bestimmten Zielmolekül erklärt (Gold, 1995). Aptamere haben sich bereits als wertvolle Werkzeuge zur Beantwortung von Fragestellungen in der molekularen Biologie und Medizin, in der medizinischen Diagnostik und bei der Suche nach neuen Wirkstoffen bewährt.

2.2 Antisense Oligonukleotide müssen chemisch modifiziert werden

Wie einleitend erwähnt, unterliegen unmodifizierte Ribonukleotide und Desoxyribonukleotide im Blutserum und im Cytosol einem raschen enzymatischen Abbau durch Nukleasen. Für ein unmodifiziertes 25mer Oligonukleotid konnte nach intravenöser Applikation in einem Affen eine Halbwertszeit von fünf Minuten gefunden werden (Agrawal, 1995). Verantwortlich für die schnelle Degradierung sind Endo- und Exonukleasen. Unter dem Begriff Endonukleasen sind solche Enzyme zusammengefaßt, die einen Nukleinsäurestrang an bestimmten Stellen in zwei Fragmente spalten können. Restriktionsendonukleasen beispielsweise schneiden DNA-Doppelstränge an spezifischen Basensequenzen und sind deshalb für den Biochemiker ein wertvolles Werkzeug bei der Sequenzierung, bei der Isolierung von Genen und beim Aufbau neuer DNA-Moleküle, die danach kloniert werden können. Andere Endonukleasen schneiden Einzelstränge und verursachen damit eine für Antisense Anwendungen unerwünschte Aktivität. Die Zelle schützt ihre zelleigenen Nukleinsäuren oft durch Methylierung an den Schnittstellen ihrer Restriktionsendonukleasen vor unerwünschtem Verdau. Für den Abbau unmodifizierter Oligonukleotide im Serum sind hauptsächlich Exonukleasen verantwortlich. Exonukleasen degradieren unmodifizierte Oligonukleotide unter Freisetzung monomerer Bausteine von ihren Enden her. Besonders die 3'-Exonukleaseaktivität ist am Verdau von Nukleinsäuren beteiligt (Uhlmann, 1990). Ein Beispiel für eine 3'-Exonuklease ist die kommerziell erhältliche Schlangengift Phosphodiesterase, mit der die Stabilität eines modifizierten Oligonukleotids getestet werden kann. Wie können die zelleigenen Nukleinsäuren ihre Halbwertszeit erhöhen? Die zelluläre Boten-RNA wird gegen den Abbau durch 5'-Exonukleasen durch Anheften eines methy-

lierten G-Nukleotids, dem 5'-Cap, geschützt. Am 3'-Ende wird ein Poly-A-Schwanz angehängt, der ebenfalls zur enzymatischen Stabilisierung beiträgt. Die Nukleaseaktivität ist in verschiedenen Organismen sehr unterschiedlich, aber auch zwischen Serum und Cytoplasma sowie zwischen verschiedenen Zellkompartimenten treten oft Differenzen auf.

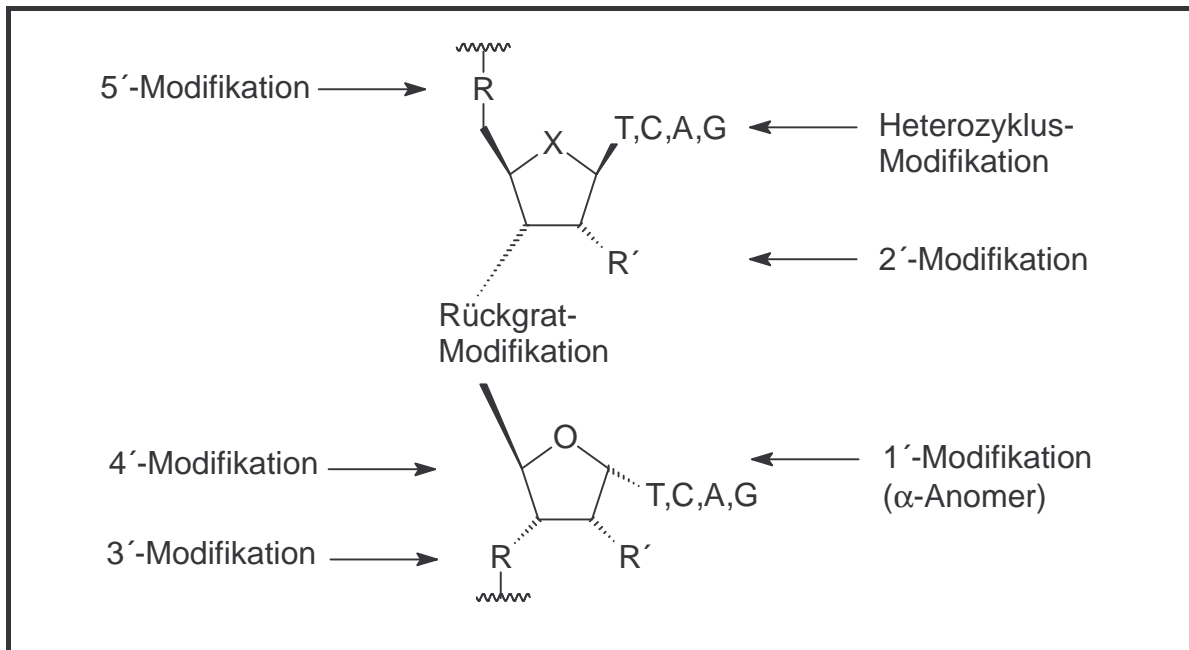


Abb. 2.4: Mögliche Positionen für die Modifikation von Oligonucleotiden (Crooke, 1996a)

Aufgrund der Aktivität der Nukleasen ist eine Stabilisierung therapeutischer Oligonucleotide unumgänglich. Da der Angriff der Nukleasen am Phosphat erfolgt, konnte sich eine Reihe verschiedener Modifikationen direkt am Phosphoratom etablieren. Die auch Phosphatrückgrat Modifikationen genannten Derivate ergeben sich durch Substitution eines nicht verbrückenden Sauerstoffatoms am Phosphodiester. Weitere wichtige Modifikationen wurden für die 2'-Position des Zuckers und die Heterobasen entwickelt. Auch durch vollständigen Ersatz der Phosphodiesterereinheit konnte die enzymatische Stabilität erhöht werden. Die weitreichendste Dephospho-Modifikation erbrachte den kompletten Austausch des Zucker-Phosphodiester-Rückgrats durch eine Peptidkette. Diese Peptidnucleinsäuren (PNAs) zeichnen sich durch außergewöhnliche Eigenschaften aus. Es hat sich gezeigt, daß ein Oligonucleotid nicht uniform mit einer Art der Modifikation verändert werden muß und daß es Strategien für eine minimale Derivatisierung eines Oligonucleotids gibt (Peyman, 1996; Uhlmann, 1997; Uhlmann, 1999). Die große Zahl unterschiedlicher Nucleinsäurederivate wird in zahlreichen Übersichtsartikeln detailliert diskutiert (Uhlmann, 1990; Milligan, 1993; Agrawal, 1995; De Mesmaeker, 1995; Hunziker, 1995; Crooke, 1996a;

Miller, 1996; Lebedev, 1996; Agrawal, 1997; Freier, 1997; Dean, 1997; Rawls, 1997; Bennett, 1998; Crooke, 1998a; Gat, 1998; Uhlmann, 1998a; Eckstein, 2000).

Die verschiedenen Modifikationen müssen über ihre eigentliche Funktion als Stabilisatoren gegen enzymatischen Abbau hinaus weitere Anforderungen erfüllen. Eine Zielsequenz muß weiterhin ohne signifikante Verschlechterung der Hybridisierungseigenschaften über Watson-Crick Basenpaarung erkannt werden. Eine Verbesserung der Zellaufnahme und eine geringe Neigung zu unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen Zellbestandteilen verbunden mit einer geringen Toxizität wären außerdem von Vorteil. Aus kommerzieller Sicht müssen die modifizierten Oligonukleotide leicht in großen Mengen darstellbar sein. Hinzu kommt eine einfache Aufreinigung und eine langfristige Lagerfähigkeit. Für die bislang bedeutendsten Modifikationen werden im folgenden einige dieser Aspekte diskutiert.

2.2.1 Phosphorothioate

Phosphorothioat Oligonukleotide wurden erstmals 1969 dargestellt (DeClercq, 1970). Nach der Geburt des Antisense-Konzepts 1978 waren es die Phosphorothioate, die zuerst als Phosphatrückgrat Modifikationen in Antisense Oligonukleotide eingebaut wurden (Eckstein, 1983). Formal erhält man Phosphorothioate durch Substitution eines nicht verbrückenden Sauerstoffatoms der Phosphodiestergruppe durch ein Schwefelatom. Die negative Ladung am Phosphor bleibt dadurch erhalten, so daß Phosphorothioate ähnliche Eigenschaften wie unmodifizierte Verbindungen aufweisen.

Die Darstellung der Phosphorothioate erfolgt völlig analog zur Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode, wobei lediglich der Oxidationsschritt durch eine Beschwefelung ersetzt werden muß. Durch einen Wechsel zwischen Oxidation und Beschwefelung lassen sich auch problemlos teilmodifizierte Oligonukleotide herstellen. Zuerst wurde elementarer Schwefel S_8 als Beschwefelungsreagenz eingesetzt. Aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in vielen organischen Lösungsmitteln wurden neue schwefelübertragende Reagenzien entwickelt. Heute ist 3-*H*-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid (Beaucages Reagenz) ein gebräuchliches Beschwefelungsmittel (Iyer, 1990).

Durch die Beschwefelung kann die Halbwertszeit des nukleolytischen Verdaus erheblich gesteigert werden (Gosh, 1992). Sowohl im Serum als auch in Zellkulturen erhöht sich die Halbwertszeit von wenigen Minuten auf 12 bis 24 Stunden (Agrawal, 1991; Crooke, 1996a). Ein weiterer Vorteil der Phosphorothioate gegenüber vielen anderen Modifika-

tionen ist ihre Eigenschaft, weiterhin Substrat für die RNase H zu sein. Erst bei höheren Dosen nimmt die Aktivität der RNase H ab (Crooke, 1996a). Aus diesen Gründen gehören die Phosphorothioate zu den am besten untersuchten Antisense Oligonukleotiden. Ihre Wirksamkeit wurde im Serum, in Zellkultur, an Tiermodellen und am Menschen bewiesen. Allerdings besitzen Phosphorothioate auch einige unerwünschte Eigenschaften, die die Entwicklung neuer Strategien zur Modifikation von Antisense Oligonukleotiden notwendig machten. Daher werden All-Phosphorothioate auch als Antisense Oligonukleotide der „ersten Generation“ bezeichnet (Uhlmann, 1998a).

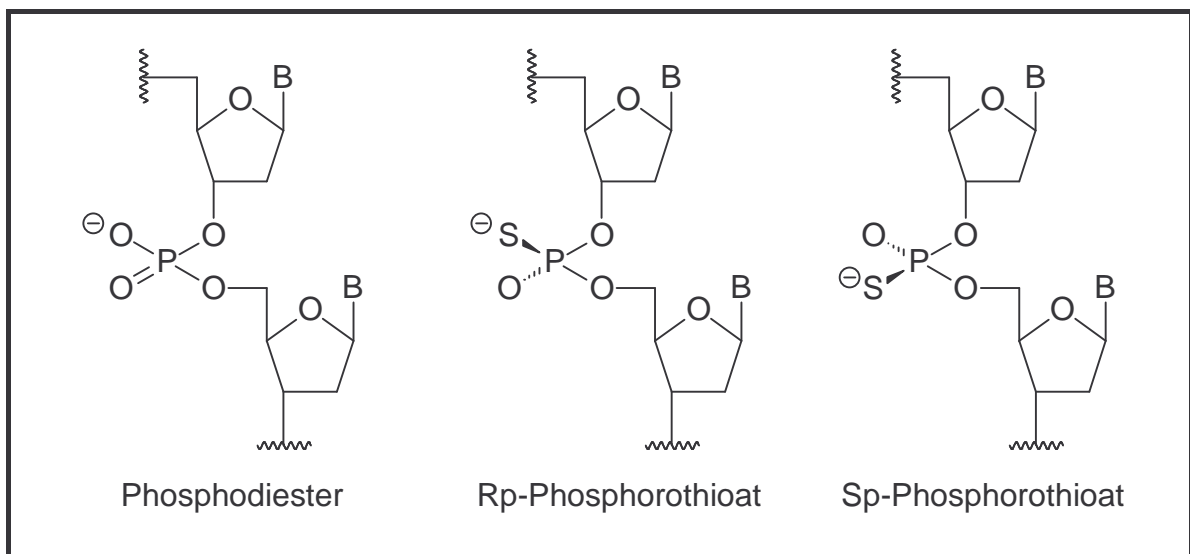


Abb. 2.5: Vergleich zwischen Phosphodiestern und den diastereomeren Phosphorothioaten

Phosphorothioate tendieren zu unerwünschten Wechselwirkungen mit Proteinen, die Bindungsstellen für Polyanionen aufweisen. Virale DNA-Polymerasen werden beispielsweise effektiv durch Phosphorothioat-Homopolymere inhibiert. Häufig wurde auch eine sequenzabhängige Bindung an Zelloberflächenproteine beobachtet, die zur Vortäuschung oder Übertönung der gewünschten Antisense Effekte führen kann. Diese störenden Nebenwirkungen erfordern in der Praxis den Einsatz verschiedener Kontroll-Oligonukleotide, um Nicht-Antisense Effekte zu erkennen (Crooke, 1996a; Crooke, 1996b; Crooke, 1997; Uhlmann, 1998a).

Bei der automatisierten Synthese von Phosphorothioaten nach der Phosphoramiditmethode werden die Thioateinheiten jeweils als Paare von Diastereomeren gebildet. Dieses Problem ergibt sich für alle Phosphatrückgrat Modifikationen, bei denen ein nicht-bindender Sauerstoff am Phosphat substituiert wird. Bei der beschriebenen Synthese der Phosphorothioate sollten sich die Isomerenpaare etwa im Verhältnis 1:1 bilden. Ein Oligo-

nukleotid mit n modifizierten Phosphodiesterseinheiten besteht somit aus 2^n Diastereomeren. Die Diastereomeren unterscheiden sich in ihrem Hybridisierungsverhalten zu DNA- oder RNA-Gegensträngen und ihrer Stabilität gegenüber Nukleasen.

Für All-Rp-Phosphorothioate konnten beispielsweise höhere T_m -Werte als für zufällige Isomerengemische und für diese wiederum höhere T_m -Werte als für All-Sp-Phosphorothioate gefunden werden. Ebenso verhielt es sich mit der Antisense-Aktivität *in vitro*. Begründet wird dieses Verhalten mit der besseren Hybridisierungs-Effizienz der All-Rp-Phosphorothioate und deren besserer Fähigkeit, die RNase H zu aktivieren (Fearon, 1997). Diese Ergebnisse machen die Synthese diastereomerenreiner All-Rp-Phosphorothioate erstrebenswert. Die Methoden zur Darstellung diastereomerenreiner Phosphorothioate (Stec, 1994; Lebedev, 1996) sind bislang aber nicht befriedigend. Das Chiralitätsproblem läßt sich auch durch die Synthese von achiralen Phosphorodithioaten umgehen. Die Dithioate haben jedoch keine große Bedeutung erlangt (Nielsen, 1988).

Sp-konfigurierte Phosphorothioate werden spezifisch von den Nukleasen S1 oder P1 hydrolysiert, während Rp-konfigurierte Thioate von der Schlangengift-Phosphodiesterase gespalten werden. Das Verhalten diastereomerenreiner Phosphorothioate gegenüber Nukleasen kann zur Aufklärung der Stereochemie von Enzymreaktionen oder umgekehrt zur Bestimmung der absoluten Konfiguration eines Phosphorothioats genutzt werden (Eckstein, 1985; Eckstein, 1989; Uhlmann, 1990).

2.2.2 Methyl-, Benzyl- und Phenylphosphonate

Oligonukleosid-Methylphosphonate wurden 1979 als nukleasestabile Analoga der Phosphodiester von Miller *et al.* und Agarwal *et al.* erstmals dargestellt (Agarwal, 1979; Miller, 1979; Kan, 1980; Miller, 1996). Sie leiten sich von unmodifizierten Nukleinsäuren durch den Ersatz eines nicht verbrückenden Sauerstoffatoms durch eine Methylgruppe ab. Die Methylphosphonateinheit wird durch den Verlust negativer Ladung für Nukleophile und Basen leichter zugänglich. Gleichmaßen geht der polyanionische Charakter derartiger Oligonukleotide verloren. Durch diese Erhöhung ihrer Lipophilie vermögen Methylphosphonate Zellmembranen leichter passiv zu penetrieren. Die Internalisierung von Methylphosphonaten ist in Kapitel 3.1 beschrieben. Die auch hier vorhandene Diastereomerie der Phosphoratome hat einen stärkeren Einfluß auf die Eigenschaften isomerenreiner Methylphosphonate als dies bei isomerenreinen Phosphorothioaten der Fall ist. Ihre Gesamtkonformation wird stark von der Chiralität des Phosphoratoms geprägt. Für Rp-Dimere konnte

eine intensivere Basenstapelung gefunden werden. In Lösung ist die Konformation der beiden Dimere nach wie vor einer B-Form DNA ähnlich (Lebedev, 1993).

Ein entscheidender Nachteil von Oligonukleosid-Methylphosphonaten ist die fehlende Aktivierung der RNase H, so daß der RNA-Strang in Heteroduplices von diesem Enzym nicht gespalten wird. Damit fehlt ein wesentlicher Wirkmechanismus der Antisense Oligonukleotide. Durch eine Teilmodifizierung kann dieser Mangel eingeschränkt werden.

Methylphosphonate bilden stabile Duplices mit DNA- oder RNA-Targets. All-Rp-Isomere weisen höhere T_m -Werte als Phosphodiester auf und diese höhere T_m -Werte als All-Sp-Isomere (Vyazovkina, 1994). Dies belegt auch für den Fall der Methylphosphonate den Wunsch nach Synthesemöglichkeiten für diastereomerenreine Oligonukleotide. Sp-Methylphosphonate weisen als B-DNA eine pseudoaxiale Ausrichtung der Methylgruppe auf, die in die große Furche gerichtet ist und sterische Wechselwirkungen zum H-3'-Proton verursacht. Eine stabilere Hybridisierung mit der Ziel-RNA kann durch die Kombination von 2'-O-Methylnukleosiden mit einem Methylphosphonat Rückgrat erreicht werden. Die meisten bisher beschriebenen Antisense-Anwendungen von Methylphosphonaten beruhen jedoch auf der Verwendung von Diastereomerenmischungen (Blake, 1985; Miller, 1991; Miller, 1996).

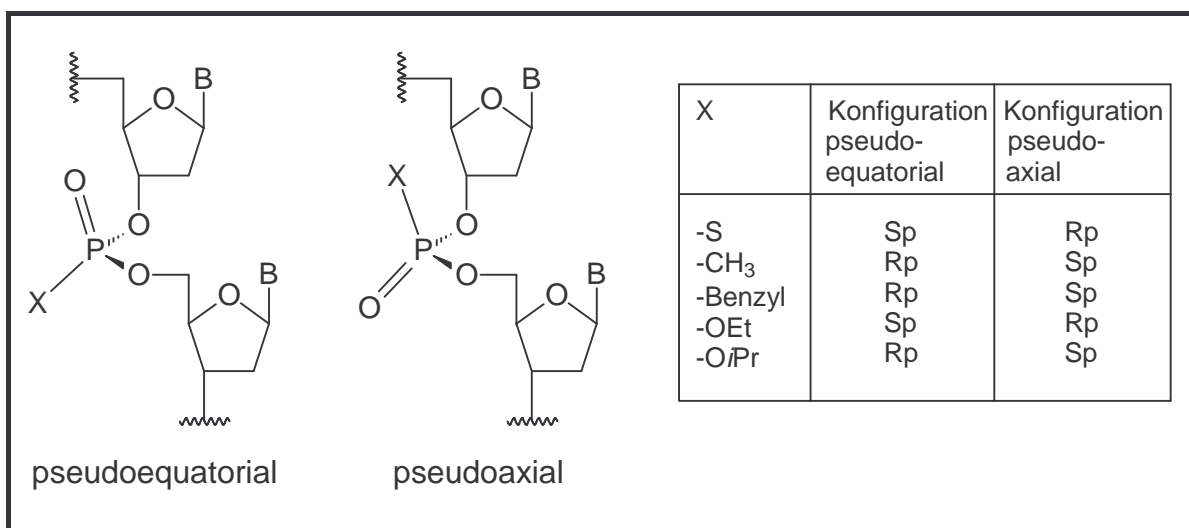


Abb. 2.6: Struktur und Konfiguration von Internukleosidbindungen von Oligonukleotid-Analoga. Aufgrund der unterschiedlichen Priorität nach der CIP-Nomenklatur ändert sich die absolute Konfiguration je nach Substituent.

Oligonukleosid-Methylphosphonate können als einfachste Vertreter einer ganzen Reihe von ungeladenen Phosphatrückgrat Modifikationen angesehen werden, die durch Substitution eines nicht verbrückenden Sauerstoffatoms durch eine kohlenwasserstoffhaltige Sei-

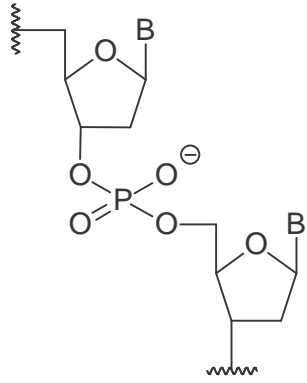
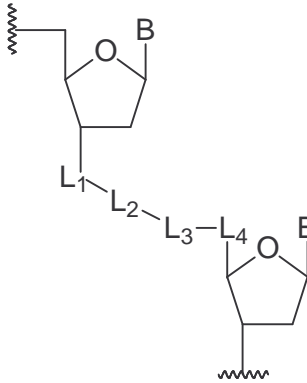
tenkette gebildet werden. Die Substitution mit einer Benzylgruppe führt zu den Benzylphosphonaten, die in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurden (Samstag, 1992; Samstag, 1994). Benzylphosphonate zeichnen sich gegenüber Methylphosphonaten durch eine deutliche Erhöhung ihrer Lipophilie aus. Diese Eigenschaft kann einen Einfluß auf die Zellaufnahme haben. Ihre Halbwertszeit bei enzymatischem Verdau erhöht sich um das Doppelte und sie hybridisieren nur unwesentlich schwächer als Methylphosphonate mit komplementären DNA- oder RNA-Targets. Ihre antiviralen Eigenschaften konnten Benzylphosphonate *in vitro* gegen das Enten-Hepatitis B Virus (Samstag, 1996) und gegen das Hepatitis C Virus *in vitro* und *in vivo* beweisen (Eisenhardt, 1996; Caselmann, 1997; Eisenhardt, 1999; Caselmann, 2000).

Zur Darstellung von Phenylphosphonat-Dimeren sind verschiedene Synthesen bekannt (Agarwal, 1979; Hashmi, 1994). Die Synthese von Phenylphosphonat-Oligonukleotiden und die Untersuchung deren Eigenschaften sind aber erst vor kurzem publiziert worden (Mag, 1997). Ihr Hybridisierungsverhalten zu DNA- oder RNA-Strängen ähnelt dem der Benzylphosphonate. Weitere Beispiele für Modifikationen sind die (Difluormethyl)phosphonate (Bergstrom, 1988) oder die Octylphosphonate (Mag, 1996). Die zuletzt beschriebenen Derivate leiten sich formal von den Methylphosphonaten durch Substitution von Methylprotonen durch andere Gruppen ab.

2.2.3 Dephospho-Modifikationen

Das unmodifizierte Phosphodiester Rückgrat enthält vier Atome (-O-PO₂-O-CH₂-) zwischen den fünfgliedrigen Ringen benachbarter Zucker. Eine große Zahl von Dephospho-Modifikationen ist beschrieben worden, in denen diese vier Atome durch ein nicht mehr phosphorhaltiges Rückgrat ersetzt wurden. Das neue Rückgrat setzt sich zumeist ebenfalls aus vier Atomen zusammen. Dabei muß sichergestellt werden, daß die Geometrie des Rückgrates so gestaltet ist, daß die Ausbildung eines Duplex mit einem komplementären, unveränderten Nukleinsäuregegenstrang möglich ist. Generelle Vorteile dieser Vorgehensweise sind im Verlust des polyanionischen Charakters gegenüber Phosphodiestern und im Verlust der Chiralität gegenüber Phosphatrückgrat Modifikationen zu sehen. Nur wenige Dephospho-Modifikationen können einen positiven Beitrag zur Stabilität ihrer Duplices leisten. Von Vorteil scheint eine Bindung, die konformationelle Starrheit verleiht, in der Mitte der Brücke zu sein. So führen Amidbindungen in dieser Position zu einer Stabilisierung des Duplex. Eine zentrale *trans* C=C Doppelbindung wies die geringste Depression

des T_m -Werts unter allen Kohlenwasserstoff-Rückgraten auf. Eine Übersicht wichtiger Dephospho-Modifikationen ist in Tabelle 2.1 gegeben (Freier, 1997).

			
Phosphodiester		Dephospho-Modifikation	
Typ	—L₁—L₂—L₃—L₄—	Typ	—L₁—L₂—L₃—L₄—
Alkyl	CH₂—CH₂—CH₂—CH₂	Sulfonamid	NH—SO ₂ —CH ₂ —CH ₂
Alkenyl	<i>trans</i>-CH₂—CH₂=CH₂—CH₂	Sulfamoyl	O—SO ₂ —NR—CH ₂
Alkenyl	<i>cis</i>-CH₂—CH₂=CH₂—CH₂	Sulfonat	O—SO ₂ —CH ₂ —CH ₂
Carbonyl	CH₂—CO—CH₂—CH₂	Sulfon	CH ₂ —CH ₂ —SO ₂ —CH ₂
Carboxyl	O—CO—CH₂—CH₂	Oxim	CH=N—O—CH ₂
Amid	CH₂—CO—NH—CH₂	MMI	CH₂—NMe—O—CH₂
Amid	CH₂—NH—CO—CH₂	MDH	CH₂—NMe—NMe—CH₂
Amid	CH ₂ —CH ₂ —NH—CO	Glykol	O—CH ₂ —CH ₂ —O
Amid	CO—NH—CH ₂ —CH ₂	Propoxy	CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ —O
Harnstoff	NR—CO—NR—CH ₂	Propoxy	O—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂
Thioharnst.	NR—CS—NR—CH ₂	Thioether	S—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂
Carbamat	O—CO—NR—CH ₂	Thioether	CH ₂ —S—CH ₂ —CH ₂
Carbamat	NR—CO—O—CH ₂	Thioether	CH ₂ —CH ₂ —S—CH ₂
Amino	NH—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂	Formacetal	O—CH ₂ —O—CH ₂
Amino	CH ₂ —NR—CH ₂ —CH ₂	Thioform.	S—CH ₂ —O—CH ₂

Tab. 2.1: Einige synthetisierte Dephosphono-Modifikationen. Die die Doppelhelix stabilisierenden Modifikationen sind fett unterlegt (Uhlmann, 1990; Freier, 1997).

Die radikalste Veränderung der natürlichen Struktur von Nukleinsäuren bestand im vollständigen Ersatz des gesamten Zucker-Phosphat-Rückgrats durch eine auf *N*-(2-Aminoethyl)glycin basierende Polyamidstruktur. Die Polyamid- oder auch Peptidnukleinsäuren (PNAs) wurden 1991 von Nielsen *et al.* erstmals beschrieben (Nielsen, 1991). PNAs binden mit höherer Affinität nach den Regeln der Watson-Crick Basenpaarung an komplementäre Nukleinsäuren. Sie können sogar einen Strang aus einem DNA/DNA-Duplex verdrängen, ein Vorgang, der mit natürlicher DNA ineffizient ist. PNA/DNA-

Chimäre können außerdem biologische Funktionen wie eine Primer-Funktion für DNA-Polymerasen erfüllen. Aufgrund ihrer interessanten Eigenschaften wurden PNAs in vielen Forschergruppen untersucht. Die Synthese von PNAs oder PNA/DNA-Chimären kann heute automatisiert an DNA-Synthesizern durchgeführt werden (Uhlmann, 1998b). Abgesehen von den Nukleobasen besitzen PNAs und DNA keine gemeinsamen funktionellen Gruppen. Trotz ihres peptidischen Rückgrats werden PNAs nicht von Peptidasen oder Proteasen verdaut und besitzen ungewöhnlich lange Halbwertszeiten. Chemisch sind sie stabil gegenüber starken Säuren und Basen wie konz. Ammoniaklösung. Aufgrund ihrer Neutralität ist ihre Wasserlöslichkeit gegenüber Phosphodiestern reduziert.

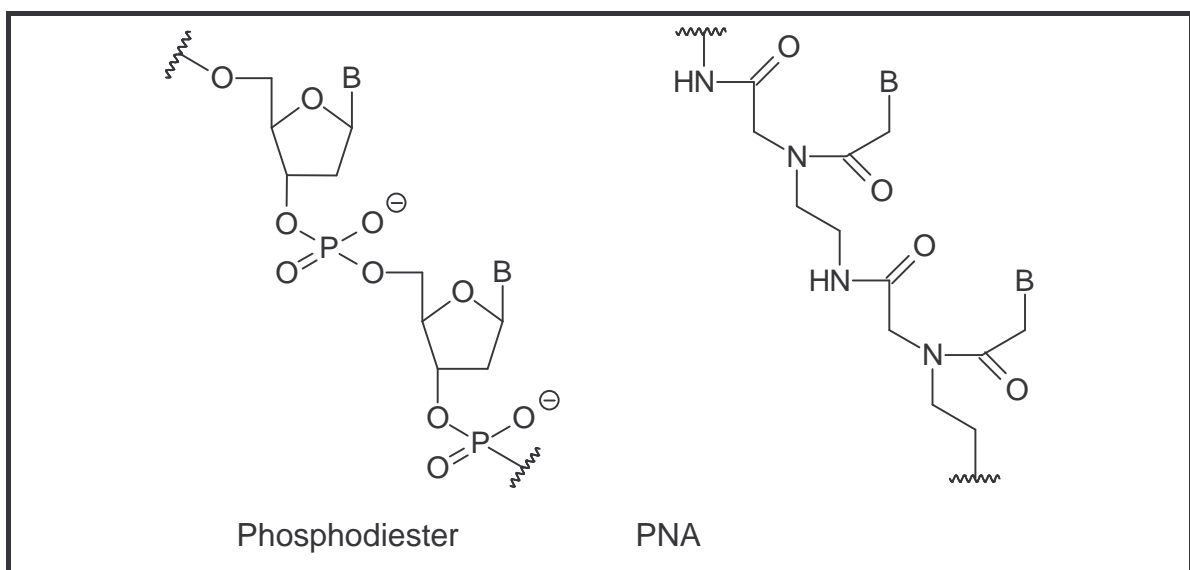


Abb. 2.7: Vergleich zwischen Phosphodiester- und Peptidnukleinsäurerückgrat

PNAs neigen zur Selbstaggregation. Mit komplementärer PNA bilden sie extrem stabile Duplices. Die Schmelzpunkte für PNA/DNA-Duplices liegen über denen von PNA/RNA-Duplices, aber immer noch deutlich über dem des unmodifizierten DNA/DNA-Duplex. Die hohen Schmelzpunkte lassen sich nicht allein durch die fehlende Abstoßung des ungeladenen Peptidrückgrats erklären. Vielmehr scheinen entropische Faktoren eine Rolle zu spielen, wie eine Studie zur Duplexbildung in Abhängigkeit der Ionenstärke ergab (Tomac, 1996). Im Gegensatz zu DNA/DNA-Duplices sinkt der Schmelzpunkt in PNA/DNA-Hybriden mit steigender Salzkonzentration, was mit einer Abnahme der Verdrängung von Gegenionen des DNA-Strangs erklärt werden kann.

Von Nachteil ist die schlechte Internalisierung in Zellen und die fehlende Aktivierung der RNase H durch PNAs. Durch die Verwendung von PNA/DNA-Chimären können diese Schwächen jedoch reduziert werden. Chimäre PNA/DNA-Moleküle könnten damit

als Antisense- oder Antigenwirkstoffe therapeutisch genutzt und aufgrund ihrer Hybridisierungseigenschaften als nützliche Werkzeuge in der Biotechnologie eingesetzt werden (De Mesmaeker, 1995; Hunziker, 1995; Corey, 1997; Uhlmann, 1998b).

2.2.4 Zucker-Modifikationen

Im Unterschied zu RNA-Bausteinen fehlt den DNA-Bausteinen an der 2'-Position des Ribosezuckers die Hydroxylgruppe. Als Konsequenz dieses strukturellen Unterschieds findet man für die Ribosezucker der RNA-Moleküle die C3'-*endo*-Konformation, die die Ausbildung einer Helix der A-Typs zur Folge hat. Bei DNA-Molekülen hingegen dominiert die C2'-*endo*-Konformation, die zur Ausbildung der B-DNA führt. RNA/RNA-Duplices sind gewöhnlich viel stabiler als DNA/DNA-Duplices oder DNA/RNA-Hybride der gleichen Sequenz (Hunziker, 1995). Durch geeignete Modifikation der 2'-Position in DNA-Antisense Oligonukleotiden sollte es gelingen, die Zuckerkonformation nach 3'-*endo* zu verschieben und damit eine A-Form Geometrie zu schaffen, die eine höhere Bindungsaffinität zu den RNA-Targets impliziert. In der Tat ist es mit elektronegativen Substituenten in der 2'-Position gelungen, das konformationelle Gleichgewicht der Zuckereinheit dahingehend zu beeinflussen (Freier, 1997).

Der größte Einfluß auf den Schmelzpunkt konnte für die Hybridisierung von 2'-Fluoronukleosiden mit komplementärer RNA gemessen werden. Die einfachste Derivatisierung von RNA-Bausteinen erfolgt durch Ersatz des Protons der 2'-Hydroxylgruppe durch eine Methylgruppe. Diese auch natürlich vorkommenden 2'-*O*-Methylribonukleoside führten zu einer deutlichen Verbesserung der Bindungsaffinität zu RNA-Targets. Darüber hinaus wurden zahlreiche 2'-*O*-Modifikationen synthetisiert, die deutlich geräumigere Substituenten trugen. Diese erwiesen sich zwar zumeist als nukleasestabiler als 2'-*O*-Methylribonukleoside. Es konnte jedoch eine klare Korrelation zwischen der Substituentengröße und der damit abnehmenden Duplexstabilität gefunden werden (Lesnik, 1993).

Der Effekt auf die Nukleasestabilität von homogenen 2'-Fluoro- und 2'-*O*-Methylderivaten ist vergleichsweise niedrig und für Antisense-Applikationen nur bedingt ausreichend (De Mesmaeker, 1995). Außerdem können sie nicht die RNase H aktivieren. Ihre Eigenschaft, Duplices zu stabilisieren, macht sie jedoch attraktiv. Ein verbessertes Design von Antisense Oligonukleotiden kombiniert deshalb die positiven Eigenschaften verschiedener Modifikationen. Derartige chimäre Nukleinsäuren werden auch Antisense Oligonuk-

leotide der zweiten Generation genannt, während All-Phosphorothioate der ersten Generation angehören. Phosphorothioate besitzen mit ihrer Nukleasestabilität und durch ihre Aktivierung der RNase H Eigenschaften, die den 2'-modifizierten Oligonukleotiden fehlen und umgekehrt. Die Konstruktion eines therapeutischen Antisense Oligonukleotids mit 2'-*O*-Methyl-modifizierten Segmenten am 3'- und am 5'-Ende eines Phosphorothioatanteils führt zu einem Wirkstoff, dessen Hybridisierungseigenschaften verbessert sind und der ein Substrat der RNase H ist (Agrawal, 1997; Crooke, 1997). So führt beispielsweise die Inkorporation von jeweils sechs 2'-Fluororibonukleotiden an den Enden eines 20mer Phosphorothioats zu einer Erhöhung des T_m -Wertes von 52 °C auf 65 °C bei gleichzeitiger Aktivierung der RNase H (Dean, 1997). Modifiziert man die Enden eines Oligonukleotids mit nukleasestabilen Methyl- oder Benzylphosphonaten lassen sich auch natürliche Phosphodiester in ein Antisense Oligonukleotid einbauen, wie noch gezeigt werden wird. Abschließend sei noch auf die Derivatisierung von Ribozymen mit 2'-Modifikationen zur Erhöhung ihrer Nukleasestabilität als wichtige Anwendung dieser Verbindungsklasse hingewiesen (Kap. 2.1.2).

2.2.5 Oligonukleotid-Konjugate

Oligonukleotide können mit einer Vielzahl von funktionellen Molekülen an ihrem 3'- oder 5'-Ende oder auch an anderen Stellen des Nukleinsäurestrangs kovalent verknüpft werden. Die Verknüpfung dient dabei unterschiedlichen Zielen. Zumeist sollen dadurch bestimmte Eigenschaften des Oligonukleotids optimiert werden. Generell läßt sich durch 3'- oder 5'-Oligonukleotid-Konjugate die Exonukleasestabilität erhöhen. Dies ist aber zumeist nur ein attraktiver Nebeneffekt, da die Konjugate andere Eigenschaften vermitteln sollen. Durch die kovalente Anknüpfung von Interkalatoren kann die Stabilität von Oligonukleotid-Duplices erhöht werden. Eine Stabilisierung von 5 bis 10 °C je Interkalatormolekül ist das Ergebnis von π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Interkalator und den Nukleobasen (De Mesmaeker, 1995). Häufig verwendete Interkalatormoleküle sind Acridine, Anthrachinone oder Pyrene. Einen Schritt weiter führt die kovalente Anknüpfung von photoreaktiven Crosslinkern wie Psoralenderivaten, die nach erfolgter Hybridisierung eine kovalente Bindung zur Target-RNA ausbilden können (Uhlmann, 1986; Uhlmann, 1990; Miller, 1996).

Die unzureichende Aktivierung der RNase H durch die meisten Oligonukleotid Modifikationen kann durch die Konjugation mit artifiziellen Endonukleasen, die den RNA-Gegenstrang chemisch spalten, ausgeglichen werden. Durch Derivatisierung mit Eisen-(II)-

EDTA-Komplexen kann durch die lokale Bildung von Hydroxylradikalen der Gegenstrang gespalten werden (Uhlmann, 1990).

Wieder andere Konjugate sollen die Penetration durch die Lipiddoppelschicht der Zellen verbessern. Zur Erhöhung der Lipophilie von Oligonukleotiden wurden therapeutische Oligonukleotide mit Cholesterol (Letsinger, 1989), Cholsäure, Phospholipiden oder einfachen Alkylketten versehen. Die Verknüpfung mit polykationischen Gruppen führt beispielsweise zu Oligonukleotid-Polylysin Konjugaten, die eine erhöhte Affinität zu Zelloberflächenrezeptoren besitzen und deshalb die Zellaufnahme verbessern (Uhlmann, 1990; Milligan, 1993; Crooke, 1997).

Zu bioanalytischen Zwecken müssen Oligonukleotide außerdem häufig mit Farbstoffen oder Radiolabeln konjugiert werden. Eine Derivatisierung am 3'-Ende eines Oligonukleotids erfordert zumeist einen größeren Synthesaufwand, denn über dieses Ende sind die Oligonukleotide bei der automatisierten Festphasenmethode normalerweise mit dem CPG-Trägermaterial verbunden. 5'-Modifizierende Reagentien können dahingegen nach der Kopplung des letzten Nukleotids mit der entschützten 5'-Hydroxylgruppe des noch an der festen Phase gebundenen Oligonukleotids zur Reaktion gebracht werden.

2.2.6 Minimal modifizierte Oligonukleotide

Wie in den letzten Kapiteln gezeigt werden konnte, wurden die All-Phosphorothioate als Oligonukleotide der ersten Generation durch chimäre Phosphorothioate oder Oligonukleotid Konjugate abgelöst. Die Oligonukleotide der zweiten Generation vereinen dabei die Vorteile unterschiedlicher Modifikationen. Möglicherweise lassen sich unerwünschte Eigenschaften oder Nebenwirkungen auch unterdrücken, wenn in ein natürliches Oligonukleotid lediglich ein absolut notwendiges Minimum an Modifikationen eingeführt wird.

Zum Schutz vor 3'- und 5'-Exonukleasen müssen die Strangenden weiterhin chemisch modifiziert werden, wobei die Art der Modifikation prinzipiell freigestellt ist. Im Mittelteil verbleiben jedoch Phosphodiesterseinheiten. Diese auch als Fenster- oder Lücken-Technik (engl.: window-strategy, gap-technique) bezeichnete Methode ermöglicht eine drastische Verringerung der Anzahl modifizierter Nukleotide in einem Antisense Oligonukleotid. Bereits zwei oder drei Phosphorothioateinheiten an jedem Strangende eines 20mer Oligonukleotids erhöhen dessen enzymatische Stabilität beträchtlich. Derartige terminal modifizierte Oligonukleotide konnten erfolgreich als spezifische Inhibitoren der Genexpression eingesetzt werden. Ihr Einsatz *in vivo* ist jedoch durch die Endonukleaseaktivität begrenzt

(Hoke, 1991). All-Phosphorothioate sind zwar stabil gegenüber Endonukleasen, zeigen aber unspezifische Nebenwirkungen (Stein, 1993; Milligan, 1993). Der Kompromiß zur Minimierung zweier unerwünschter Effekte ist eine terminal modifizierte Nukleinsäure, die an Positionen starker Endonukleaseaktivität zusätzlich partiell modifiziert ist. Positionen starker Endonukleaseaktivität treten vor allem bei direkter Abfolge mehrerer Pyrimidinbasen auf. Die Stabilität eines Oligonukleotids im Serum und Cytoplasma hängt maßgeblich von dessen Länge und Sequenz ab. Eine Untersuchung unmodifizierter, homopolymerer 20mere ergab folgende Reihenfolge enzymatischer Stabilität: $(T)_{20} < (dC)_{20} < (dA)_{20} \ll (dG)_{20}$. Während G-reiche Sequenzen generell besser vor enzymatischer Degradierung geschützt sind, ist es bei Pyrimidin-reichen Sequenzen gerade umgekehrt. Dieser Befund wird auch dadurch gestützt, daß die Stabilität stark von der Stelle der internen Modifikation abhängig ist. Phosphorothioat-Internukleotidbindungen an Purin-Positionen führen lediglich zu einer moderaten Steigerung der Stabilität, während beschwefelte Pyrimidin-Positionen eine deutliche Stabilisierung zur Folge haben. Für viele Fälle konnte gezeigt werden, daß ein Thioatanteil von 40 % bis 60 % ausreichende nukleolytische Stabilität garantiert (Peyman, 1996; Peyman, 1997; Uhlmann, 1997; Uhlmann, 1999).

Für ein rationelles Design von therapeutischen Antisense Oligonukleotiden ist die Antwort auf die Frage wichtig, wo welche Modifikationen in einer gegebenen Sequenz zu plazieren sind. Eine klare Antwort auf diese Fragestellung wäre wünschenswert - ist allerdings sehr schwer zu erhalten. Zu viele Parameter spielen bei einem Antisense Experiment eine tragende Rolle: Die Zielsequenz ist abhängig von deren Funktionalität und Sekundärstruktur, die Zellaufnahme vom Zelltyp und der Sequenz und, wie wir gerade gesehen haben, die Nukleasestabilität von Position und Art der Modifikation. Diese Reihe von gegenseitigen Abhängigkeiten ließe sich sicher noch erweitern, so daß letztlich nur das Experiment Aufschluß über die Wirksamkeit eines Antisense Oligonukleotids liefern kann (Branch, 1998; Stein, 1998).

2.3 Wirkmechanismen von Antisense Oligonukleotiden

Ein wichtiger Wirkmechanismus von Antisense Oligonukleotiden ist die Inhibition der Translation von mRNA oder viraler RNA durch physische Blockade des Translationsstarts oder der Bewegung eines Ribosoms entlang einer RNA. Die sterische Blockade eines Startcodons verhindert die Bindung von Transkriptionsfaktoren sowie des Ribosoms. Im zweiten Fall erfolgt zwar der Translationsstart, die notwendige Translokation des Ribo-

soms entlang der RNA wird aber durch das hybridisierte Antisense Oligonukleotid gestoppt. Schließlich dissoziiert das Ribosom von der RNA ab und ein nicht fertig translatiertes Peptid wird freigesetzt. Im Zellkern kann durch sterische Blockade das Spleißen von mRNA-Vorläufern, die Polyadenylierung oder der Transport der mRNA in das Cytoplasma verhindert werden. Die Vermehrung des HIV konnte durch Oligonukleotide, die eine Spleißstelle der viralen Vorläufer-mRNA blockierten, inhibiert werden (Goodchild, 1988). Zumeist sind therapeutische Antisense Oligonukleotide aber gegen Zielsequenzen im Cytoplasma gerichtet.

Schon bald erkannte man, daß die Antisense-Aktivität nicht immer mit einer hohen Bindungsaffinität zum Target-Strang einherging. α -Anomere oder Antisense RNA bilden zwar sehr stabile Duplices mit komplementären RNA-Gegensträngen. Sie können die Translation aber zum Teil weniger effektiv inhibieren als β -DNA-Oligonukleotide mit deutlich niedrigerer Bindungsaffinität. Für dieses Phänomen ist die Ribonuklease H verantwortlich, die in DNA-RNA Heteroduplices in Gegenwart divalenter Kationen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} selektiv den RNA-Strang hydrolysiert. Wie bereits erwähnt, sind Duplices aus modifizierten Antisense Oligonukleotiden sowie Antisense RNA mit einem komplementären RNA-Gegenstrang oft keine Substrate der RNase H. Ihnen fehlt somit ein wesentlicher Bestandteil des Wirkmechanismus von Antisense Oligonukleotiden (Uhlmann, 1990; Crooke, 1998b).

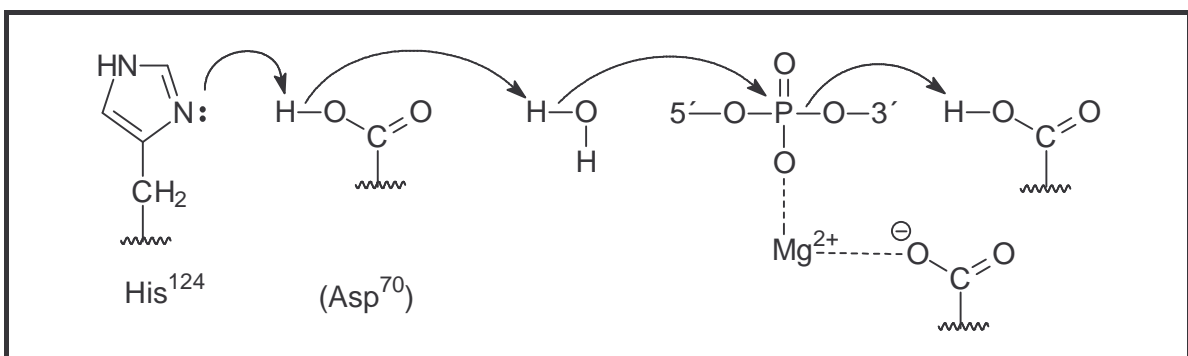


Abb. 2.8: Möglicher Mechanismus der Hydrolyse eines RNA-Stranges in einem DNA-RNA Heteroduplex durch die *E. coli* RNase H1. Der nukleophile Angriff am Phosphodiester erfolgt durch ein Hydroxylion unter Hydrolyse der P-O-3' Bindung (Kanaya, 1993).

Die Ribonuklease H ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym in Bakterien-, Pflanzen- und tierischen Zellen. Seine natürliche Funktion beruht auf dem Abbau von RNA-Primern bei der DNA-Replikation oder dem Herausschneiden von in DNA fehleingebauten RNA-Nukleotiden. Die degradierte RNA wird danach rasch von Exonukleasen abgebaut, wäh-

rend die vormals intakte RNA mit einem 5'-Cap und einem 3'-Polyadenylatschwanz vor enzymatischem Abbau geschützt ist. Die Ribonuklease H setzt sich aus einer einzigen Polypeptidkette mit 155 Aminosäuren zusammen. Die dreidimensionale Kristallstruktur der Ribonuklease H1 von *E. coli* sowie ein Modell für den Enzym-Substrat-Komplex und ein möglicher Mechanismus für die katalytische Reaktion wurden beschrieben (Kanaya, 1993). Neben der Ribonuklease H1 wurde 1990 die Ribonuklease H2 isoliert (Itaya, 1990).

Die Aktivität der RNase H kann in verschiedenen Geweben stark schwanken. Hochproliferative Gewebe wie Embryonalzellen oder Oocyten weisen oft eine hohe RNase H Aktivität auf. In Zellextrakten hochproliferativer Zellen findet man ebenfalls häufig hohe RNase H Aktivitäten, während diese beispielsweise in Retikulocytenlysaten sehr niedrig sind oder gänzlich fehlen. Oft findet man auch in Abhängigkeit von der jeweiligen Charge eines kommerziell erhältlichen Zellysats unterschiedliche RNase H Aktivitäten. Auf das Ergebnis eines *in vitro* oder *in vivo* Antisense Experiments hat die RNase H Aktivität des verwendeten Testsystems einen entscheidenden Einfluß. Nur selten ist der RNase H Level des Testsystems in einer Antisense Studie bekannt (Uhlmann, 1990; Crooke, 1997). In frisch hergestellten Retikulocytenlysaten reichen 1 % bis 2 % der RNase H Aktivität der lebenden Zellen, um eine optimale Spaltung der Target RNA zu gewährleisten (Walder, 1988). Generell ist aber die Frage von Interesse, ob ein beobachteter Antisense Effekt durch einen RNase H abhängigen Mechanismus erfolgt oder nicht. Hierzu muß das Antisense Experiment nach Inhibierung der RNase H durchgeführt werden. Dies ist Walder und Walder durch die kompetitive Hemmung der RNase H mit (poly(rA)-poly(T)) gelungen. Auf den Antisense Effekt eines gegen das 5'-Ende eines RNA Targets gerichteten Antisense Oligonukleotids hatte diese Maßnahme keinen Einfluß, was auf einen RNase H unabhängigen Mechanismus hindeutet (Walder, 1988).

Die Induktion der RNase H ist mit dem Risiko unspezifischer Spaltung verbunden. Bereits kurze Wechselwirkungen eines Antisense Oligonukleotids mit nur fünf bis sechs Basenpaaren eines RNA-Strangs können zur Aktivierung der RNase H führen. Eine Sequenz aus 16 Nukleotiden, die statistisch gesehen nur einmal im menschlichen Genom vorkommt, enthält bereits 11 verschiedene Hexamere. Im ungünstigsten Fall kommt es zu unerwünschter Hybridisierung einer Hexamereinheit mit einem RNA Molekül und dessen Spaltung durch die RNase H. Diese unspezifische Wirkung von Phosphodiestern und Phosphorothioaten wird vor allem bei der Gabe hoher Wirkstoffdosen beobachtet (Uhlmann, 1990). Mit Hilfe chimärer Oligonukleotide läßt sich die Spezifität jedoch deutlich erhöhen. Mit einem Methylphosphonat-Phosphodiester Oligonukleotid konnte eine Selektion

tivitätssteigerung der Ribonuklease H Aktivität bis hin zur Erkennung von Punktmutationen erreicht werden (Giles, 1995). Je länger ein Antisense Oligonukleotid ist, desto größer ist die Gefahr unspezifischer Hybridisierung. Eine Mindestlänge ist aufgrund einer ausreichenden Affinität zum Gegenstrang und bestmöglicher Spezifität aber ebenfalls erforderlich. Der Wirkmechanismus der RNase H muß somit beim Design von Antisense Oligonukleotiden berücksichtigt werden.

2.4 Antisense Oligonukleotide müssen an die Target-RNA binden

Um die im vorherigen Abschnitt besprochenen Wirkmechanismen in Gang setzen zu können, muß ein Antisense Oligonukleotid an seine komplementäre Zielsequenz auf dem RNA-Target effektiv hybridisieren. Ein mRNA Molekül, das beispielsweise aus 400 Nucleotiden aufgebaut ist, kann mit 381 unterschiedlichen, komplementären 20meren hybridisiert werden. Die wesentlichen Faktoren für die Auswahl einer geeigneten Zielsequenz sind die Sekundär- und Tertiärstrukturelemente der Ziel RNA sowie die Häufigkeit einer Sequenz im Genom des Zielorganismus oder auch die Konservierung der Sequenz bei Mutanten. Da die Translation einer mRNA immer in 5'→3'-Richtung erfolgt, befinden sich Zielsequenzen zur Inhibierung der Translation jedoch häufig im 5'-Bereich. Erfolgt eine Aktivierung der RNase H, richtet sich die Auswahl einer Target Sequenz weniger nach deren Funktionalität.

In funktionellen Bereichen von mRNA oder viraler RNA wie etwa ribosomalen Bindungsstellen treten häufig Sequenzhomologien mit anderen Genen auf. Dadurch geht die Spezifität des Antisense Oligonukleotids verloren. Ist die genomische Basensequenz einer Spezies vollständig aufgeklärt, lassen sich solche Effekte durch Sequenzvergleiche berücksichtigen. Viele Viren besitzen eine außerordentlich hohe Mutationsrate, um einer spezifischen Antwort des Immunsystems auszuweichen. Wiederum durch Sequenzvergleiche lassen sich unter verschiedenen Genotypen eines Virus hochkonservierte Bereiche auffindig machen. Schnell mutierende Bereiche eines Genotyps können durch Abgleich der Genome von Viren nachfolgender Generationen ermittelt werden. Interessanterweise findet man hochkonservierte Regionen häufig an funktionellen Stellen eines Virengenoms. Diese Tatsache kommt der Entwicklung spezifisch bindender Antisense Oligonukleotide zur Inhibierung des viralen Translationsapparats sehr entgegen.

Verschiedene Sequenzmotive von Oligonukleotiden haben eine spezifische Wirkung, die durch eine hohe Affinität zu Proteinen hervorgerufen wird. GT reiche Oligonukleotide beispielsweise inhibieren Interferon Gamma. Umgekehrt wirkt die palindromische Sequenz AACGTT induzierend auf die Produktion von Interferon (Schlingensiepen, 1997). CG Motive stimulieren das Immunsystem durch Steigerung der Proliferation und Differentiation von B-Zellen (Krieg, 1996; Stein, 1998). Oligonukleotide mit vier aufeinanderfolgenden Guanosin Bausteinen sollten vermieden werden, besonders wenn diese Tetramereinheit nahe am 3'- oder 5'-Terminus gelegen ist. Häufig bilden solche Oligonukleotide Dimere, Tetramere oder andere übergeordnete Strukturen (Benimetskaya, 1997).

Zu den wichtigsten Parametern bei der Auswahl einer Zielsequenz gehört die räumliche Struktur der RNA. Das Zielmolekül liegt nämlich nicht als lineares, fadenförmiges Molekül vor, sondern ist hochstrukturiert. Selbstkomplementäre Bereiche bilden zum Teil ausgedehnte, doppelsträngige Regionen aus. Darüber hinaus entstehen Sekundärstrukturelemente wie Haarnadelschleifen (engl.: hairpin loops), Ausbuchtungen oder Wülste (engl.: bulge) und interne Schleifen (engl.: internal loops). Oft findet man auch Tertiärstrukturelemente wie „pseudoknots“. Dabei handelt es sich um durch den Raum vermittelte Wechselwirkungen einer Schleifenregion mit einem komplementären, einzelsträngigen Bereich. Zum besseren Verständnis der eingeführten Begriffe siehe Kapitel 4, Abb. 4.3. Häufig findet man stark gefaltete Strukturen in funktionellen Bereichen wie in der Umgebung des Translationsstarts. Die Faltung dient beispielsweise der ribosomalen Erkennung durch Ausbildung einer ribosomalen Angriffsstelle. Der Vorteil der zuvor erwähnten hohen Konservierung von funktionellen Bereichen wird also durch die starke Sekundärstrukturneigung zum Teil wieder zunichte gemacht. Darüber hinaus ist eukaryotische RNA oft auch mit Proteinen assoziiert, die strukturgebende Eigenschaften besitzen und damit ebenfalls die Anlagerung eines Antisense Oligonukleotids erschweren. Die natürliche Struktur der RNA limitiert die zugänglichen Stellen dieser Zielmoleküle für Antisense Oligonukleotide erheblich (Branch, 1998).

Welche Möglichkeiten gibt es, Strukturvorhersagen für ein interessantes RNA-Molekül zu treffen? Aufgrund ihrer Größe entzieht sich die RNA-Struktur den direkten Untersuchungsmethoden wie Röntgenbeugung oder NMR-Spektroskopie weitgehend. Deshalb wurde versucht, mit indirekten Methoden einzel- und doppelsträngige Regionen aufzuspüren.

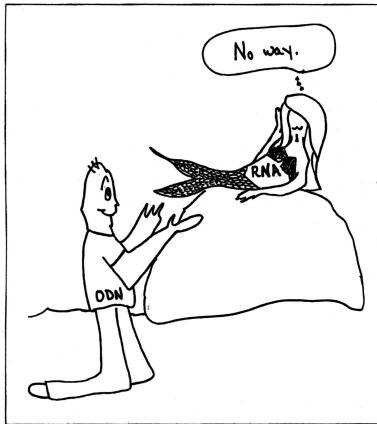


Abb. 2.9: Die Struktur vieler potentieller Bindungsstellen der Ziel RNA macht sie unzugänglich für Antisense Oligonukleotide und Ribozyme

Bei einer Methode zur Kartierung der Struktur wird die gefaltete RNA mit spezifisch schneidenden Ribonukleasen behandelt. Da es Ribonukleasen gibt, die entweder einzel- oder doppelsträngige Regionen hydrolysieren, kann man nach Analyse der entstandenen Fragmente je nach verwendetem Enzym auf einzel- oder doppelsträngige Bereiche schließen. Dies ist ein Beispiel für das enorme Potential substratspezifischer Ribonukleasen als Werkzeuge zur Aufklärung von RNA Strukturen (Uhlmann, 1990; Brown, 1992; Honda, 1996).

Eine weitere indirekte Methode ist die Behandlung der RNA mit chemisch modifizierenden Agenzien. Die Inkubation einer gefalteten RNA mit Methylierungsmitteln führt bevorzugt an den Nucleobasen der ungepaarten Bereiche zur Methylierung. So lassen sich beispielsweise Schleifenregionen von Haarnadelschleifen ausfindig machen. Diese Technik wird auch als Footprinting bezeichnet, da doppelsträngige Bereiche sozusagen einen Fußabdruck zwischen den ansonsten methylierten Basen hinterlassen.

Eine Mutation in einem doppelsträngigen Bereich führt zwangsläufig zu einer Basenfehlpaarung und damit zu einer Destabilisierung der Struktur. Um diesen Effekt aufzufangen, müßte im Gegenstrang an gleicher Stelle eine Mutation erfolgen, die wieder die Ausbildung eines regulären Watson-Crick Basenpaars ermöglicht. Werden in einem vermuteten doppelsträngigen Bereich mehrere solcher Covariationen gefunden, so ist dies ein Hinweis, daß dort in der Tat eine intramolekulare Hybridisierung vorliegt (Brown, 1992).

Die zunehmende Leistungsfähigkeit von Computern ermöglicht die theoretische Vorhersage von Sekundär- und Tertiärstrukturelementen eines RNA-Moleküls (Jäger, 1989; Patzel, 1999). Dabei wird eine vorgegebene Sequenz über einen Algorithmus auf selbstkomplementäre Abschnitte analysiert. Anschließend erfolgt eine Energieminimierung, die auf experimentell gefundenen oder berechneten Stabilitätskriterien der jeweiligen Strukturelemente beruht. Für relativ kleine RNA-Moleküle mit bis zu 30 Nucleinsäuren läßt sich mit dieser Methode ein recht gutes Bild der Struktur modellieren. Da aber die Ursachen zur Ausbildung von gefalteten Strukturen und die Wechselwirkungen der RNA mit Proteinen zum Teil unbekannt sind und somit nur unzureichend theoretisch erfaßt wer-

den können, erhält man mit zunehmender Länge eines RNA-Strangs einen ganzen Satz alternativer Faltungsmöglichkeiten.

Eine weitere Möglichkeit der Strukturvorhersage ist der phylogenetische Abgleich funktionell analoger RNA. Die strukturelle Ähnlichkeit der internen ribosomalen Angriffsstelle zwischen dem GB Virus B und dem Hepatitis C Virus ist verblüffend (Honda, 1996).

Zusammengenommen läßt sich mit diesen Methoden ein grobes Abbild der räumlichen Struktur eines RNA-Moleküls finden. Die große Zahl an Publikationen mit Verbesserungsvorschlägen oder weniger gravierenden Verfeinerungen der Struktur eines einzigen RNA-Moleküls zeigt, wie groß der Aufwand für eine Strukturvorhersage ist. Die Faltung eines RNA-Moleküls hat einen maßgeblichen Einfluß auf die Wirkung therapeutischer Nukleinsäuren. Die Kenntnis der Struktur (siehe Abb. 4.3) liefert jedoch nicht automatisch potentielle Angriffsstellen für derartige Wirkstoffe.

Thermodynamisch betrachtet scheint die Hybridisierung einer Nukleinsäure mit einer einzelsträngigen Region auf dem RNA-Zielmolekül am günstigsten. Dem enthalpischen Gewinn durch die Ausbildung der Wasserstoffbrücken mit dem Gegenstrang steht allerdings ein entropischer Verlust durch die bei der Duplexbildung verlorengegangenen Freiheitsgrade gegenüber. Enthalpisch ungünstiger erscheint die Möglichkeit, ein Antisense Oligonukleotid gegen eine doppelsträngige Zielregion zu richten. Zunächst muß der bereits bestehende Duplex geöffnet werden, bevor eine Hybridisierung des Wirkstoffs erfolgen kann. Dieser Prozeß ist dafür entropisch günstiger, da das freie Oligonukleotid zwar an die Zielsequenz hybridisiert, durch das Auflösen des vorherigen Duplex sich insgesamt die Freiheitsgrade aber nicht so stark ändern. Ist ein Antisense Oligonukleotid gegen eine Haarnadelschleife gerichtet, so ist der Wirkstoff sogar selbst gefaltet. Entropisch gesehen ist dies sicher der günstigste Fall. Wie in diesem Fall eine Duplexbildung erfolgen kann, ist in Abb. 2.10 gezeigt. Der erste Kontakt zwischen Antisense Oligonukleotid und Ziel-RNA wird über die einzelsträngigen Schleifenregionen vermittelt (kissing complex). Danach setzt sich die Bildung des vollständigen Heteroduplex unter Öffnung der Stammregionen der Haarnadelschleife sukzessive fort (Hjalt, 1992). Befindet sich dieses Strukturelement in einem funktionellen Bereich der Ziel-RNA, so führt der Verlust der Struktur häufig zu einer Störung der ehemaligen Funktion. In dieser Arbeit wurde am Beispiel des Hepatitis C Virus eine Haarnadelschleife im Bereich der internen ribosomalen Angriffsstelle mit Antisense Oligonukleotiden hybridisiert (vgl. Kap. 9.2.3).

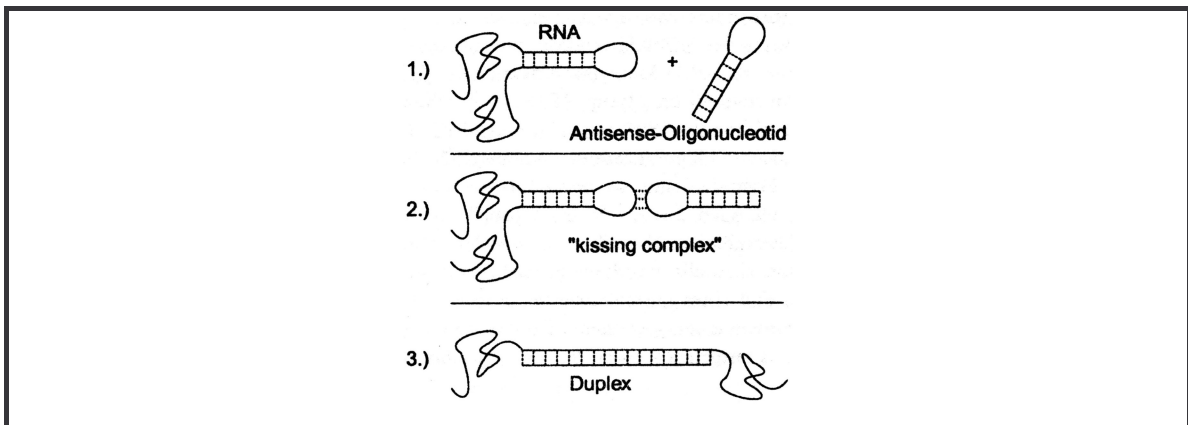


Abb. 2.10: Schematische Darstellung der Hybridisierung zweier Haarnadelschleifen

Mit welchen Methoden gelingt es, die Sekundärstruktur eines stark gefalteten RNA Moleküls aufzulösen? Eine Möglichkeit bieten Oligonukleotide, die sehr stark an ihren Gegenstrang binden. Hierzu zählen vor allem die bereits erwähnten 2'-O-Methylmodifikationen oder Peptidnukleinsäuren. Der Enthalpiegewinn bei der Bildung des Heteroduplex ist deutlich größer als der Enthalpieverlust durch das Auflösen der Sekundärstruktur. Durch den Einbau der modifizierten Basen 2-Aminoadenin (A') und 2-Thiothymine (T') generiert man nicht nur eine hohe Affinität zur Target RNA. Das Basenpaar A'-T' bildet sehr schwache Basenpaare aus, so daß zusätzlich die Eigenassoziation des Antisense Oligonucleotids erheblich reduziert wird. Auf diesem Wege sollte ein stabiler Heteroduplex trotz der Kosten für das Auflösen der RNA Eigenstruktur gebildet werden (Toulmé, 1996).

Wie bereits erwähnt, erscheint es wenig rationell, durch das Testen großer Mengen synthetisierter Antisense Oligonucleotide geeignete Zielsequenzen ausfindig zu machen. Durch die definierte Synthese großer Oligonucleotid-Bibliotheken auf einem Mikrochip als fester Phase läßt sich dieses Problem elegant lösen (Southern, 1994). Jede Sequenz, die auf eine bestimmte Stelle des Chips aufsynthetisiert wurde, ist bekannt. Durch Zugabe einer gefalteten, markierten RNA kann dann leicht ein stark hybridisierendes Oligonucleotid ermittelt werden. In einer Arbeit von Edwin Southern *et al.* wurden beispielsweise 1938 verschiedene 17mere auf eine Glasplatte synthetisiert. Diese Sequenzen sind komplementär zur Sequenz der β -Globin RNA eines Kaninchens. Zugabe der gefalteten β -Globin RNA zeigte die unterschiedliche Bindungsaffinität der einzelnen Sequenzen auf und führte zu einer überraschend geringen Zahl gut hybridisierender Oligonucleotide auf dem Mikrochip (Milner, 1997). Obwohl Oligonucleotide in Lösung andere Hybridisierungseigenschaften als solche auf der festen Phase aufweisen können, ist damit ein Weg für das experimentelle Screening nach potenten Antisense Oligonucleotiden gefunden worden.

Auch mit Hilfe von Computern kann man heute nach geeigneten Stellen für einen Angriff von Antisense Oligonukleotiden suchen (Patzel, 1999). Dabei muß zunächst eine energie-minimierte Struktur des RNA Moleküls berechnet werden. Unter der Annahme, daß die 3'- bzw. 5'-Enden der Wirkstoffe nicht gegen intramolekular gefaltete Regionen gerichtet werden sollen - eine Notwendigkeit für eine effiziente Hybridisierung - lassen sich zumindest Bereiche für einen Antisense Ansatz definieren. Die computergestützte Analyse einer Sekundärstruktur kann das Experiment noch nicht vollständig ersetzen. Das Screening kompletter RNA-Moleküle machen sie jedoch überflüssig.

Letztendlich bleibt die Auswahl der optimalen Zielsequenz eine komplexe Fragestellung. Bereits die Verschiebung der Zielsequenz um nur zwei Nukleotide oder die Verkürzung eines 20mers auf ein 18mer kann erhebliche Einbußen der Aktivität mit sich bringen (Hanecak, 1996; Szoka, 1997). Dieses Ergebnis zeigt eindrucksvoll, wie leicht die optimale Zielsequenz verfehlt werden kann.

2.5 Therapeutischer Einsatz von Antisense Oligonukleotiden

1998 wurde mit der Zulassung von Formiviren[®] das erste Präparat auf Basis der Antisense Technologie zugelassen. Das 21mer All-Phosphorothioat hemmt die Vermehrung des humanen Cytomegalievirus (CMV), das bei vielen AIDS Patienten eine opportunistische Infektion des Auges verursacht und häufig zur Erblindung führt. Formiviren[®] ist selbst bei solchen Patienten wirksam, die bereits eine Resistenz gegen niedermolekulare Antiviralika entwickelt haben. Wie Tab. 2.2 zu entnehmen ist, handelt es sich bei vielen in klinischer Prüfung befindlicher Antisense Oligonukleotide um All-Phosphorothioate. Ein Beispiel für eine chimäre Nukleinsäure ist GEM-92, ein HIV wirksames Antisense Oligonukleotid. Es besteht aus 2'-O-Methyl-RNA und Phosphorothioateinheiten. Zu Beginn dieses Jahres wurde ein Antisense Oligonukleotid gegen das Hepatitis C Virus in die klinische Phase I gebracht. Gegen dieses Virus kann man sich bislang weder immunisieren lassen noch steht eine erfolgsversprechende Therapie zur Verfügung. Die Inhibierung der viralen RNA des Hepatitis C Virus mit spezifischen Antisense Oligonukleotiden ist Thema dieser Arbeit.

Mit großer Hoffnung ist die Anwendung von Oligonukleotiden in der Krebstherapie verbunden, da sie aufgrund ihrer hohen Spezifität deutlich weniger Nebenwirkungen als konventionelle Chemotherapeutika verursachen. Außerdem scheinen sich Phosphorothioate in schnell proliferierenden Geweben stark anzureichern. Auf dem Krebsgebiet

gibt es somit die meisten klinischen Studien mit Antisense Oligonukleotiden (Uhlmann, 1998a).

Ziel RNA	Indikation	Status	Oligonukleotid	Länge / Art	Firma
CMV	CMV-Retinitis	1998 zu- gelassen	ISIS 2922 Formivirsen®	21mer [a]	Isis
<i>bcl 2</i>	Lymphome	Phase II	G 3139	18mer [a]	Genta
<i>c-myc</i>	Restenose	Phase II	LR 3280	15mer [a]	Lynx / Schwarz Pharma
ICAM-1	Morbus Crohn / Entzündungen	Phase II	ISIS 2302	20mer [a]	Isis / Boehringer Ingelheim
CMV	CMV-Retinitis	Phase II	GEM.132	20mer [b]	Hybridon
PKC- α	solide Tumoren	Phase II	ISIS 3521 / CGP 64128A	20mer [a]	Isis / Novartis
<i>c-raf-1</i> - Kinase	solide Tumoren	Phase II	ISIS 5123 / CGP69846A	20mer [a]	Isis / Novartis
<i>c-myb</i>	Leukämie	Phase I	LR 3001	24mer [a]	Lynx
HIV	AIDS	Phase I	GEM-92	25mer [b]	Hybridon
Protein- Kinase A	solide Tumoren	Phase I	GEM-231	18mer [b]	Hybridon
Ha- <i>ras</i>	solide Tumoren	Phase I	ISIS 2503	22mer [a]	Isis
HIV	AIDS	Phase I	GPI-2A	20mer [c]	Novopharm Biotech
HCV	Hepatitis C	Phase I	ISIS 14803	20mer [a]	Isis / Elan Corpo- ration

Tab. 2.2: Auswahl von Antisense Oligonukleotiden, die sich in klinischer Erprobung befinden (Nature Biotechnology, 1997; Thomas, 1997; Uhlmann, 1998a). ISIS 14803 ist seit Januar 2000 in Phase I. Erläuterungen: [a] all-Phosphorothioat; [b] chimäres Oligonukleotid; [c] liposomale Formulierung

Die meisten Studien zur Pharmakokinetik und Toxikologie von Antisense Oligonukleotiden wurden an Phosphorothioaten durchgeführt. Nach intravenöser Applikation binden Phosphorothioate rasch, jedoch mit niedriger Affinität, an Serumalbumin und andere

Serumproteine. Dadurch wird deren schnelle Ausscheidung verhindert. Die verabreichten Thioate verteilen sich innerhalb einer Stunde über das gesamte periphere Gewebe. Die stärkste Anreicherung wird in der Leber, der Niere, dem Rückenmark, dem Skelettmuskel und in der Haut gefunden. Aber auch in allen übrigen Geweben mit Ausnahme des Gehirns lassen sich Phosphorothioate nachweisen. Die Ausscheidung des Wirkstoffes erfolgt innerhalb mehrerer Tage über den Urin. 30 % bis 60 % der verabreichten Dosis konnten im Urin nachgewiesen werden. Etwa 30 % des Wirkstoffs waren noch nicht durch Nukleasen degradiert (Agrawal, 1997; Crooke, 1998a; Uhlmann, 1998a).

In toxikologischen Untersuchungen am Menschen wurden nach mehrwöchiger intravenöser Gabe von 2 mg Phosphorothioat je kg Körpergewicht keine signifikanten Nebenwirkungen beobachtet. In Versuchstieren wurde nach Applikation CG-reicher Oligonukleotide die Freisetzung von Zytokinen festgestellt. Bei Affen konnte eine immunmodulierende Wirkung beobachtet werden. Außerdem kann es zu Störungen bei der Blutgerinnung und zu einer blutdrucksenkenden Wirkung kommen. Insgesamt sind die Nebenwirkungen je nach Anwendung oftmals deutlich weniger gravierend als bei bisher eingesetzten niedermolekularen Präparaten. Die Nebenwirkungen können je nach Organismus, Art der Modifikation und der Anwendung sowie in Abhängigkeit der Sequenz unterschiedlich ausfallen (Agrawal, 1997; Akhtar, 1997; Crooke, 1998a; Uhlmann, 1998a).

In den vergangenen Jahren ist es gelungen, die grundlegenden Schwierigkeiten bei der Entwicklung therapeutischer Antisense Oligonukleotide zu überwinden. Zahlreiche chemische Modifikationen wurden entwickelt, die den potentiellen Wirkstoffen eine ausreichende Stabilität gegenüber Nukleasen verleihen. Die Art der Modifikation hat auf weitere wichtige Parameter der Antisense Technologie einen Einfluß: Ist eine Aktivierung der RNase H möglich? Werden stabile Heteroduplexe mit der komplementären Ziel RNA gebildet? Lassen sich die neuen Verbindungen im technischen Maßstab herstellen? Das komplexe Gebiet, wie Antisense Oligonukleotide die Zellmembran penetrieren, wird im folgenden Kapitel ausführlich behandelt. Nicht zuletzt haben synthetische Oligonukleotide bei der Beantwortung vieler molekularbiologischer Fragestellungen wertvolle Dienste geleistet.

3. Zellaufnahme von Oligonukleotiden

Der therapeutische Nutzen von Nukleinsäuren in Form von Antisense Oligonukleotiden, Ribozymen oder gar kompletten Genen ist heute unumstritten. Eine Behandlung mit diesen polyanionischen Wirkstoffen ist aber oft durch ihre geringe Neigung, die Lipiddoppelschicht von Zellmembranen überwinden zu können, limitiert. Membranen sind hochselektive Permeabilitätsschranken, die spezifische, molekulare Pumpen und Kanäle besitzen und so die Molekül- und Ionenzusammensetzung des intrazellulären Mediums regulieren. Sie bestehen hauptsächlich aus amphiphilen Phospholipiden, die in wässriger Lösung spontan Lipiddoppelschichten ausbilden. Außerdem enthalten Zellmembranen Glykolipide und Cholesterol. Letzteres ist für die Fluidität der auch als „zweidimensionale Flüssigkeit“ bezeichneten Lipiddoppelschicht verantwortlich (Abb. 3.1).

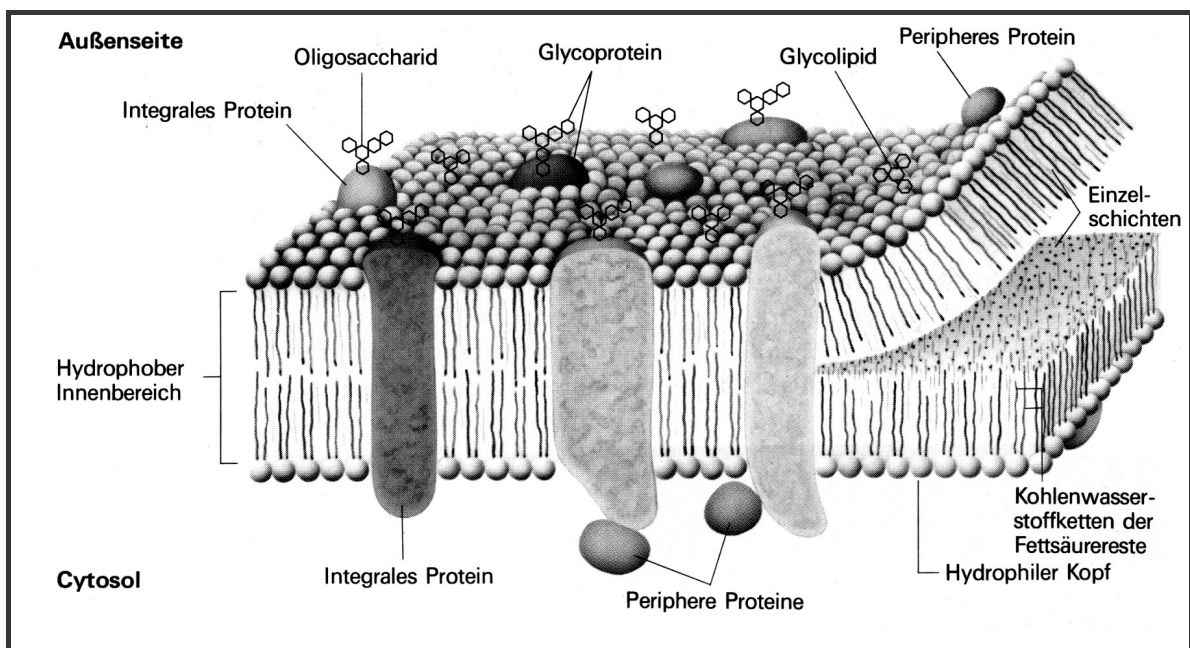


Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer Lipiddoppelmembran (Lodish, 1996)

Zahlreiche Strategien, die Zellaufnahme von Oligonukleotiden zu verbessern, sind in den vergangenen Jahren entwickelt worden. Auf der einen Seite ist die Zellaufnahme in starkem Maße abhängig von Faktoren, auf die man bei einer konkreten Anwendung nur wenig Einfluß hat. Hierzu zählen beispielsweise der Zelltyp und die festgeschriebene Sequenz des Oligonukleotids (Peyman, 1995; Crooke, 1996a). Viele andere Parameter lassen sich jedoch variieren. Durch die Wahl lipophiler Phosphatrückgrat Modifikationen wie Methyl- oder Benzylphosphonate läßt sich der anionische Charakter der Wirkstoffe reduzieren und

seine Lipophilie erhöhen. Eine weitaus stärkere Veränderung seiner lipophilen Eigenschaften erfährt ein Oligonukleotid durch die kovalente Verknüpfung beispielsweise mit Cholesterol. Um einen aktiven Transport zu erhalten, müssen körpereigene Transportmechanismen für den Oligonukleotidtransport nutzbar gemacht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Substanzen kovalent an Oligonukleotide gebunden, für die es in der Zielzelle aktive Transportsysteme gibt. Neben diesen direkten Manipulationen des Wirkstoffs gibt es eine Reihe nichtviraler und viraler Vektoren, die den Transport des Oligonukleotids gewährleisten sollen. Unter den bisher bekannten nichtviralen Vektoren scheinen die kationischen Liposomen für den Transport von therapeutischen Nukleinsäuren besonders vielversprechend (Miller, 1998). Auch Proteine (Wyman, 1997), Dendrimere (DeLong, 1997) oder Nanopartikel (Zobel, 1997) können die Zellaufnahme von Oligonukleotiden stimulieren. Virale Vektoren der Adenoviren oder Retroviren werden schon in erheblichem Umfang für den Gentransport verwendet. Keiner der hier aufgeführten Vektoren für Nukleinsäuren erfüllt die Kriterien eines perfekten Vektors bezüglich Toxizität oder präziser Freisetzung des transportierten Wirkstoffs. Physikalische Methoden wie Mikroinjektion oder Elektroporation sind zwar äußerst effektiv, jedoch für klinische Zwecke nicht anwendbar (Miller, 1998).

3.1 Werden Oligonukleotide in das Cytoplasma transportiert ?

Auch wenn der polyanionische Charakter von Nukleinsäuren einer effektiven Zellaufnahme entgegensteht, so ist die Zellmembran nicht völlig für Substanzen dieser Größe unpassierbar. Unmodifizierte Oligonukleotide werden hauptsächlich durch rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen. Bei diesem Prozeß binden die Oligonukleotide an spezifische Rezeptoren der Plasmamembran und werden durch Einschluß in Vesikel in das Cytoplasma transportiert. In der Plasmamembran verschiedener Zelltypen konnten spezifische, oberflächenbindende Proteine für Oligonukleotide von 65 bis 80 kD gefunden werden (Shoji, 1991; Loke, 1989). Ein interessantes Resultat ist außerdem, daß die intrazelluläre Konzentration an Oligonukleotiden umgekehrt proportional zu deren Länge ist und die Zellaufnahme somit von der Länge abhängt (Loke, 1989).

Unter den modifizierten Oligonukleotiden spielen die ebenfalls polyanionischen Phosphorothioate bis heute im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung die wichtigste Rolle. Da die Anwesenheit von Phosphorothioaten die Zellaufnahme unmodifizierter Oligonukleotide inhibiert, kommt auch für sie die rezeptorvermittelte Endocytose als Auf-

nahmeweg in Betracht (Shoji, 1991; Thierry, 1992; Zhao, 1993). Der ionische Charakter des Phosphatrückgrats scheint ein wesentliches Kriterium für den Aufnahmemechanismus zu sein. Darüber hinaus tendieren Phosphorothioate dazu, mit zahlreichen Proteinen unspezifische Wechselwirkungen einzugehen. Neben den hieraus resultierenden Nebenwirkungen kann dies zu einer verstärkten Bindung von Phosphorothioaten an Zelloberflächenproteine führen.

Ungeladene Methylphosphonate werden möglicherweise über einen anderen Transportmechanismus wie der für geladene Oligonukleotide internalisiert. Die Gabe von Methylphosphonaten hat keinen signifikanten Einfluß auf die Aufnahme von Phosphodiestern und Phosphorothioaten (Stein, 1988), so daß die Methylphosphonate nicht mit anionischen Spezies um extrazelluläre Bindungsstellen konkurrieren zu scheinen. Aufgrund ihrer Ladungsneutralität und erhöhten Lipophilie ist zum einen der Anteil des passiven Transports durch die Zellmembran größer. In einer Arbeit von Shoji et al. (Shoji, 1991) konnte zum anderen gezeigt werden, daß Methylphosphonate ebenfalls durch einen aktiven Endocytoseprozeß internalisiert werden. Durch gezieltes Ansäuern des Cytoplasmas wurde die rezeptorvermittelte Endocytose inhibiert, so daß für die dann immer noch funktionierende Zellaufnahme von Methylphosphonaten die Flüssigphase-Endocytose als Hauptweg diskutiert wird (Shoji, 1991; Levis, 1995). Für einen aktiven, energetischen Transport spricht außerdem die Temperaturabhängigkeit der Zellaufnahme.

In den meisten bis heute veröffentlichten Arbeiten zur Zellaufnahme werden Endocytoseprozesse für geladene wie ungeladene Oligonukleotide favorisiert (Juliano, 1999). Eine Studie von Zhao et al. hat die Aufnahmerate aller drei zuvor erwähnten Modifikationen in Milzzellen einer Maus transparent gemacht. Es zeigte sich, daß die Affinität Fluoreszein markierter Oligonukleotide für die Bindung an die Zelloberfläche und gleichermaßen die Zellaufnahme folgende Reihenfolge hat: Phosphorothioate werden besser aufgenommen als teilweise beschwefelte Oligonukleotide. Diese wiederum werden besser als Phosphodiester internalisiert und die niedrigste Aufnahme in das Cytoplasma wurde in diesem System für teilweise als Methylphosphonate modifizierte Oligonukleotide beobachtet (Zhao, 1993). Die Phosphorothioate sind sehr effektive Inhibitoren für den Transport von Phosphodiestern, was auf eine Konkurrenz um Bindungsstellen auf der Zelloberfläche hinweist. Darüber hinaus scheinen Phosphorothioate auch zu anderen Zelloberflächenproteinen eine hohe Affinität zu haben, was möglicherweise den effizienteren Membrantransport gegenüber Phosphodiestern erklärt.

Die Aufnahme in Zellen kann sehr gut mit Fluoreszeिन markierten Oligonukleotiden untersucht werden. Mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops läßt sich zeigen, in welche Zellkompartimente internalisierte Oligonukleotide transportiert werden. Während durch Mikroinjektion in die Zelle eingebrachte, Fluoreszeिन markierte Oligonukleotide nach kurzer Zeit im Zellkern nachgewiesen werden können (Leonetti, 1991), findet man ein punktuell Leuchtmuster für mittels Endocytose aufgenommene Oligonukleotide im Cytoplasma (Thierry, 1992). Welche Strategien es gibt, die Zellaufnahme dieser therapeutisch wichtigen Wirkstoffe weiter zu verbessern, wird in den folgenden Kapiteln erläutert.

3.2 Nichtvirale Vektoren

Die größte Bedeutung unter den nichtviralen Vektoren für den Nukleinsäuretransport ins Cytoplasma kommt den kationischen Liposomen zu. Kationische Liposomen können aus einem einzelnen kationischen Amphiphil, einem „Cytfectin“ („cyto-“ für Zelle und „-fectin“ für Transfektion) gebildet werden. Üblicher ist jedoch eine Kombination aus einem Cytfectin und einem neutralen Lipid. Die Pionierarbeiten zur Verwendung kationischer Liposomen beim Transport von Nukleinsäuren von Felgner et al. führten zur Entwicklung eines kommerziell erhältlichen, kationischen Liposoms. Das unter dem Namen Lipofektin bekannt gewordene Produkt setzt sich im Verhältnis 1:1 aus dem Cytfectin *N*-[(1,2,3-Dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-triethylammoniumchlorid (DOTMA) und dem natürlich vorkommenden Lipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) zusammen (Felgner, 1987).

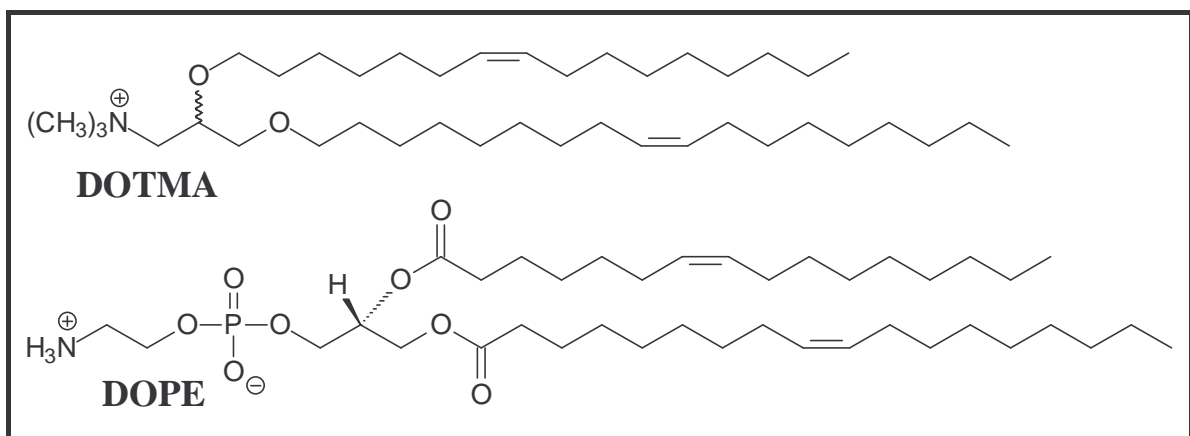


Abb. 3.2: Komponenten des Lipofektins: DOTMA / DOPE = 1:1

Darüber hinaus gibt es heute mehr als 20 neue Liposomensysteme, die sich in der Regel aus der Kombination eines neuen, synthetischen Cytocfectins mit DOPE zusammensetzen. Beispiele für neue Cytokine sind biglykosylierte Gallensäurederivate (Walker, 1996; Bove, 1997) sowie verschiedene Cholesterolderivate, die in Kombination mit DOPE zu den wirksamsten Formulierungen überhaupt zählen (Cooper, 1998).

Der Mechanismus des durch kationische Liposomen vermittelten Nukleinsäuretransports ist kompliziert und nicht detailliert verstanden. Nach der Vereinigung von Nukleinsäuren mit Suspensionen kationischer Liposomen werden rasch heterogene Komplexe gebildet, in denen die negative Ladung des Phosphatrückgrats neutralisiert ist. Möglicherweise kommt es dabei zu einem kooperativen Kollaps der DNA in eine erheblich kompaktere Struktur, die noch effektiver vom Lipid eingekapselt werden kann. Für die Internalisierung der Liposom-DNA-Komplexe werden zwei Mechanismen favorisiert: Zum einen gelangen die Nukleinsäuren durch Membranfusion in die Zelle. Zum anderen wurde auch eine langsame Endocytose intakter Komplexe beobachtet. Das natürliche Lipid DOPE destabilisiert dabei die Lipiddoppelschicht. Unglücklicherweise scheint sich ein Großteil der in die Zelle eingeschleusten DNA nicht von den endosomalen Partikeln ins Cytoplasma ablösen zu können. Dadurch wird ein Teil des therapeutischen Potentials eingebüßt (Walker, 1996; Miller, 1998).

Die Kupplung von Peptiden mit Oligonukleotiden dient dem Zweck, gezielt die Wechselwirkungen mit Zelloberflächenproteinen wie Wachstumsfaktor-Rezeptoren zu verbessern (Basu, 1997). Außerdem gelingt es mit Peptiden, Zellmembranen zu destabilisieren und damit die Passage des Oligonukleotids zu erleichtern. Auch ihre Freisetzung aus Endosomen kann auf diese Weise verbessert werden (Wyman, 1997). Obgleich die Rate der Zellaufnahme im Vergleich zur Verwendung kationischer Liposomen deutlich schlechter ist, so bieten Peptid gekuppelte Oligonukleotide die Möglichkeit, die Verteilung des Wirkstoffs im intrazellulären Raum zu steuern (Juliano, 1999).

Dendrimere sind baumartig verzweigte Makromoleküle aus einem Kern und Verzweigungseinheiten (griech.: dendron - der Baum). Ein Vorteil von Dendrimern ist ihre relativ geringe molekulare Größe und eine niedrigere Zelltoxizität verglichen mit kationischen Liposomen. Außerdem kann ihre Oberfläche leicht mit Peptiden oder anderen Molekülen versehen werden, um spezifisch verschiedene Zelltypen zu erreichen (Hughes, 2000). Für den wirksamen und zellschonenden Gentransfer von Nukleinsäuren und plasmidischer DNA werden Polyamidoamin (PANAM)-Dendrimere eingesetzt (Abb. 3.3). Ähnlich wie bei den kationischen Liposomen wird nach dem Mischen aktivierter Dendri-

mere mit Nukleinsäuren deren anionisches Phosphatrückgrat durch die protonierten Aminogruppen des Dendrimers neutralisiert. Auch hier kollabiert die DNA zu einer kompakteren Struktur. Bei der Verwendung kationischer Liposomen arbeitet man lediglich mit einem schwachen Überschuß positiver Ladung. Die Aminogruppen der Dendrimere binden die Komplexe mit der acht- bis zwölffachen überschüssigen, positiven Ladung an negativ geladene Oberflächenmoleküle in der Membran eukaryontischer Zellen. Die Internalisierung erfolgt durch unspezifische Endocytose. Innerhalb der Endosomen kann es durch eine Verschiebung des Ladungsgleichgewichts zwischen Dendrimer und Nukleinsäure zur intraendosomal Freisetzung kommen. Durch Hydratisierung dehnen sich die Dendrimere stark aus, was zu einem Anschwellen des Endosoms und zur Freisetzung der DNA ins Cytosol führt (Tang, 1996; DeLong, 1997; Weber, 2000).

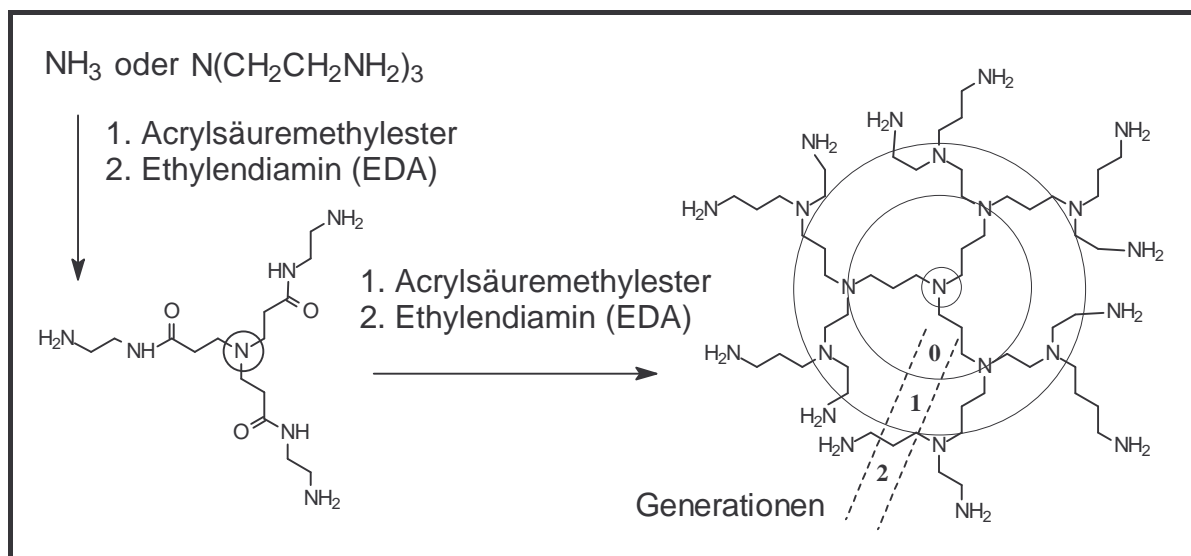


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der stufenweisen Synthese eines PANAM-Dendrimers

Auch mittels sogenannter Nanopartikel lassen sich Oligonukleotide ins Cytosol von Zellen überführen. Wie der Name schon sagt, wechselwirken Nanopartikel mit Substanzen der Größenordnung im Nanometerbereich. Eine typische B-DNA hat einen Helixdurchmesser von etwa 2,37 nm und eine Ganghöhe von 3,32 nm und kann somit mit geeigneten Nanopartikeln transportiert werden. Für Oligonukleotide haben sich kationische Polyalkylcyanoacrylat-Nanopartikel oder Diethylaminoethyl-dextran-Nanopartikel bewährt (Schwab, 1994; Godard, 1995; Zobel, 1997; Fattal, 1998). Die maximale Ladungskapazität eines solchen Nanopartikels liegt zwischen 5000 und 6000 Oligonukleotiden. Seine Adsorptionseffizienz hängt von der Kettenlänge des Oligonukleotids, der Natur des Polymers, der Hydrophobizität des Kations und der Ionenkonzentration des Mediums ab. Mit kationi-

schen Polyalkylcyanoacrylat-Nanopartikeln ist es gelungen, Antisense Oligonukleotide gerichtet gegen eine Punktmutation der *Ha-ras* mRNA in T24 Zellen einzuschleusen und eine RNase H abhängige Inhibierung zu erzielen (Schwab, 1994; Godard, 1995).

Die in diesem Kapitel vorgestellten nichtviralen Vektoren für den Gentransport sind Gegenstand aktueller Forschung. Viele Fragen sind bislang unbeantwortet: Welche Zelloberflächenrezeptoren wechselwirken mit dem DNA-Vektor System? Wie wird der Komplex in die Zelle transportiert? Wie wird der Wirkstoff aus den Endosomen und wie aus seinem Transportkomplex freigesetzt? Wie verteilt sich der Wirkstoff im Cytosol? Nicht zuletzt stellt sich die Frage nach der Toxizität dieser kationischen Vektoren zum Gentransfer in Eukaryotenzellen.

3.3 Virale Vektoren

Viren haben über Jahrmillionen die Strategien zum Eindringen in ihre Wirtszellen optimiert. Eine virale Infektion verläuft deshalb wesentlich effektiver als die bisher beschriebenen Transfektionsmethoden. Virale Gentransfervektoren erhält man durch Einbringen von therapeutischer RNA oder DNA in das Virusgenom. Das virale Genom wird dabei zumeist verkleinert, so daß es nicht mehr pathogen ist. Vorteile defekter, viraler Vektoren sind die hohe Effizienz und Spezifität, mit denen bestimmte Zelltypen bevorzugt „infiziert“ werden können und die Möglichkeit, daß das eingeschleuste Gen in der Zelle vervielfältigt und freigesetzt wird. So ist es beispielsweise gelungen, mit Hilfe von rekombinanten Adenovirus-Vektoren Hammerhead Ribozyme gegen Hepatitis C Virus RNA zu exprimieren. Auf diese Weise konnte in humanen Hepatocyten der HCV-RNA-Level deutlich gesenkt werden, was die Hoffnung für eine vektorvermittelte Ribozymtherapie weckt (Lieber, 1996). Die Gefahren einer solchen Behandlung liegen auf der Hand: Es kann zu einer Immunreaktion mit schon vorhandenen Wildtyp-Antikörpern des viralen Vektors kommen. Außerdem besteht die Gefahr der Aktivierung endogener, virusähnlicher Sequenzen und damit die Generierung neuer viraler Partikel mit unvorhersagbaren Eigenschaften durch Rekombination. Eine weitere Limitierung ist durch die geringe Länge der zu transportierenden DNA gegeben. Retrovirale Vektoren können in der Regel nicht mehr als 8 kBp Fremd-DNA aufnehmen (Weber, 2000).

3.4 Cholesterol gekoppelte Oligonukleotide

Eine verbesserte Zellaufnahme von Oligonukleotiden könnte auch gelingen, indem man körpereigene, zelluläre Transportmechanismen anderer biologisch aktiver Moleküle für diesen Zweck nutzbar macht. Für zahlreiche Steroide wie Cholesterol und Gallensäuren sind solche Transportsysteme bekannt. Eine kovalente Anknüpfung derartiger Verbindungen an therapeutische Oligonukleotide könnte bei vergleichbar niedriger Toxizität zu einer gesteigerten Zellaufnahme führen.

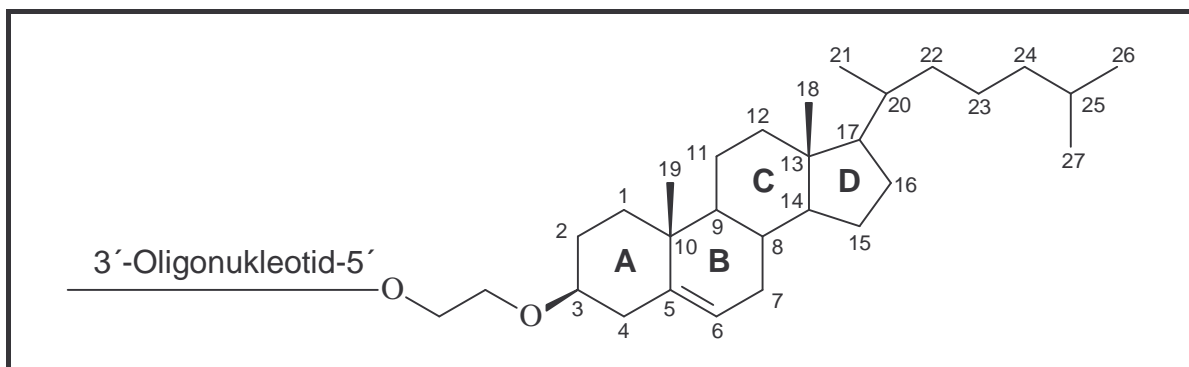


Abb. 3.4: Beispiel für ein 5'-Cholesterol konjugiertes Oligonukleotid mit Numerierung nach IUPAC

Cholesterol ist ein wichtiger Bestandteil aller eukaryotischer Plasmamembranen. Es wird über die Nahrung aufgenommen, kann aber auch *de novo* synthetisiert werden. Ein Erwachsener synthetisiert etwa 800 mg Cholesterol am Tag. Die kovalente Anknüpfung von Cholesterol an das 3'- oder 5'-Ende eines Oligonukleotids hat einen erheblichen Einfluß auf den lipophilen Charakter dieses Moleküls. Wurde diese Art der Modifikation erstmals 1989 von Letsinger et al. beschrieben, so stehen heute käufliche Cholesterolbausteine zur Verfügung, die an Oligonukleotide kovalent gebunden werden können. Zwei wichtige Wirkmechanismen derart modifizierter Antisense Oligonukleotide konnten gefunden werden: Zum einen wurde für ein Cholesterol gelabeltes Phosphorothioat eine nicht sequenzspezifische Inhibierung der HIV-1 Replikation festgestellt. Während unmodifizierte Oligonukleotide nur wenig antiviral wirkten, führte die kovalente Verknüpfung mit Cholesterol zu einer deutlichen Steigerung des Inhibitionspotentials. Zurückgeführt werden kann dieser Effekt auf eine Verminderung der zellulären Infektion durch die Störung der Bindung und Fusion von gesunden mit infektiösen Zellen. Darüber hinaus wirken Cholesterol gelabelte

Phosphorothioate als direkte Inhibitoren der viralen Reversen Transkriptase (Letsinger, 1989; Stein, 1991; MacKellar, 1992).

Während die gerade dargestellte antivirale Wirkung eines Cholesterol modifizierten Oligonukleotids auf sequenzunabhängiger Inhibierung von Zelloberflächenproteinen beruhte, gibt es mit dem Cholesterol-LDL-System auch ein aktives Transportsystem. Cholesterol und andere Lipide werden in Form derartiger Lipoproteine zu ihren Zielzellen transportiert. LDL („low density lipoprotein“-)Partikel haben einen Durchmesser von 22 nm und eine Masse von ca. drei Millionen Dalton. In ihrem Kern werden ca. 1500 hauptsächlich als Lineolat veresterte Cholesterolmoleküle zu peripherem Gewebe transportiert. LDL-Partikel sind für Zellen die wichtigste Cholesterinquelle (Stryer, 1996).

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß 3'- wie 5'-Cholesterol gekuppelte Oligonukleotide rasch mit LDL-Partikeln konjugieren (Krieg, 1993; Rump, 1998). Die Aufnahme in Zellen erfolgt durch LDL-Rezeptor vermittelte Endocytose. Die LDL-haltigen Endocytosevesikel verschmelzen mit Lysosomen. Bei der Freisetzung des Wirkstoffs werden die Proteinkomponente des LDL-Partikels und die Cholesterolester hydrolysiert. Therapeutisch besonders attraktiv ist die Tatsache, daß insbesondere Tumorzellen einen hohen Expressionslevel für LDL-Rezeptoren aufweisen und damit bevorzugte Ziele von in LDL-Partikeln transportierten Nukleinsäuren sind. Für Cholesterol gekuppelte Oligonukleotide konnte tatsächlich eine verbesserte Zellaufnahme verbunden mit einer Erhöhung der Antisense-Aktivität gefunden werden (Krieg, 1993; Rump, 1998). Aufgrund ihres einfachen synthetischen Zugangs sind Cholesterol konjugierte Oligonukleotide geeignete Vertreter für Antisense-Anwendungen.

3.5 Gallensäuren

Unter dem Begriff Gallensäuren (engl.: bile acids) faßt man verschiedene Abbauprodukte des Cholesterols zusammen. In mehreren enzymatischen Schritten wird unter Verkürzung der Seitenkette des Cholesterols die charakteristische Säurefunktion eingeführt. Durch den unterschiedlichen Hydroxylierungsgrad der Kohlenstoffatome 3, 6, 7 oder 12 wird letztlich ein ganzer Pool unterschiedlicher Gallensäuren gebildet. Strukturell gemeinsam ist allen Gallensäuren das Steroidgerüst mit den *cis*-verknüpften Ringen A und B sowie der Pentansäure-Seitenkette am Ring D. Ihre Unterscheidung erfolgt nach Anzahl, Position und Stereochemie der Hydroxylgruppen. Etwa 90 % der Gallensäuren beim Menschen bestehen aus den primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure sowie der sekundä-

ren Gallensäure Desoxycholsäure im Verhältnis von etwa 4:4:2. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Cytokinen wie DOTMA, die eine polare Kopfgruppe und einen unpolaren Schwanz tragen, besitzen Gallensäuren eine konvexe, hydrophobe β -Seite, eine konkave, hydrophile Unterseite und eine negativ geladene Seitenkette mit Carbonsäurefunktionalität. Ihr starker amphiphiler Charakter äußert sich in ausgeprägten grenzflächenaktiven Eigenschaften. Gallensäuren bilden bereitwillig Mizellen, was für ihre physiologische Funktion von zentraler Bedeutung ist (Wess, 1995).

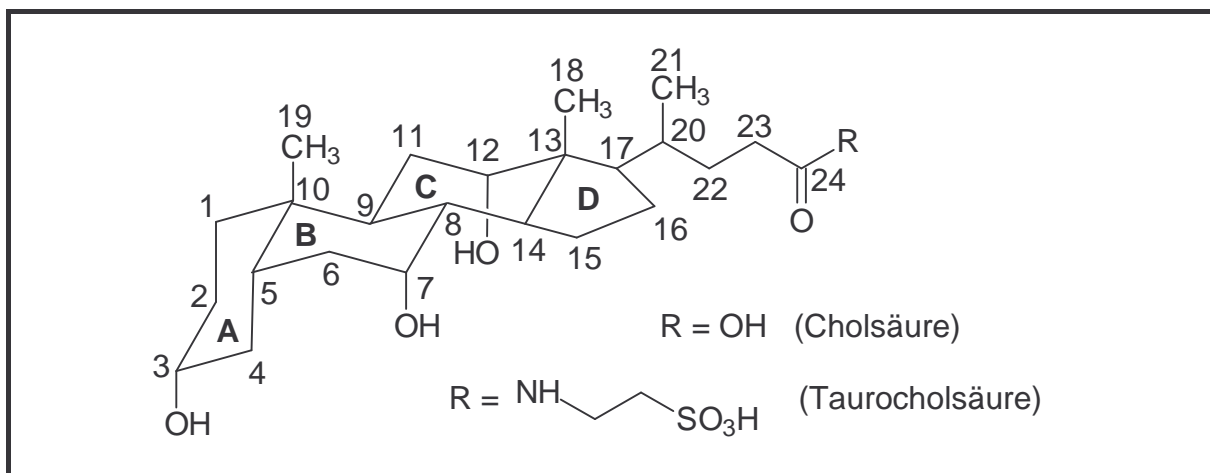


Abb. 3.5: Strukturen von Cholsäure und Taurocholsäure mit Numerierung nach IUPAC

3.5.1 Der enterohepatische Kreislauf

Der Mensch bildet täglich etwa 600 bis 800 ml Gallenflüssigkeit, die in der Gallenblase gespeichert und bei der Nahrungsaufnahme in den Zwölffingerdarm sezerniert wird. Die Gallensäuren sind dort maßgeblich an der Verdauung und Resorption von wasserunlöslichen Lipiden, die in Mizellen dispergiert werden, beteiligt. Im unteren Bereich des Dünndarms werden über 95 % der Gallensäuren durch ein spezifisches, aktives Transportsystem rückresorbiert und über das Pfortaderblut zur Leber transportiert. Die Aufnahme in Leberzellen erfolgt durch die sinusoidale oder basolaterale Membran über ein weitaus weniger substratspezifisches, aktives Transportsystem. In den Hepatozyten werden die Gallensäuren mit Glycin oder Taurin amidiert und über die canalikulare Membran in die Gallenblase transportiert. Dieser enterohepatische Kreislauf wird täglich 6 bis 15 Mal durchlaufen. Bei einer Gallensäuremenge von nur 1,5 bis 4 g zirkulieren somit täglich 17 bis 40 g Gallensäuren, die von Epithelzellen im Dünndarm und den Hepatozyten internalisiert werden müssen. Die hohe Kapazität dieser aktiven Transportsysteme macht sie für eine Anwen-

derung als Transporter für pharmakologische Wirkstoffe interessant (Wess, 1995; Kramer, 1996).

3.5.2 Funktion und Aufbau der Leber

Die Leber ist die größte Drüse des Menschen und macht bei Erwachsenen etwa 2,5 % des Körpergewichts aus. Ihre wichtigsten physiologischen Aufgaben sind:

- Bildung eines Aminosäurepools für die Proteinbiosynthese
- Bildung von Harnstoff als wasserlösliches Endprodukt des Aminosäurestoffwechsels
- Aufbau des Speicherkohlenhydrates Glykogen durch Gluconeogenese
- Synthese und Abbau der Lipoproteine als zentrales Organ des Fettstoffwechsels
- Abbau und Ausscheidung des Blutfarbstoffs in Form von Bilirubin
- Steuerung des Spurenelement- und Vitaminstoffwechsels
- Synthese von Cholesterol und den hieraus abgeleiteten Gallensäuren

Makroskopisch gesehen besteht die Leber aus einem rechten und linken Lappen sowie zwei kleineren Lappen. Die Durchblutung der Leber beträgt etwa 1400 ml/min. Der arterielle Anteil liegt bei etwa 25 % und stellt die Versorgung von Gallengängen, Bindegewebe und Lebergefäßen sicher. Die verbleibenden 75 % der Blutversorgung werden durch Pfortaderblut gedeckt, mit dem auch resorbierte Gallensäuren transportiert werden. Dem Verständnis des mikroskopischen Aufbaus der Leber soll Abbildung 3.5 dienen. Das Lebergewebe ist wie alle Gewebe eine Mischung aus Zelltypen, besteht aber hauptsächlich aus Leberzellen (Hepatozyten). Hepatozyten sind polarisiert gebaut und trennen zwei verschiedene Kompartimente, nämlich das der basolateralen oder sinusoidalen Zelloberfläche zugewandte Blutmilieu von den an den Zellspitzen gelegenen, mit Gallenflüssigkeit gefüllten Gallenkanälchen. Die den Sinusoiden zugewandten Seiten dieser Leberzellplatten sind mit einer dünnen Schicht von Endothelzellen ausgekleidet, die jedoch durch den mit Blutplasma gefüllten Disse-Raum von den Hepatozyten getrennt sind, so daß ein optimaler Austausch von Stoffen möglich ist. In die Schicht der Endothelzellen sind vereinzelt ortsständige, Makrophagen-ähnliche Kupffersche Sternzellen eingebaut, die Fremdbestandteile des Blutes phagozytieren können. Alle Zelltypen sind teilungsfähig und können sich nach einer Vergiftung oder Infektion selbständig regenerieren (Alberts, 1990; Beck, 1998).

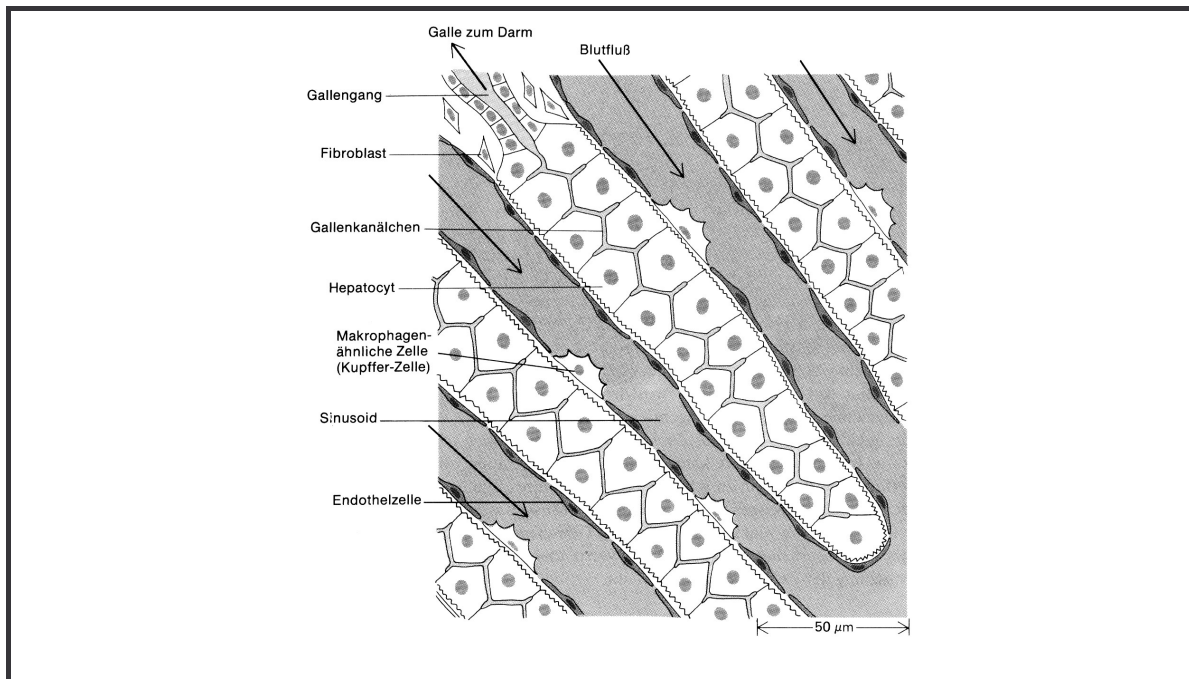


Abb. 3.5: Schematischer Aufbau der Feinstruktur der Leber (Alberts, 1990)

3.5.3 Transportproteine der Hepatozyten

Sowohl in der sinusoidalen als auch in der den Gallenkanälchen zugewandten, canalikularen Membran der Hepatozyten konnten membranständige, aktive Transportproteine für Gallensäuren charakterisiert werden. Die Aufnahme von Gallensäuren in Hepatozyten verläuft gegen einen Konzentrationsgradienten entlang der sinusoidalen oder basolateralen Membran. Die Extraktion von Gallensäuresalzen aus sinusoidalem Blut ist ein sehr effizienter Prozeß. Zwei unterschiedliche Transportsysteme spielen dabei eine wichtige Rolle: ein Natriumionen-abhängiger und ein Natriumionen-unabhängiger Mechanismus. Die Natriumionen-abhängige, basolaterale Aufnahme von Gallensäuren wird getrieben von einem Ionengradienten, der durch eine Natrium-Kalium-ATPase gesteuert wird. Das humane, Natrium-abhängige Taurocholot cotransportierende Polypeptid (NTCP) ist ein Glykoprotein aus 348 Aminosäuren und weist mit dem Ntcp der Rattenleber eine Homologie von 77 % auf (Hagenbuch, 1996; Kamisako, 1999). Es ist ein relativ substratspezifisches Transportprotein für konjugierte Gallensäuren wie Taurocholot. Die Natrium-unabhängige Internalisierung von anionischen Substanzen erfolgt über das organische Anionen transportierende Polypeptid (OATP). Seine Affinität zu Taurocholot ist deutlich niedriger wie seine Substratspezifizität insgesamt. Das humane OATP besteht aus 670 Aminosäuren und weist eine Homologie von 67 % zum Oatp der Ratte auf (Hagenbuch, 1996; Kamisako, 1999). Durch Klonierung dieser Carrierproteine war es möglich, gezielt verschiedene Gallensäure-

re-gekuppelte Substanzen auf ihre Aufnahme durch das Ntcp oder das Oatp zu testen. Abbildung 3.6 zeigt die sinusoidalen Transportproteine OATP, NTCP und das organische Kationen Transportprotein OCT1, das für die Internalisierung kleiner organischer Kationen zuständig ist.

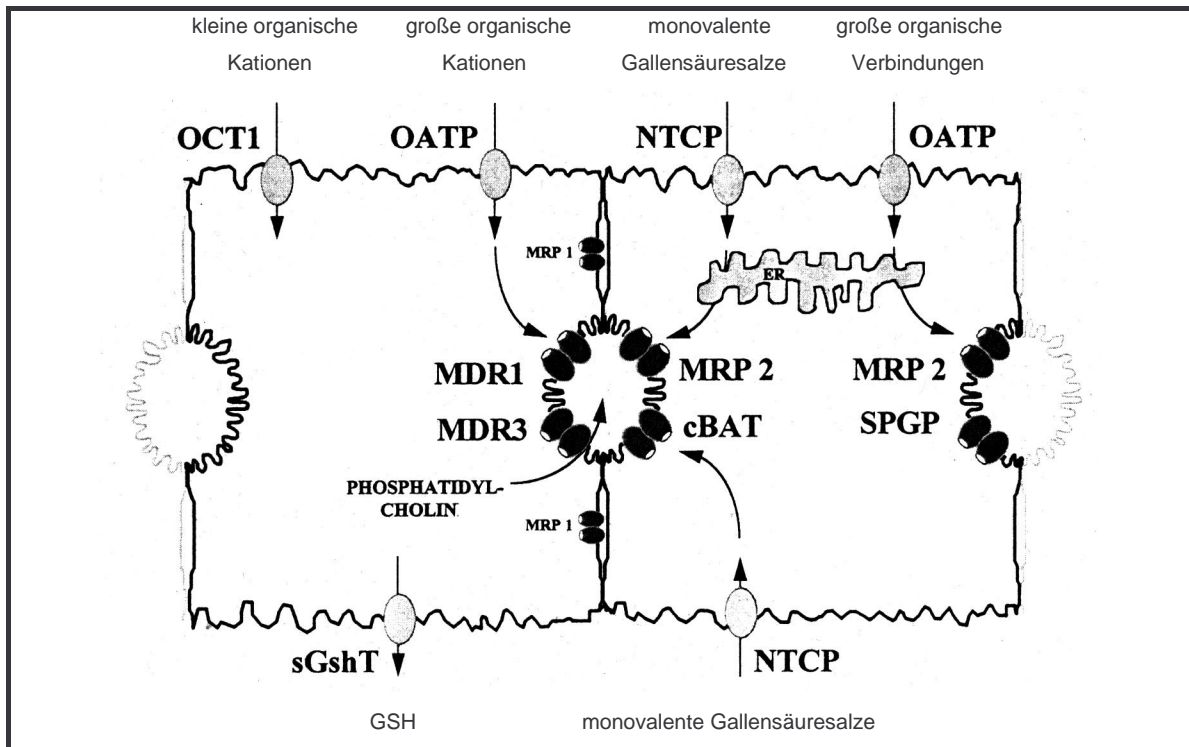


Abb. 3.6: Schematische Darstellung basolateraler und canalikularer Transportsysteme in Hepatozyten (Müller, 1997)

Neben dem basolateralen Transport ins Cytoplasma von Hepatozyten werden über die Transportproteine der canalikulären Membran aufgenommene Substanzen in die Gallenkanäle abgegeben und in der Galle gespeichert. Die wichtigsten Carrier für diese sekretorische Funktion der Hepatozyten sind der multispezifische organische Anionen Transporter cMOAT (mrp2), der zu einer Gruppe aus sechs ähnlichen Transportproteinen (mrp1 bis mrp6) gehört (Kamisako, 1999) sowie der canalikuläre Gallensäure Transporter cBAT (Müller, 1997). Sie sind für den Transport zumeist konjugierter Gallensäuren in die Gallenkanälchen zuständig. Die canalikulären Transportproteine bilden eine sogenannte ATP bindende Kasette, da sie im Gegensatz zu sinusoidalen Carriern ATP hydrolysieren. Die canalikulären Transportproteine sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung (Erlinger, 1996; Suchy, 1997; Müller, 1997; Stieger, 1998; Meier, 1998; Kamisako, 1999).

3.5.4 Drug Targeting und Membrantransport Gallensäure modifizierter Wirkstoffe

Wie ist es möglich, die sinusoidalen Transportsysteme der Hepatozyten der Gallensäuren für eine leberselektive Arzneimittelwirkung (Drug Targeting) auszunutzen? Diese Fragestellung wurde in den vergangenen Jahren intensiv von Werner Kramer und Mitarbeitern untersucht. Hierzu wurden verschiedene Pharmaka kovalent mit Gallensäuren konjugiert. Zunächst konnte für Chlorambucil, einem alkylierenden Zytostatikum, das unkonjugiert fast ausschließlich über die Niere ausgeschieden wird, nach Kupplung an Taurocholat ein signifikanter hepatischer Transport in die Galle gefunden werden. Gleichzeitig blieb die alkylierende Wirkung des Chlorambucils erhalten (Kramer, 1992; Wess, 1993b). Peptide werden normalerweise schlecht durch die Darmwände resorbiert. Nach kovalenter Kupplung an Gallensäuren konnte eine verbesserte Affinität der Peptide zu intestinalen und hepatischen Transportsystemen gefunden werden, wobei die Affinität mit zunehmender Peptidlänge abnahm. (Kramer, 1994; Wess, 1995; Kramer, 1996). Weitere Beispiele belegen den erhöhten Gallensäurecharakter derartiger Konjugate und damit einhergehend die Möglichkeit eines leberselektiven Drug Targetings sowie eine Verbesserung der intestinalen und hepatischen Membrangängigkeit (Petzinger, 1995; Kramer, 1997a; Kramer, 1997b).

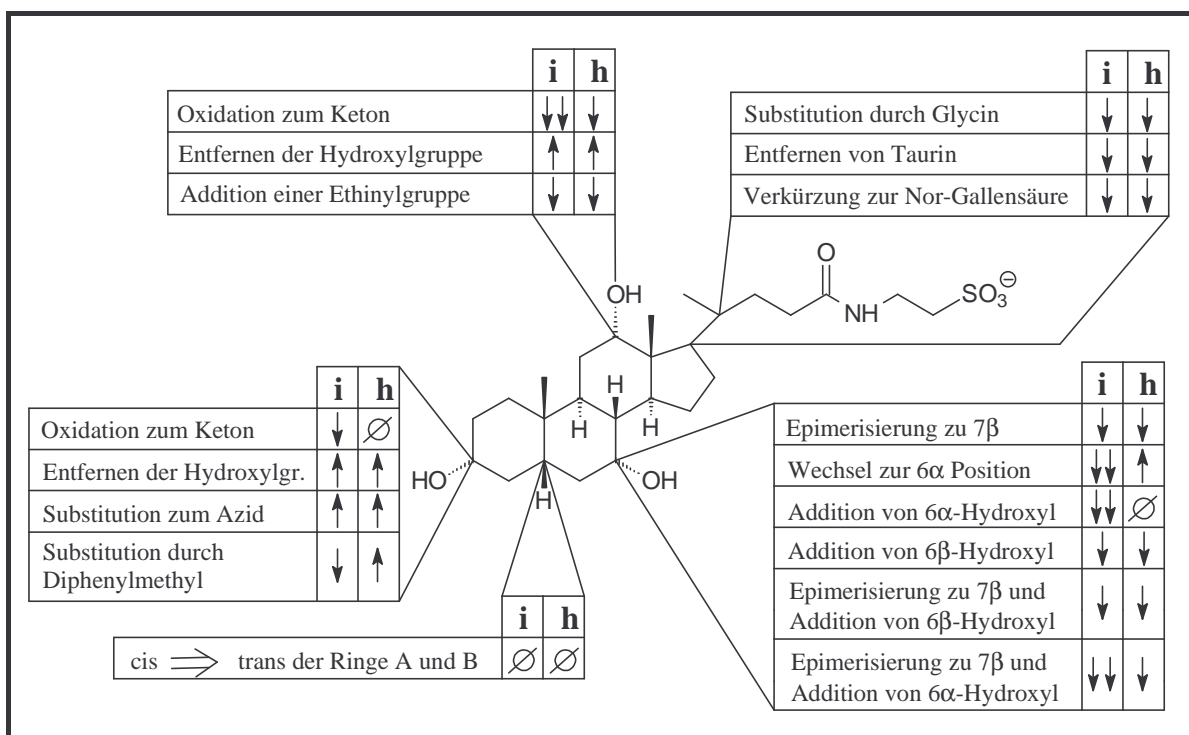


Abb. 3.7: Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Gallensäuren für die molekulare Erkennung durch intestinale (i) und hepatische (h) Gallensäuretransporter (Kramer, 1999)

Die kovalente Verknüpfung von Wirkstoff und Gallensäure erfolgt in den genannten Arbeiten jeweils über die 3-Position der Gallensäuren. Die 3 α -Hydroxylgruppe ist in allen natürlich vorkommenden Gallensäuren essentiell. Wie Abbildung 3.7 zeigt, hat sie den geringsten Einfluß auf den intestinalen oder hepatischen Membrantransport. Sowohl das Entfernen wie auch Substitution der 3 α -Hydroxylgruppe führt an der basolateralen Membran von Hepatozyten sogar zu einer gesteigerten Zellaufnahme. So konnte gezeigt werden, daß die 3 α -Hydroxylgruppe nicht essentiell für den Transport durch das Natriumabhängige Taurocholat cotransportierende Polypeptid der Ratte (Ntcp) ist (Baringhaus, 1999; Kramer, 1999).

Derivatisierungen an anderen funktionellen Gruppen gehen zumeist mit einer deutlichen Verschlechterung der Zellaufnahme einher. Insbesondere eine Veränderung an der Seitenkette des Taurocholats führt zu einer deutlichen Verschlechterung der Zellaufnahme, so daß eine (synthetisch leichtere) Ankupplung über die Säurefunktion nicht in Frage kommt. Eine *cis-trans*-Isomerisierung der Ringe A und B ist ohne signifikanten Einfluß für die Affinität zu den Transportproteinen. Für den spezifischen Transport von Therapeutika ins Cytoplasma von Hepatozyten spielt eine weitere Beobachtung eine wichtige Rolle: Gallensäurederivate, denen eine freie 3 α -Hydroxylgruppe fehlt, zeigen eine verzögerte Sekretion durch die canalikuläre Membran. Eine effiziente Sekretion von Gallensäuren in die Galle ist möglicherweise von der Anwesenheit der 3 α -Hydroxylgruppe abhängig, was zu einer verlängerten Verweildauer eines Wirkstoffs in der Leberzelle führt (Kramer, 1999). Neben den genannten Vorteilen einer Derivatisierung an der 3-Position entfalten Gallensäure gekuppelte Therapeutika in vielen Fällen ihre volle, therapeutische Wirkung und müssen nicht von einem Transportmedium freigesetzt werden. Außerdem läßt die Verwendung natürlicher Biomoleküle auf eine geringe Toxizität derartiger Konjugate hoffen.

3.5.5 Gallensäure gekuppelte Oligonukleotide

Die kovalente Verknüpfung eines Oligonukleotids mit einer Gallensäure wurde erstmals 1994 von Muthiah Manoharan und Mitarbeitern beschrieben (Manoharan, 1994). Cholsäure wurde über seine aktivierte Carbonsäurefunktion an 3'- oder 5'-Amino-gelabelte Oligonukleotide gebunden, um deren Lipophilie zu erhöhen und eine Bindung an einen Gallensäure-Rezeptor zu erzielen. Die in dieser Studie verwendeten Zelllinien besaßen aber keine

Rezeptoren für Gallensäuren, so daß die leicht verbesserte Antisense-Aktivität der Konjugate lediglich auf die Änderung der Lipophilie der Wirkstoffe zurückgeführt werden konnte. (Manoharan, 1994; Manoharan, 1995). Beinahe zeitgleich erschien eine Arbeit, in der die Zellaufnahme von Cholesterol und Cholsäure gekoppelten Antisense Oligonukleotiden gegen das Actin-Gen in Neutrophilen untersucht wurde. Die kovalente Verknüpfung erfolgte wiederum über die aktivierte Carbonsäurefunktion mit Amino-gelabelten Oligonukleotiden. Durch die radioaktive Markierung der Oligonukleotide konnte die Aufnahme in die Zellen direkt bestimmt und nicht über den Antisense-Effekt evaluiert werden. Dabei wurde für die Cholesterol oder Cholsäure gekoppelten Antisense Oligonukleotide ebenfalls eine Verbesserung der Zellaufnahme gefunden, die hauptsächlich auf eine Steigerung der passiven Diffusion durch Erhöhung der Lipophilie zurückgeführt wurde (Chow, 1994).

Erst kürzlich wurde von Ernst Petzinger, Werner Kramer und Mitarbeitern die kovalente Verknüpfung von Cholsäure mit gemischten Phosphorothioat-Phosphodiester Oligonukleotiden über die 3-Position der Cholsäure publiziert. Für ein gemischtes, radioaktiv markiertes 15mer konnte kein signifikanter Unterschied in der Aufnahmemenge zwischen gallensäurehaltigem und unmodifiziertem Oligonukleotid in isolierten Hepatozyten gefunden werden. Die Internalisierung über gallensäurespezifische Transportsysteme wie das Ntcp oder das oatp hätte einen deutlicheren Effekt erwarten lassen. Außerdem führte die Gabe von Cholat, einem Substrat des Ntcp und oatp, zu keiner Beeinflussung der Zellaufnahme Cholat konjugierter Oligonukleotide (Pagels, 1999). Auf der anderen Seite konnte im Tiermodell im Lebergewebe einer Ratte für das gallensäurehaltige 15mer eine um 34 % höhere Konzentration gefunden werden (Petzinger, 1999). Die Ausscheidung von Oligonukleotiden über die canalikuläre Membran von Hepatozyten war sowohl von der Kettenlänge als auch von dem Vorhandensein des canalikulären Anionentransporters (cMOAT) abhängig. Ab einer Länge von sechs Nukleotiden verringerte sich die Ausscheidungsgeschwindigkeit Gallensäure modifizierter Oligonukleotide deutlich, so daß eine verlängerte Verweildauer eines potentiellen Wirkstoffs in der Leberzelle resultieren sollte (Pagels, 1999).

Auch wenn in diesen Studien keine signifikante Erhöhung der Zellaufnahme gallensäurehaltiger Oligonukleotide gefunden wurde, so konnte ihre Anreicherung im Lebergewebe und ihre verzögerte Sekretion zur Galle gefunden werden. Aus dieser Sicht scheinen über die 3-Position von Gallensäuren gekoppelte Antisense Oligonukleotide mit leberspezifischer Wirkung interessante Werkzeuge zur Therapie leberspezifischer Erkrankungen wie beispielsweise Hepatitis darzustellen.

4. Hepatitis-Viren

4.1 Was sind Viren ?

Viren sind dem Menschen aufgrund ihrer geringen Größe lange verborgen geblieben. 1886 untersuchte Adolf Mayer, ein deutscher Agrarchemiker, eine Krankheit der Tabakpflanzen. Ein klarer, löslicher Extrakt aus erkrankten Blättern verursachte nach Injektion in gesunde Pflanzen alle Symptome der Tabakmosaikkrankheit. Die Ursache der Erkrankung war nicht auf Bakterien oder Pilze zurückzuführen. Der Erreger ließ sich nicht in zellfreien Kulturen vermehren. 1892 konnte Dimitri Iwanowski zeigen, daß die Tabakmosaikkrankheit durch ein ultrafiltrierbares ($< 0,1 \mu\text{m}$), deutlich unter Bakteriengröße liegendes Agens verursacht wird: dem Tabakmosaikvirus. Als erstes tierpathogenes Virus wurde 1898 von Friedrich Loeffler und Paul Frosch das Maul-und-Klauenseuche-Virus nachgewiesen. Im Jahre 1900 entdeckte eine Arbeitsgruppe der US-Armee unter Leitung von Walter Reed das humanpathogene Gelbfiebertvirus. Anfang des 20. Jahrhunderts konnten mit Hilfe der Ultrafiltration weitere Viren identifiziert werden, darunter das Tollwutvirus (1903), die Poliomyelitisviren (1909) und das Rous-Sarkom-Virus (1911). Von letzterem wußte man, daß es Tumorerkrankungen des Bindegewebes bei Hühnern induzieren kann.

Der Begriff Virus leitet sich von dem lateinischen Wort für Gift ab. Er wurde bis zu Beginn des 20. Jahrhunderts für infektiöse Erreger aller Art verwendet. Viren sind intrazelluläre Parasiten und benötigen für ihre Vermehrung die Wirtszelle einer Pflanze, eines Tieres oder eines Bakteriums. Nach diesem Kriterium wurden die Viren in den dreißiger Jahren in Pflanzenviren, tierische Viren und Bakteriophagen eingeteilt. 1935 gelang es Wendell Stanley, das Tabakmosaikvirus in kristalliner Form herzustellen. Kurz darauf machte die Erfindung des Elektronenmikroskops eine bis zu 300.000fache Vergrößerung von Objekten möglich. Damit konnte die oftmals ästhetische Symmetrie zahlreicher Viren sichtbar gemacht werden. 1944 konnten Oswald Avery, Maclyn McCarty und Colin McLeod die Nukleinsäuren als Komponente des genetischen Materials nachweisen. Noch vor der Entdeckung des DNA-Doppelhelix-Modells durch James Watson und Francis Crick konnten Alfred Hershey und Martha Chase 1952 zeigen, daß bei Infektionen mit T4-Phagen nur die DNA, nicht aber die Proteinhülle in die Bakterienzelle eindringt. Damit war bewiesen, daß Nukleinsäuren die Träger der genetischen Information sind.

Virusfamilie	Unterfamilie	Beispiele	Membranhülle	Partikelgröße Capsidform	Genom Art / Größe
Picornaviridae	Enterovirus, Rhinovirus, Cardiovirus, Aphthovirus, Hepatovirus	Poliovirus, Coxsackievirus, Schnupfenvirus, Mengovirus, Maul-und- Klauenseuche- Virus, Hepatitis A Virus	nein	28-30 nm Ikosaeder	ssRNA, linear, Positivstrang, 7200-8400 Basen
Flaviridae	Flavivirus, Pestivirus, Hepatitis C Virus	Gelbfiebervirus, FSME-Virus, Schweinepest- virus, Hepatitis C Virus	ja	40-50 nm Ikosaeder	ssRNA, linear, Positivstrang, 10000 Basen
Hepadnaviri- dae	Hepatitis B Virus	Hepatitis B Virus	ja	42 nm	zirkuläre, teilw. doppel- strängige DNA, 3000- 3300 Basen
Herpesviridae	α -Herpes- viren, β -Herpes- viren, γ -Herpes- viren	Herpes-simplex- Viren, Varicella- Zoster-Virus, Cytomegalie- virus, humanes Her- pesvirus 6, Epstein-Barr- Virus	ja	120-300 nm Ikosaeder	dsDNA, linear, 150.000- 200.000 Ba- sen

Tab. 4.1: Molekularbiologische Charakteristika einiger Virusfamilien mit Angabe ihrer typischen Vertreter

Heute sind chemische Zusammensetzung, Symmetrie und Struktur die Grundlagen für die Einteilung der Viren (Tab. 4.1). Ihre Größe reicht von 20 nm bei den Parvoviren bis zu 300 nm bei den Pokkenviren. Viruspartikel bestehen aus verschiedenen Grundelementen: Sie enthalten ein Genom aus RNA oder DNA. Je nach Virustyp können die Nukleinsäuren doppelsträngig, einzelsträngig, linear oder ringförmig vorliegen. Häufig ist das Genom mit viralen Proteinen komplexiert und liegt als Nucleocapsid vor. Andererseits kann das virale Genom von morphologisch unterscheidbaren Capsomeren umgeben sein, die das Capsid oder Core um die Erbanlagen bilden. Das Capsid ist bei einigen Virustypen von einer wei-

teren Hülle aus einer Lipiddoppelschicht umgeben, in die virale und zelluläre Proteine sowie zahlreiche Glykoproteine eingelagert sind. Virale Oberflächenkomponenten sind sehr stark exponiert und unterliegen einem Selektionsdruck durch das Immunsystem, weshalb sie sich durch eine hohe Variabilität auszeichnen. Viren können zelluläre Prozesse umsteuern und für den optimalen Ablauf ihrer eigenen Vermehrung modifizieren. Neben ihren eigenen Strukturproteinen codieren die Vireng Genome häufig auch für regulatorisch aktive Proteine wie Transaktivatoren oder Enzyme wie Proteasen oder Polymerasen.

Viren existieren in unterschiedlichen Zustandsformen: Im replikationsaktiven Zustand kann sich das Virus aktiv in einer Wirtszelle selbst replizieren. Nach der Infektion einer Wirtszelle können einige Virustypen in einen Latenzzustand übergehen. Hierzu integrieren sie ihre Erbinformation in das Wirtszellgenom oder verbleiben in extrachromosomaler Form als Plasmid in der infizierten Zelle. Zelluläre Prozesse oder äußere Einflüsse können die latent vorliegenden Genome wieder zur Herstellung infektiöser Viren reaktivieren.

Je nach Virustyp kann die Infektion für die Wirtszelle unterschiedliche Folgen haben:

- Die Wirtszelle wird zerstört und stirbt.
- Die Wirtszelle überlebt, produziert aber kontinuierlich geringe Mengen von Viren und ist damit chronisch infiziert.
- Die Wirtszelle überlebt und das virale Genom bleibt im latenten Zustand erhalten, ohne daß infektiöse Partikel gebildet werden.
- Die Wirtszelle wird immortalisiert und erhält die Fähigkeit zur kontinuierlichen Teilung. Dieser Prozeß kann zur Transformation einer Zelle zu einer Tumorzelle führen.

Viel diskutiert wird die Frage, ob Viren lebendig sind. Wie höhere Lebewesen bedienen sie sich eines gemeinsamen genetischen Codes, der die Information für ihre Entwicklung und Vermehrung speichert. Das ist Teil ihrer Überlebensstrategie, denn nur bei Verwendung des gleichen Codes und gleicher Signale haben sie in ihrer Wirtszelle eine Überlebenschance. Das läßt auf einen gemeinsamen Ursprung schließen. Viren können in einer Zelle ihre eigene Vermehrung in Gang setzen. Ihr genetischer Plan ist nach dem gleichen Muster niedergelegt wie bei allen Lebewesen. Viren reagieren auf Veränderungen ihrer Umwelt und unterliegen häufig einem starken Evolutionsdruck. Ob damit eine einfache Lebensform beschrieben wird oder eine komplexe Anordnung aus Nukleinsäuren und Proteinen, hängt davon ab, was man selbst als Leben betrachtet (Levine, 1991; Modrow, 1997).

4.2 Die Virushepatitiden

Virushepatitiden gehören weltweit zu den am häufigsten beim Menschen beobachteten Infektionskrankheiten. Man kennt heute mindestens sechs verschiedene virale Erreger, die chronologisch nach dem Zeitpunkt ihrer Entdeckung mit den Buchstaben A, B, C, D, E und G benannt werden. Während Hepatitis A (HA) und Hepatitis B (HB) die bekanntesten Vertreter repräsentieren, sind Kenntnisse über das Hepatitis C Virus (HCV), dem mit Abstand gefährlichsten Erreger, oft auch in Fachkreisen ungenügend. Hepatitis D, E und G spielen hingegen eine untergeordnete Rolle und treten nur sehr selten auf. Bei allen Virushepatitiden handelt es sich um verschiedene Formen von Leberentzündungen, die häufig ähnliche Symptome hervorrufen, aber zu unterschiedlichen Spätfolgen führen. Ein häufig auftretendes Symptom einer Hepatitis-erkrankung ist die Gelbsucht (Ikterus). Die gelbliche Färbung der Haut wird durch den Übertritt von Gallenbestandteilen wie Bilirubin ins Blut verursacht. Auftretende Spätfolgen können für den Infizierten eine Leberzirrhose oder die Bildung eines hepatozellulären Karzinoms bedeuten.

Die wissenschaftliche Erforschung der Virushepatitis begann in den dreißiger Jahren, als man erkannte, daß es zumindest zwei unterschiedliche Formen geben mußte. Eine Unterteilung wurde aufgrund der offensichtlichen Infektionswege getroffen. Die durch Exkremate und mangelnde Hygiene übertragene Form A wurde fortan auch als infektiöse oder epidemische Hepatitis bezeichnet. Die zweite Form B wurde über das Blut und Sexualkontakte übertragen und daher Serumhepatitis genannt. In den fünfziger Jahren konnten Fortschritte in der medizinischen Diagnostik erzielt werden. Durch die ersten Nachweisverfahren für Enzyme war es möglich, einen erhöhten Spiegel von Transaminasen im Blutserum nachzuweisen. Diese Enzyme werden von absterbenden Hepatozyten in das Blut freigesetzt. Mitte der sechziger Jahre gelang dem amerikanischen Mediziner B. Blumberg im Blut von Serumhepatitis-Patienten auf molekularer Ebene der Nachweis von HBV. Für diesen Durchbruch erhielt er 1976 den Nobelpreis für Medizin (Di Bisceglie, 2000). Obwohl man seither eine dritte Hepatitis-Form vermutete, die man „Non-A-Non-B“-Hepatitis nannte, dauerte es bis 1989, bis Michael Houghten und Kollegen von der Firma Chiron die Klonierung des Hepatitis C Virus aus dem Blut virusinfizierter Schimpansen gelang (Choo, 1989).

Gegen HA und HB kann man sich heute erfolgreich immunisieren lassen. Die aktive Immunisierung gegen HA erfolgt mit einem aus Zellkulturen isolierten, formalininaktivierten Hepatitis A-Antigen (HAAg). Das entsprechende Handelspräparat heißt Havrix[®].

Zur aktiven Immunisierung gegen HB wird ein Impfstoff eingesetzt, der das nicht infektiöse HBV-Oberflächen-Antigen (HBsAg) enthält. Seit 1986 wird dieses Antigen gentechnologisch hergestellt. Gentechnologisch hergestellte Handelspräparate sind Engerix[®]B und Gen H-B-Vax[®]. Gegen Hepatitis C ist bis heute weder eine Immunisierung noch eine zufriedenstellende Therapie möglich.

4.2.1 Hepatitis A

Das Hepatitis A Virus (HAV) gehört wie das Poliovirus zur Gruppe der Picorna-Viren. Die Viruspartikel haben eine Größe von 27 bis 28 nm, zeigen kubische Raumsymmetrie und sind aus 32 Capsomeren zusammengesetzt. Die Hülle des Virus enthält vier verschiedene Polypeptide und das virale Genom besteht aus linearer, einzelsträngiger RNA. Bislang ist nur ein Antigentyp (HAAg) bekannt. Das Virus wird auf fäkal-oralem Weg übertragen. Die Durchseuchungsraten in Europa zeigen ein deutliches Nord-Süd-Gefälle. Die wichtigsten Endemiegebiete für HAV sind die Mittelmeerländer, Afrika, Asien, Mittel- und Südamerika. Diagnostiziert werden kann das Virus durch den Nachweis des HAV im Stuhl oder durch IgM-Antikörper (Anti-HAV IgM) im Blut. Auf die Infektion folgt eine Inkubationszeit von 15 bis 40 Tagen. Zwei Wochen nachdem das HAV im Stuhl nachgewiesen werden kann, stellen sich erste Symptome ein und es kommt in einer heftigen Immunantwort zur Bildung von Antikörpern. Nach fünf bis sechs Wochen ist die Hepatitis mit lang anhaltender Immunität ausgeheilt. Eine spezifische Therapie gegen HAV ist nicht erforderlich, da die Krankheit meist harmloser Natur ist und nie zu einer chronischen Lebererkrankung führt (Abb, 1996).

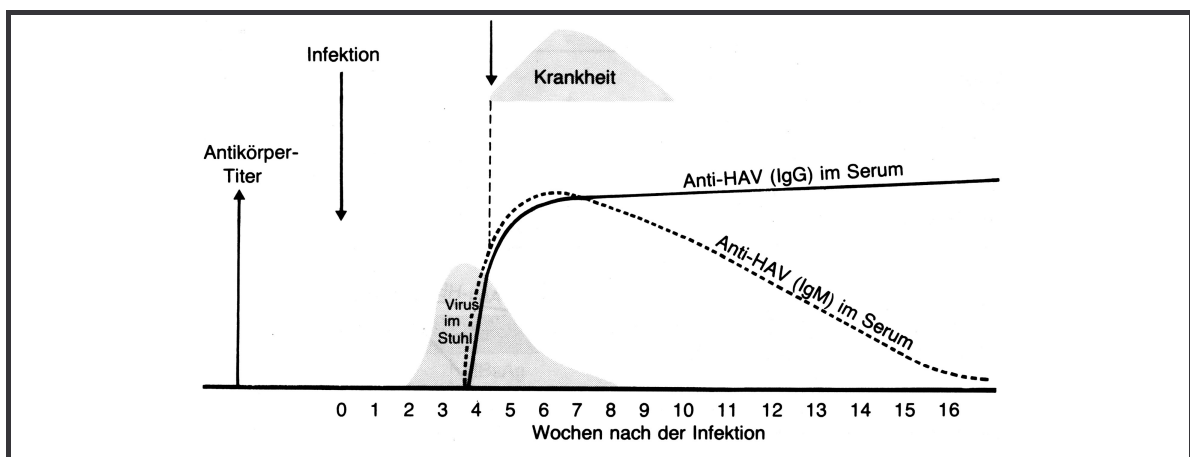


Abb. 4.1: Typischer Verlauf der Virusausscheidung und Bildung von spezifischen Antikörpern nach einer HAV-Infektion (Abb, 1996)

4.2.2 Hepatitis B

Das Hepatitis B Virus (HBV) gehört zur Gruppe der Hepadnaviren, der außerdem noch einige bei Tieren auftretende Erreger angehören. Das Virus hat einen Durchmesser von 42 nm und seine äußere Hülle wird vom Hepatitis B-Oberflächen-Antigen (HBsAg) gebildet. Das Antigen (HBsAg) allein ist nicht infektiös und wird daher zur aktiven Immunisierung eingesetzt. Ein Kernpartikel enthält die Erbinformationen in Form doppelsträngiger DNA und das Kern-Antigen (HBcAg). Assoziiert mit dem Kernpartikel ist außerdem das Hepatitis B-e-Antigen (HBeAg) und eine DNA abhängige DNA-Polymerase. Die Übertragung des HBV erfolgt durch Kontamination mit Blut oder nicht ausreichend virusinaktivierbaren Blutprodukten. Das Virus wird aber nahezu in allen Körpersekreten nachgewiesen. Die perinatale Übertragung von HBV von Müttern auf ihre Kinder ist in Afrika und Südostasien von Brisanz. Hier findet man folglich eine Trägerrate des Hepatitis B-Oberflächen-Antigens (HBsAg) von bis zu 30 %, während in den Industrieländern die Rate unter 1 % beträgt. Die Inkubationszeit bis zum Auftreten erster Krankheitssymptome beträgt etwa zwei Monate. Parallel steigt der Spiegel der Antigene und eine heftige Immunantwort setzt ein. Nach sechs Wochen ist die Krankheit bei den meisten Infizierten ausgeheilt. Bei etwa 10 % bis 15 % kommt es jedoch zur Chronifizierung, was durch einen hohen HBsAg-Titer über mehr als sechs Wochen während der akuten Phase prognostiziert werden kann. 2 % der chronisch HBV-Infizierten sterben als Spätkomplikation an Leberzirrhose oder an HB-assoziierten Leberkarzinomen. Eine eindeutige Korrelation zwischen einem langanhaltenden HBsAg-Trägerstatus und der Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen konnte in Entwicklungsländern nachgewiesen werden. Zur Prävention wurde im September 1994 die Bestimmung von HBsAg in die Mutterschaftsrichtlinien aufgenommen (Abb, 1996).

4.2.3 Hepatitis D und E

Das Hepatitis-Delta Virus (HDV) ist ein inkomplettes, replikationsdefektes Virus, das nur bei gleichzeitiger HBV-Infektion vorkommt. Zu seiner Vermehrung ist es auf das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen (HBsAg) angewiesen. Immunität gegen das HBV vermittelt deshalb auch Schutz vor HD. Es ist ein sphärisches Gebilde von 35 bis 37 nm Durchmesser. Das von HBsAg umschlossene Kernprotein umschließt eine einzelsträngige RNA. Das Hepatitis D Virus wird auf ähnlichen Wegen wie das Hepatitis B Virus übertragen.

Das Hepatitis E Virus (HEV) ist ein hüllenloses RNA Virus mit ikosaedrischer Symmetrie, das wegen seiner Eigenschaften vorläufig der Gruppe der Caliciviren zugeordnet wird. Die Viruspartikel besitzen eine Größe von 32 bis 34 nm. Das Virusgenom besteht aus linearer, einzelsträngiger RNA. Das Virus tritt in zwei Formen unterschiedlicher geographischer Verbreitung auf. Ähnlich wie das HAV wird das HEV auf fäkal-oralem Wege übertragen. Es scheint die Hauptursache der enteral übertragenen Form der „Non-A-Non-B“-Hepatitis zu sein. Der Krankheitsverlauf ähnelt dem der HAV-Infektion und endet nicht mit einer Chronifizierung. Auffallend ist die hohe Letalität von 15 % bis 30 % bei schwangeren HEV-Patientinnen, für die es bislang keine Erklärung gibt (Abb, 1996).

Es wird vermutet, daß die Familie der Hepatitisviren bald durch neue Vertreter erweitert wird. Für das Hepatitis G Virus (HGV), das ein den Flaviviren ähnliches Genom besitzt, werden zur Zeit serologische Nachweisverfahren entwickelt. Trotz der Vielfalt an unterschiedlichen Erregern sind die Formen HA, HB und HC gesundheitspolitisch am bedeutendsten. Da man sich gegen HA und HB durch Impfung schützen kann, stellt der Kampf gegen das Hepatitis C Virus zur Zeit die größte Herausforderung dar.

4.3 Hepatitis C

Das Hepatitis C Virus (HCV) gehört zu Gruppe der Flaviviren, der u.a. auch das Gelbfiebervirus zugeschrieben wird. Mit seiner erfolgreichen Klonierung 1989 war die langjährige Suche nach dem Erreger der parenteral übertragenen „Non-A-Non-B“-Hepatitis beendet (Choo, 1989). Die Arbeitsgruppe um Michael Houghton isolierte die Nukleinsäuren aus Zellen eines mit „Non-A-Non-B“-Hepatitis infizierten Schimpansen. Aus dem Nukleinsäurepool wurde eine Bibliothek komplementärer cDNA im Bakteriophagen λ gt11 gewonnen, die in *E. coli* eingeschleust wurde. Ein einziger cDNA-Klon löste mit Serum eines „Non-A-Non-B“-Hepatitis-Infizierten eine Immunreaktion aus (Choo, 1989).

Seither konnte die Struktur des Virus aufgeklärt und eine Unterteilung in mindestens sechs Genotypen getroffen werden. Eine interne, ribosomale Angriffsstelle (IRES) ist für die Replikation des HCV essentiell und stellt somit einen Angriffspunkt für Therapeutika dar. Nicht zuletzt hat die molekularbiologische Charakterisierung zur Entwicklung spezifischer Antikörpernachweisverfahren geführt, die die Verbreitung von Hepatitis C durch verseuchte Blutkonserven oder Blutprodukte auf ein Minimum reduzieren.

Zwei Probleme erschweren jedoch bis heute die Forschungsarbeiten zum besseren Verständnis des viralen Vermehrungszyklus und die Entwicklung antiviraler Wirkstoffe. Zum einen ist es bislang nicht gelungen, das Virus in Zellkultur zuverlässig zu vermehren. Zum anderen ist das einzige geeignete Tiermodell für HCV-Studien bis heute der Schimpanse. Erst 1999 ist es der Gruppe von Bartenschlager gelungen, ein Zellkultursystem zu entwickeln, das nach Transfektion eines geklonten, viralen HCV-Consensus-Genoms in eine humane Leberzelllinie Teile der HCV-RNA effektiv replizieren konnte (Lohmann, 1999).

4.3.1 Struktur und Replikation des HCV

Das Hepatitis C Virus hat nur wenig Gemeinsamkeiten mit den bekannteren Vertretern der Virushepatitiden A und B. Es gehört zur Gruppe der Flaviviren und sein Genom besteht aus einzelsträngiger-(+)-Strang-RNA mit etwa 9400 Nukleotiden. Die Sequenz enthält einen einzigen offenen Leserahmen (engl.: open reading frame, ORF), der sich über das gesamte Genom erstreckt. Der translatierte Polyprotein-Precursor aus 3010 bis 3033 Aminosäuren wird durch zelluläre und viruscodierte Proteasen in seine funktionellen Einheiten gespalten.

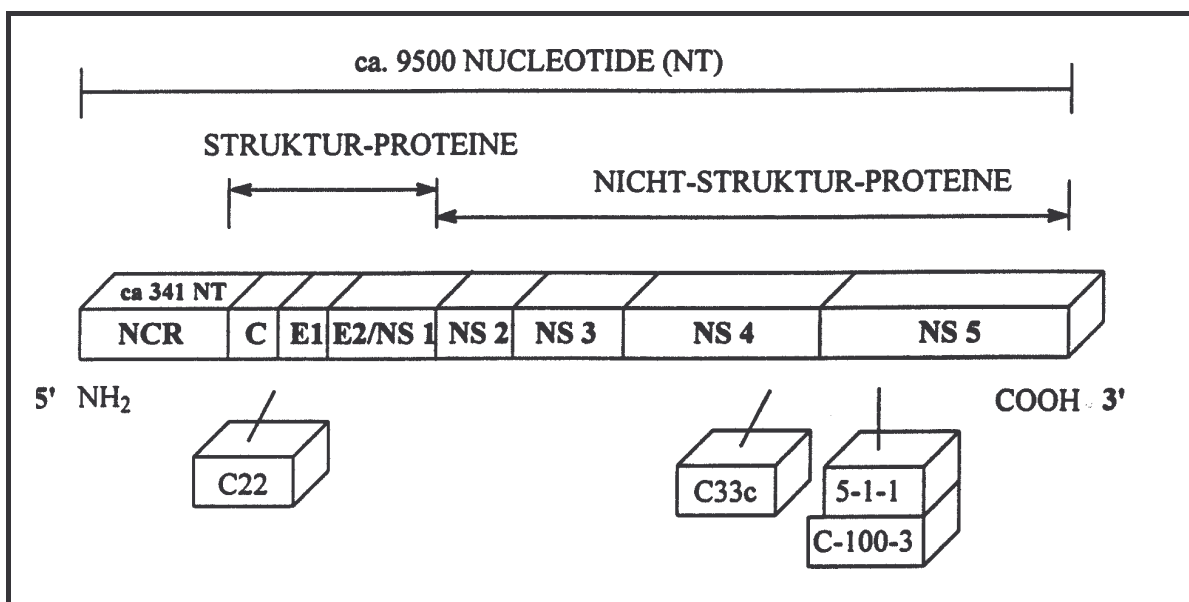


Abb. 4.2: Schematischer Aufbau des RNA-Genoms des Hepatitis C Virus: NCR = „non coding region“; C = „core“; E = „envelope“; NS = NichtStruktur-Proteine

Am 3'-Ende des Genoms findet man eine nicht codierende Region (engl.: non coding region, NCR). Dabei handelt es sich um eine Poly-(rA)-Sequenz (Choo, 1991; Houghton,

1991; van Doorn, 1994) oder eine Poly-(rU)-Sequenz (Takamizawa, 1991), an die eine hochkonservierte Sequenz aus 98 bis 100 Nukleotiden angehängt ist (Yamada, 1996). Die 3'-NCR spielt vermutlich eine essentielle Rolle bei der HCV-Replikation (Yamada, 1996; Dash, 1997; Zhang, 1999). Das multifunktionale NichtStruktur-Protein NS5 ist eine RNA abhängige RNA-Polymerase, die für die Replikation des HCV-Genoms zuständig ist (Houghton, 1991). Die Replikation des Hepatitis C Virus verläuft über die Kopie genomischer (+)-Strang-RNA in komplementäre (-)-Strang-RNA, die als Matrize für die Replikation dient. Die Transkriptionsgenauigkeit der HCV-Polymerase ist niedrig und führt zu einer hohen Genomvariabilität (Quasispezies). Außer in der Leber vermag sich das HCV auch extrahepatisch beispielsweise in Leukozyten oder B- und T-Lymphozyten zu vermehren (Müller, 1993). Analog zu anderen RNA-Viren liegt die Mutationsrate des HCV bei etwa 2×10^{-3} Mutationen pro Nukleotidposition pro Jahr (Zeuzem, 1995).

Über die Rolle des NichtStruktur-Proteins NS4 ist bislang wenig bekannt. Das NS3 übt die Funktion einer Serin-Protease aus und ist für die Spaltung des Protein Precursors an den Stellen NS3-NS4a, NS4a-NS4b, NS4b-NS5a und NS5a-NS5b verantwortlich (van Doorn, 1994). Das Prozessieren des Polyproteins an den Stellen NS2-NS3 wird durch eine Zn^{2+} -Metalloproteinase (NS2) katalysiert, während die Spaltung am N-Terminus von E1, E2 und möglicherweise NS2 durch zelluläre Signalproteasen erfolgt. Außerdem verfügt das NS3 über eine Helikaseaktivität. Das Core-, das E1- und das E2/NS2-Protein sind die drei strukturgebenden Proteine des HCV, wobei die letzteren stark glykosyliert vorliegen (Takamizawa, 1991). Die Hüllproteine E1 und E2 tragen außerdem hypervariable Erkennungsequenzen für Antikörper, die den Aufbau einer protektiven Immunität erschweren.

Gen	Funktion	AS-Position	Name	Spaltung (N-Terminus)
C	Capsid	1-191	p22	-
E1	Envelope	192-383	gp33	Signalase
E2/NS1	Envelope	384-809	gp70	Signalase
NS2	Metalloproteinase	810-1009	p23	Signalase
NS3	Serinprotease / Helikase	1010-1619	p72	Metalloproteinase
NS4 (a+b)	?	1620-2016	p10	NS3-Protease
			p27 / p70	NS3-Protease
NS5 (a+b)	Replikase / Polymerase	2017-3033	p58	NS3-Protease
			p70	NS3-Protease

Tab. 4.2: Hepatitis C Virus-RNA codierte Proteine (van Doorn, 1994)

Am 5'-Ende des HCV-Genoms befindet sich wie am 3'-Ende eine nicht codierende Region (NCR). Die NCR hat eine Länge von 324 bis 341 Nukleotiden und ist hochkonserviert unter verschiedenen HCV-Isolaten. Innerhalb des gesamten HCV-Genoms weist die 5'-NCR die niedrigste Genomvariabilität auf. In einer Studie von Bukh *et al.* mit 44 HCV-Isolaten aus allen Erdteilen besaßen die unterschiedlichsten Isolate immerhin noch 90,1 % Übereinstimmung der Nukleotide in der 5'-NCR. Von 282 untersuchten Nukleotidpositionen variierten lediglich 45 (16 %) (Bukh, 1992). Die hohe Konservierung hängt unmittelbar mit der Funktion der NCR zusammen: Sie dient dem Virus als interne, ribosomale Angriffsstelle (engl.: internal ribosomal entry site, IRES) für die Synthese des Polyprotein-Precursors (Tsukiyama-Kohara, 1992). Mit Hilfe von Mutations- und Deletionsanalysen konnte gezeigt werden, daß nicht hauptsächlich die Sequenz (Primärstruktur), sondern Sekundär- und Tertiärstrukturelemente für die Funktion der IRES essentiell sind (Wang, 1993; Wang, 1994; Reynolds, 1995; Rijnbrand, 1995; Wang, 1995a; Wang, 1995b).

Zahlreiche Sekundärstrukturmodelle der 5'-NCR des HCV wurden gefunden und immer weiter verfeinert. Eine erste Struktur konnte durch einen Vergleich mit der NCR von Pestiviren publiziert werden. Durch Verdau der 5'-NCR mit spezifischen einzel- und doppelsträngigen RNasen und Untersuchung der Fragmente konnten Informationen über einzel- und doppelsträngige Regionen gewonnen werden (Brown, 1992). Wiederum eine Mutationsanalyse führte zu dem Ergebnis, daß ein „RNA-Pseudoknot“ ein notwendiges Strukturelement für die Funktion der IRES darstellt (Wang, 1995a). Eine weitere Studie kam zu dem Ergebnis, daß auch einige Nukleotide stromabwärts des AUG-Startcodons für die interne Initiierung der Translation erforderlich sind (Honda, 1996).

Das Sekundärstrukturmodell von Honda *et al.* ist in Abb. 4.3 abgebildet und diente während dieser Arbeit als Strukturvorlage. Bei der Zuhilfenahme zweidimensionaler Sekundärstrukturmodelle zur Vorhersage von Angriffsstellen für Antisense Oligonukleotide oder Enzyme darf man nicht vergessen, daß man allenfalls eine grobe Vorstellung von der realen räumlichen Ausdehnung eines gefalteten RNA-Moleküls erhält. Das von Honda *et al.* veröffentlichte Modell ist gekennzeichnet durch die Ausbildung von vier Domänen (I, II, III, IV). Die Domänen sind stark gefaltet und zeigen eine Reihe charakteristischer RNA-Strukturelemente wie Haarnadelschleifen (engl.: hairpins), „bulges“ oder interne Schleifen (siehe Abb. 4.3). Dabei kommt der Domäne IV eine besondere Bedeutung zu, da sie das Startcodon AUG für die Proteinbiosynthese trägt, das im Heptaloop einer Hairpinstruktur lokalisiert ist. Eine Antisense-Studie verbunden mit einer Schmelzpunktanalyse dieses Strukturelements ist in Kapitel 9.2.3 beschrieben.

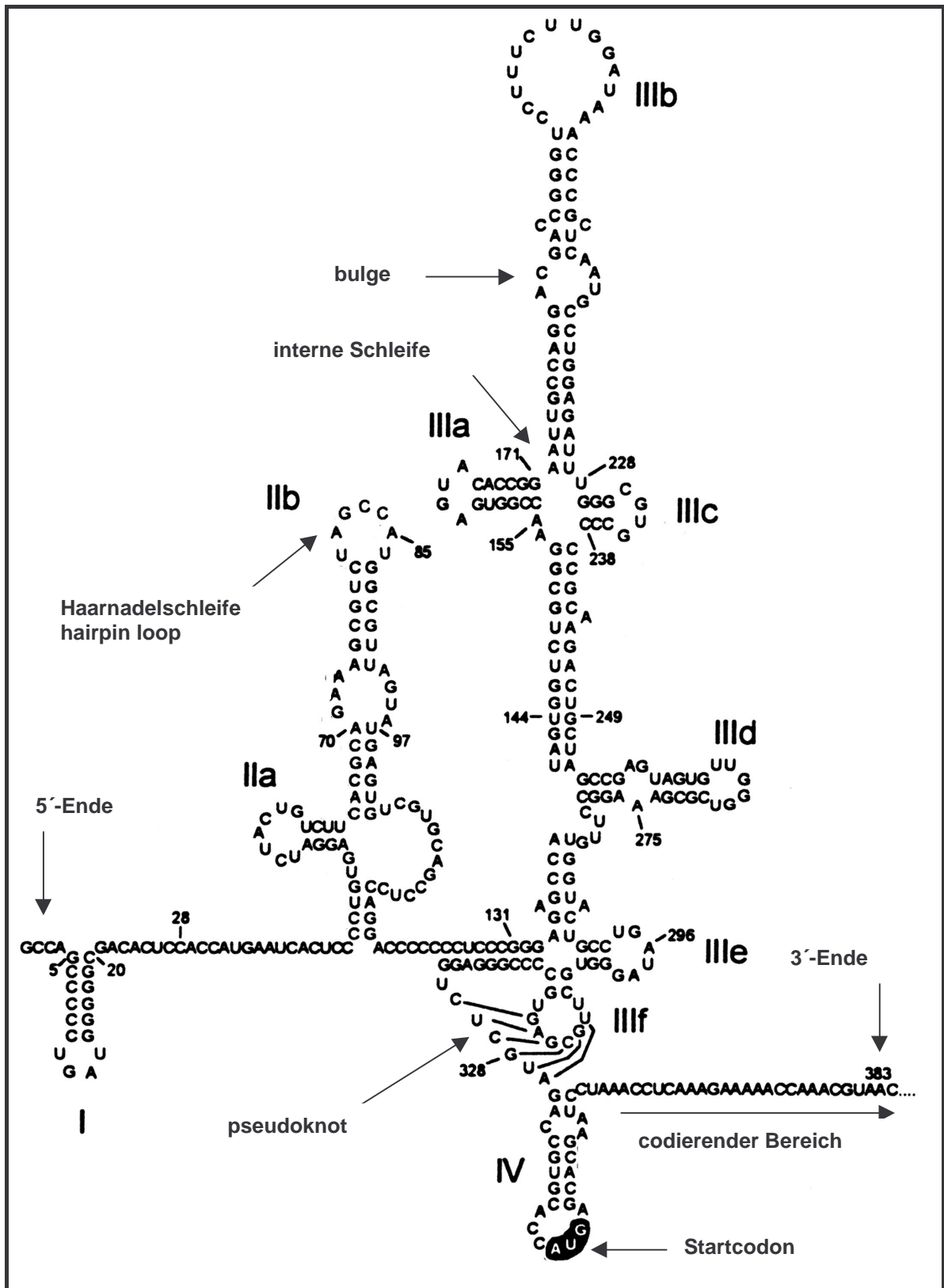


Abb. 4.3: Sekundärstrukturmodell der 5'-nicht codierenden Region (NCR) des Hepatitis C Virus nach Honda et al. (Honda, 1996); Genotyp HCV-1a

4.3.2 HCV-Genotypen

Die Einteilung des Hepatitis C Virus in sechs Gruppen von Genotypen und verschiedene Subtypen erfolgte durch eine phylogenetische Analyse des HCV-Genoms im Bereich der Consensus-Sequenz der NS5-Region. Wie bereits erwähnt, codiert dieses Gen die RNA abhängige RNA-Polymerase des HCV. Die Einteilung erfolgt nach folgenden Regeln: Eine Sequenzhomologie von weniger als 72 % führt zur Einteilung neuer Genotypen. Ein neuer Subtyp innerhalb eines Genotyps wird bei Homologien zwischen 75 % und 86 % benannt (Simmonds, 1993; Di Bisceglie, 2000). So zählen die Isolate HCV-1 (Choo, 1989) und HCV-H mit einer genomischen Sequenzidentität von 95,4 % gleichermaßen zum Genotyp 1a. Aufgrund der hohen Genomvariabilität des HCV werden einzelne Isolate mit Buchstaben- und Zahlencodes gekennzeichnet.

Zum Genotyp 1 und 2 gehören jeweils die Subtypen a, b und c. Vom Genotyp 3 sind die Subtypen a und b sowie von den Genotypen 4, 5 und 6 nur je ein Subtyp bekannt. Eine solche Einteilung kann nur provisorisch gelten, da jederzeit neue HCV-Isolate hinzugefügt werden können. Die HCV-Genotypen 1 und 2 treten weltweit auf. Der Genotyp 3 wurde bislang in Europa, Nordamerika, Thailand und Indien, jedoch nicht in Japan gefunden. Genotyp 4 findet man vorwiegend in mittleren Osten. Die Genotypen 5 und 6 wurden hauptsächlich in Südafrika und Hong Kong isoliert (Simmonds, 1993). In der Bundesrepublik Deutschland findet man folgende Prävalenz für die Genotypen: HCV-1a (23 %); HCV-1b (51 %); HCV-2a (6 %); HCV-2b (5 %); HCV-3a (15 %). Die exakte Identifikation der HCV-Geno- und Subtypen spielt sowohl für den klinischen Verlauf als auch für den Erfolg einer Interferon α Therapie eine wichtige Rolle (Zeuzem, 1995).

Wie bereits erwähnt, findet man in der 5'-NCR eine sehr niedrige Genomvariabilität. Eine Einteilung in verschiedene Genotypen durch Genomanalysen der 5'-NCR ist deshalb ungleich schwerer, aber möglich (Simmonds, 1993). Die HCV-Subtypen 1a, 1b und 1c besitzen nahezu identische 5'-NCR, ebenso verhält es sich mit den Subtypen 2a und 2c. In den 5'-NCR aller HCV-Genotypen finden sich neben einer Genomidentität von stets über 90 % auch Abschnitte von bis zu 50 Nukleotiden, die bei allen Genotypen identisch sind (Bukh, 1992). Die außergewöhnlich hohe Konservierung der 5'-NCR unter den bisher gefundenen sechs Genotypen und seine Funktion als IRES für den Translationsstart machen diesem Bereich zu einem vielversprechenden „target“ für einen Antisense-Ansatz.

4.3.3 Prävalenz, Übertragung und medizinische Diagnostik des HCV

Schätzungen zufolge geht man aktuell von etwa 170 Millionen HCV-Infizierten weltweit aus. Das entspricht dem vierfachen von Personen, die schätzungsweise mit dem HI-Virus infiziert sind. In den kommenden Jahren wird in den Vereinigten Staaten die Zahl der Todesopfer durch HCV-bedingte Lebererkrankungen die der HIV-Opfer übersteigen (Cohen, 1999). Die 1990 eingeführte serologische Untersuchung von Spenderblut auf HCV-Antikörper hat die Ausbreitung des Virus deutlich eingeschränkt. Die Zahl der neu Infizierten sank in den Vereinigten Staaten von 230.000 pro Jahr in den achtziger Jahren auf ca. 36.000 im Jahr 1996. Es darf dabei nicht übersehen werden, daß die meisten der HCV-Infizierten aus den siebziger und achtziger Jahren noch leben und schon bald die Zahl der Lebertransplantationen als letztem Ausweg drastisch ansteigen wird. In den Vereinigten Staaten schätzt man, daß etwa 1,8 % der Bevölkerung das Virus beherbergen. In der Bundesrepublik Deutschland rechnet man mit ca. 800.000 Infizierten, was ungefähr 1,0 % der Bevölkerung entspricht (Cohen, 1999). Die Weltkarte (Abb. 4.4) zeigt, daß die HCV Prävalenz in Afrika, Südamerika und Südostasien besonders ausgeprägt ist.

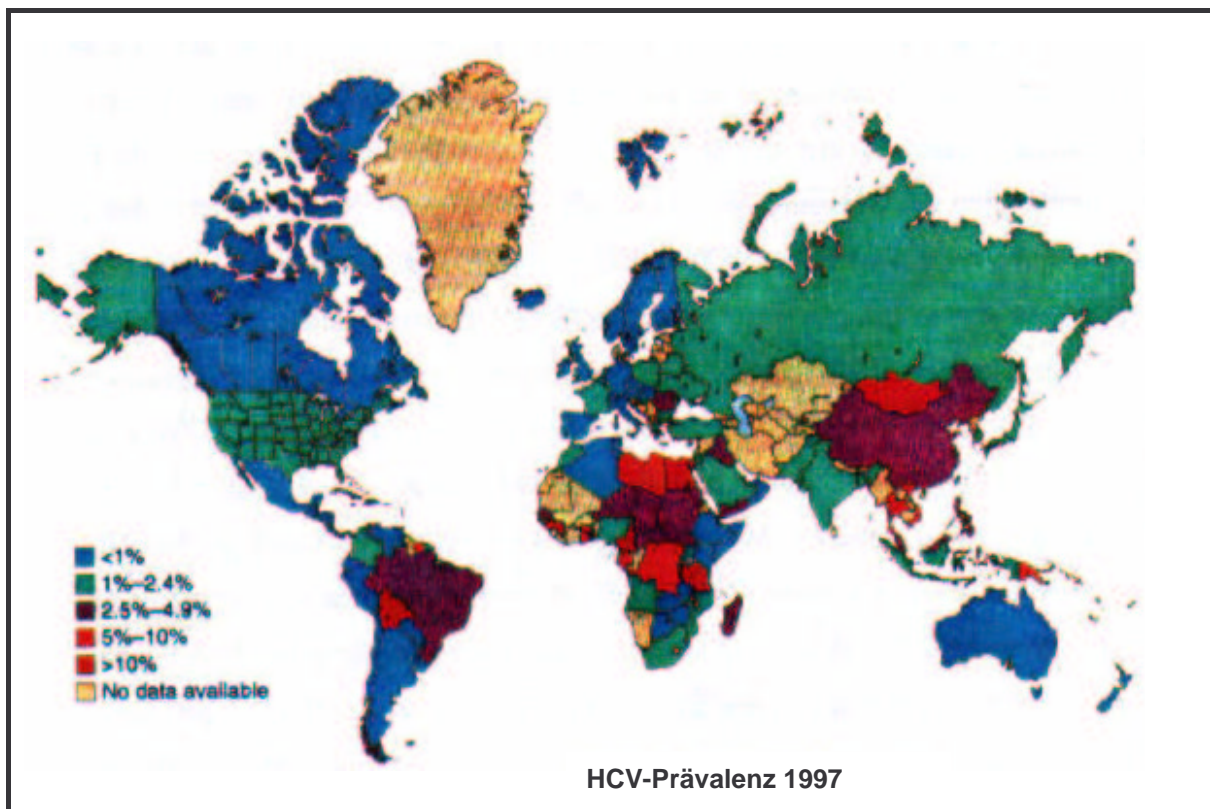


Abb. 4.4: HCV-Prävalenz 1997 (Cohen, 1999)

Der Hauptübertragungsweg des HCV ist der direkte Blut-Blut Kontakt. Da die Gefahr einer Posttransfusionshepatitis C durch verseuchte Plasmaprodukte (Gerinnungsfaktoren, Immunglobuline) oder Blutkonserven seit 1990 deutlich verringert werden konnte, spielen heute andere Übertragungswege eine wichtige Rolle. Die Mehrfachverwendung von Injektionsnadeln macht Drogenabhängige zu einer Hauptrisikogruppe. Man schätzt, daß bis zu 80 % der Drogenabhängigen mit dem HCV infiziert sind. Besondere Risikogruppen sind Patienten mit Hämophilie und chronische Dialysepatienten. 10 % bis 40 % der Dialysepatienten und bis zu 90 % der „Bluter“, die vor Einführung serologischer Tests Blutprodukte erhielten, sind mit dem HCV infiziert (Di Bisceglie, 2000). Medizinisches Personal, insbesondere Zahnärzte, unterliegen ebenfalls einem erhöhten Infektionsrisiko (Hofmann, 1997). Aber auch nicht fachgerecht ausgeführte Tätowierungen oder Piercing können zu einer HCV-Infektion führen. Die Übertragung des HCV durch Sexualkontakte ist im Vergleich zum HIV deutlich seltener. Man nimmt an, daß ca. 10 % der HCV-Infektionen auf diese Weise zustande kommen (Cohen, 1999). Die Gefahr der Übertragung von der Mutter auf ihr Kind ist mit ca. 6 % ebenfalls niedrig. Schwangerschaft und Kindesentwicklung werden durch eine Infektion nicht beeinflusst.

Der medizinischen Diagnose einer HCV-Infektion dienen serologische Assays sowie der Nachweis von Antikörpern oder viraler HCV-RNA. Eine Kombination dieser Methoden ist erforderlich, um das Virus einwandfrei zu typisieren und dem Infizierten eine bestmögliche Therapie zu ermöglichen. Das erste indirekte Nachweisverfahren für HC war eine Kombination aus Messung des Alanin-Aminotransferase Spiegels verbunden mit einem Screening nach dem Hepatitis B Antikörper (Anti-HBc). Erhöhte Aminotransferase-Spiegel allein deuten auf eine akute oder chronische Leberentzündung hin. Der gleichzeitige fehlende Nachweis von Hepatitis B Antikörpern macht eine HCV-Infektion wahrscheinlich. Der erste direkte Nachweis von Anti-HCV mit Hilfe eines ELISA gelang mit dem Protein 5-1-1 (Choo, 1989) und mit dem rekombinanten c100-3 Protein. Diese Assays der ersten Generation besaßen eine begrenzte Empfindlichkeit und niedrige Spezifität. Mit den Assays der zweiten Generation wurden gleichzeitig mehrere rekombinante Antigene gescreent. Dabei wurden sowohl NichtStruktur- als auch Struktur-gebende Antigene inkorporiert. Die Assays der dritten Generation sind in Europa seit 1993 verfügbar und weisen erhöhte Empfindlichkeiten und verbesserte Spezifität auf. Dadurch läßt sich die Infektion auch deutlich eher nachweisen. Das aktuellste ELISA (EIA 3.0) benutzt drei rekombinante Antigene von verschiedenen Regionen des HCV-Genoms. Mit einer Wahrscheinlichkeit

>99,8 % können auf diese Weise verseuchte Blutspenden identifiziert werden (Conry-Cantilena, 1997).

Neben dem immunologischen Antikörpernachweis wird auch die HCV-RNA mit molekularen Methoden detektiert und quantifiziert. Dies geschieht hauptsächlich mit Hilfe der RT-PCR. Der Nachweis von HCV-RNA ermöglicht eine Quantifizierung, die Aussagen über Verlauf und Entwicklung der Infektion zuläßt. Die für eine Behandlung angezeigte Genotypisierung der RNA gelingt durch Amplifikation und Sequenzierung der HCV-RNA (Abb, 1996). Eine billigere Methode ist die Hybridisierung von mit RT-PCR amplifizierter RNA mit Genotyp-spezifischen Oligonukleotid-Proben (Conry-Cantilena, 1997). Die wichtigste Aufgabe für die Zukunft der Diagnostik von HCV ist eine weitere Verfeinerung der Antikörperassays sowie eine bislang nicht erfolgte Standardisierung der molekularen Methoden für den Nachweis von HCV-RNA.

4.3.4 Vermehrungszyklus des HCV und Krankheitsverlauf

Die vom Hepatitis C Virus bevorzugten Wirtszellen sind Leberzellen (Hepatocyten). Auch Leukozyten und Lymphozyten scheinen geeignete Wirte zu sein, wenngleich in sehr geringem Maße. Das Virus erkennt mit Hilfe des viralen Hüllproteins E2 spezifische Zellrezeptoren und wird durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle eingeschleust.

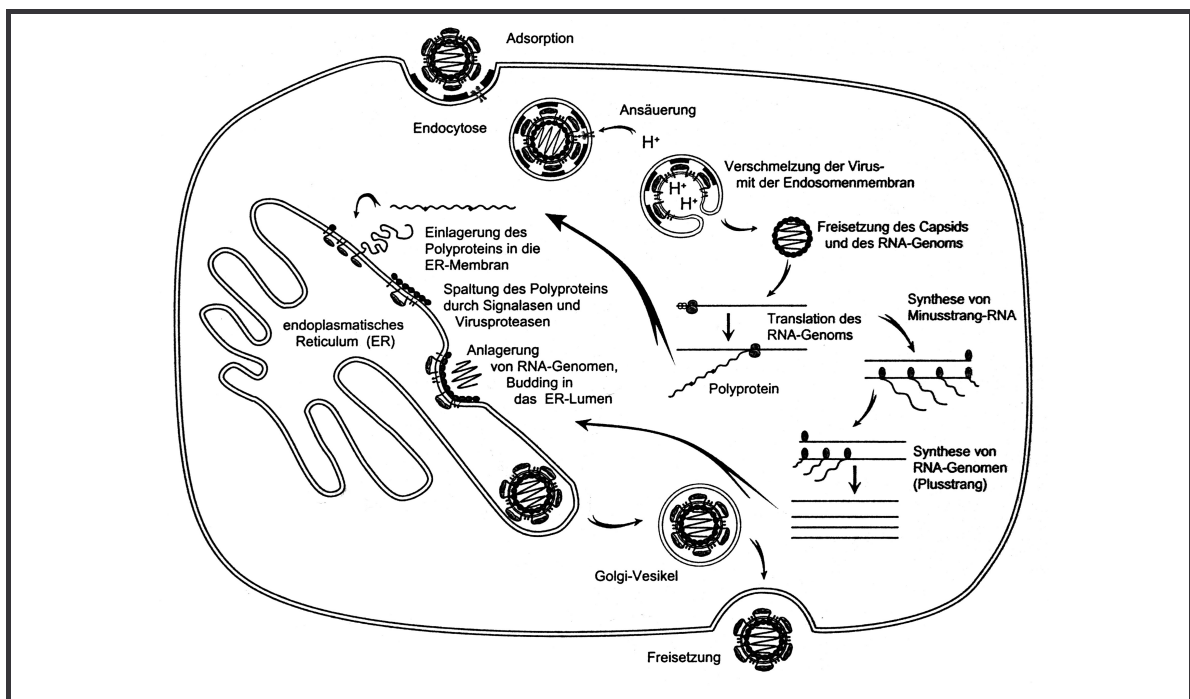


Abb. 4.5: Vermehrungszyklus der Flaviviren am Beispiel des FSME-Virus (Modrow, 1997)

Im Zellinneren legt das HCV seine Lipid- und Proteinhülle ab und die genomische RNA gelangt ins Cytoplasma. Die (+)-Strang-RNA des HCV wird direkt an den Ribosomen zu einem Polyprotein-Precursor translatiert, der durch verschiedene Proteasen in die viralen Proteine gespalten wird. Die RNA abhängige RNA-Polymerase vervielfältigt das virale Genom durch Übersetzung der (+)-Strang-RNA in komplementäre (-)-Strang-RNA, die dann wiederum als Matrize für die Synthese von (+)-Strang-RNA dient. Am Golgi-Apparat der Wirtszelle werden die Strukturproteine und die genomische RNA des HCV zu Virusvorläufern zusammengesetzt. Die Viruspartikel werden in Golgi-Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert und reife Viren werden wieder freigesetzt (Abb. 4.5).

Der Krankheitsverlauf nach einer HCV-Infektion kann sehr unterschiedlich sein. Bis zu 25 % der Infizierten eliminieren das Virus nach der Infektion. Bei den verbleibenden 75 % kommt es zu einer Chronifizierung. Bis zu 20 % der chronisch Infizierten entwickeln eine Leberzirrhose, die sich bei bis zu 5 % der chronisch Infizierten zu einem hepatzellulären Karzinom ausweitet (Saito, 1990; Cohen, 1999). Die HCV-RNA kann schon recht bald nach einer Infektion detektiert werden. Sechs bis acht Wochen nach einer HCV-Infektion steigt der Spiegel der Alanin-Aminotransferase stark an und es können Symptome einer Gelbsucht auftreten. Nach etwa zehn Wochen lassen sich IgG Antikörper (Anti-HCV IgG) immunologisch nachweisen (Conry-Cantelina, 1997). Im Laufe der Jahre kann die chronische Infektion zu einer Aktivierung der Kupfferschen Sternzellen in der Leber führen. Diese geben verstärkt Kollagene ab, wodurch der Bindegewebsanteil der Leber ansteigt. Eine solche Leberfibrose kann bei weiterem Fortschreiten zu einer Zirrhose führen. Dieser Prozeß ist aus medizinischer Sicht bis heute irreversibel (Di Bisceglie, 2000). Der Zeitraum für die Entwicklung einer Leberzirrhose liegt zwischen 15 und 30 Jahren nach einer Infektion. Bei chronisch Infizierten kann man über Jahre hinweg einen relativ konstanten Spiegel an HCV-RNA bestimmen. Ebenso verhält es sich mit den IgG Antikörpern (Anti-HCV IgG) ab dem sechsten Monat nach einer Infektion. Der Spiegel der Alanin-Aminotransferase hingegen unterliegt periodischen Schwankungen. Im Stadium der akuten Gelbsucht steigt er stark an, sinkt aber dann periodisch bis nahe an den Normalwert ab (Abb. 4.6). Eine Analyse des Alanin-Aminotransferase-Spiegels allein kann deshalb nicht zur Diagnose einer HCV-Infektion herangezogen werden (Conry-Cantelina, 1997). Man geht davon aus, daß nur etwa jeder Achte überhaupt von seiner HCV-Infektion Kenntnis hat. Viele Patienten, die lange nach einer unbemerkten Infektion die Diagnose ereilt, können sich nicht erklären, wie und wann sie infiziert worden sind. Einige können sich möglicherweise an eine lang zurückliegende, schwache Gelbsucht erinnern, aber wei-

tere Krankheitssymptome sind nie aufgetreten. Die Unkenntnis zahlreicher HCV-Infizierter stellt eine große Gefahr dar, da dieser Personenkreis nicht nur Träger, sondern auch potentieller Überträger des HCV ist.

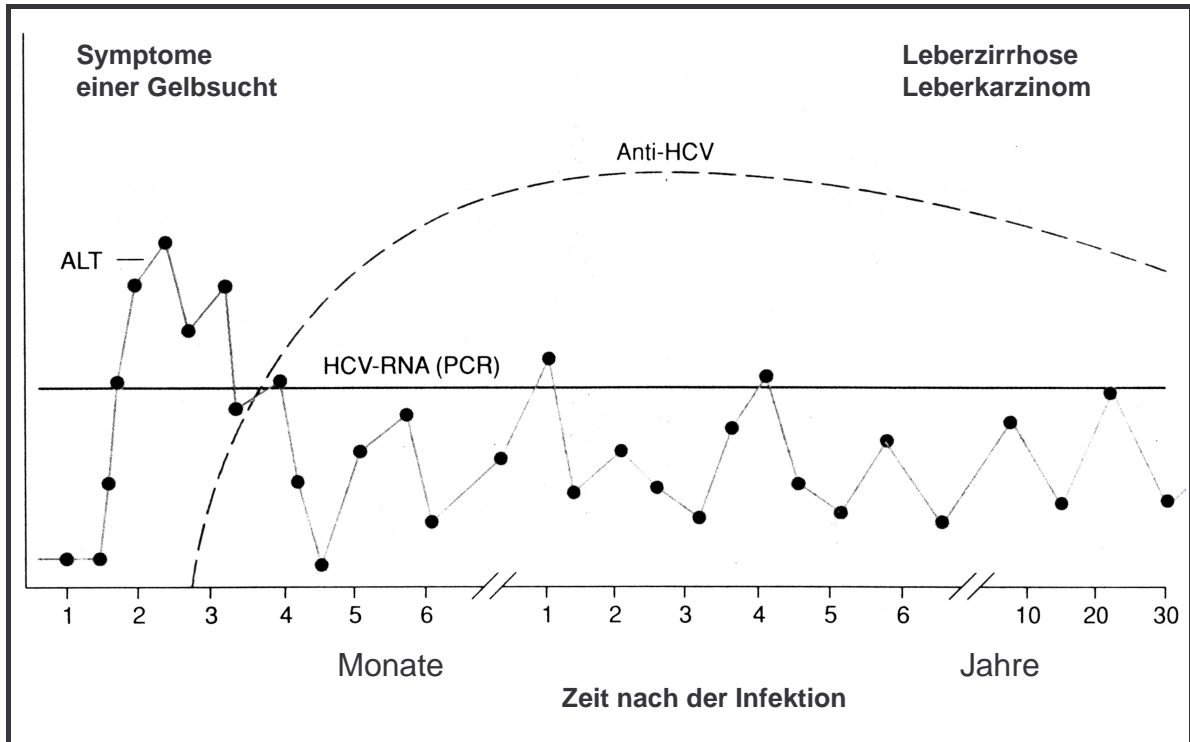


Abb. 4.6: Klinischer, serologischer und virologischer Verlauf einer Hepatitis C Virus Infektion (Conry-Cantilena, 1997)

4.3.5 Immunabwehr, antivirale Wirkstoffe und Therapien gegen HCV

Die Mechanismen der Immunabwehr, mit denen ein Organismus Virusinfektionen bekämpft, lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Zum einen lösen eingedrungene, als fremd erkannte Erreger eine unspezifische, nichtadaptative Immunreaktion aus. Die Immunreaktion wird aktiv, sobald ein Virus die äußeren Schutzschranken des Körpers überwunden hat. An dieser Form der Immunabwehr sind vor allem die Leukozyten beteiligt, die sich in Granulozyten und Monozyten aufteilen. Letztere können rasch zu Makrophagen differenzieren. Körperfremdes Material wird durch Phagozytose eliminiert. Zur unspezifischen Immunantwort zählen auch die natürlichen Killerzellen, die bereits virusinfizierte Zellen töten können. Außerdem spielen lösliche Proteine, sogenannte Akutphaseproteine, bei der Reaktion des Körpers auf Infektionen, Entzündungen oder Gewebeerkrankungen eine wichtige Rolle. Auf die Bedeutung der Interferone wird noch genauer eingegangen. Das Komplementsystem stellt die Verbindung zwischen unspezifischer und spezifischer Im-

munantwort her. Zwei miteinander kommunizierende Wege, die humorale und die zelluläre Immunantwort, dienen der spezifischen Eliminierung von Fremdstoffen. Bei der zellulären Immunantwort töten T-Lymphozyten infizierte Zellen, die an ihrer Oberfläche körperfremde Strukturen darbieten. Sogenannte T-Helferlymphozyten reagieren auf die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen mit der Freisetzung verschiedener Cytokine (z.B. Interferone) und stimulieren dadurch die Aktivität anderer immunologisch aktiver Zellen. Die humorale Immunantwort besteht aus löslichen Proteinen, den hochspezifischen Antikörpern. Diese Immunglobuline werden in den B-Lymphozyten gebildet. Die Bindung eines Antikörpers an den Rezeptor eines Makrophagen induziert die Phagozytose des Antigen-Antikörper-Komplexes (Modrow, 1997).

Vielen Viren gelingt es jedoch, der Immunantwort ihres Wirtes erfolgreich auszuweichen. Zahlreiche Viren - darunter auch das Hepatitis C Virus - variieren unter dem Selektionsdruck der Antikörper kontinuierlich die Sequenz und Struktur ihrer oberflächenexponierten Proteinregionen und weichen dadurch einer effizienten Immunantwort aus (Conry-Cantilena, 1997). Bei einer HCV-Infektion beobachtet man sehr häufig eine Mehrfachinfektion mit verschiedenen Genotypen, so daß das Virus nur bei einer geringen Zahl von Infizierten durch das Immunsystem erfolgreich eliminiert werden kann.

Dies machte die Entwicklung antiviraler Substanzen und erfolgreicher Therapien erforderlich. Welche molekularen Angriffspunkte können antivirale Wirkstoffe haben? Die Möglichkeit der Sequenzierung viraler Erbinformation und der Strukturaufklärung viruscodierter Enzyme verbunden mit neuen Erkenntnissen in der Molekulargenetik erlauben die gezielte Synthese antiviraler Substanzen. Solche Verbindungen müssen selektiv bestimmte Virusfunktionen inhibieren, ohne dabei zelluläre Prozesse zu beeinflussen. Da Viren aber oft funktionelle Aktivitäten ihrer Wirtszelle nutzen, ist diese Anforderung schwer zu erfüllen.

Die überwiegende Mehrzahl der heute verfügbaren Chemotherapeutika hemmt die Genomreplikation der Viren. Insbesondere Analoga natürlicher Nucleoside besitzen ein hohes, antivirales Potential. Ihre Wirkung beruht wie im Falle von Acycloguanosin und Azidothymidin auf dem Fehlen der 3'-Hydroxylfunktion, was bei der Replikation zum Kettenabbruch führt. Ribavirin hingegen hemmt die zelluläre Guanylyltransferase. Dadurch wird das Anfügen einer 5'-Cap-Gruppe an die transkribierte mRNA verhindert und die Translation gestört (Abb. 4.7). Andere Nucleosidanaloga stören die regelmäßige Struktur der DNA oder RNA, die dann nicht mehr korrekt repliziert oder transkribiert werden kann (Modrow, 1997).

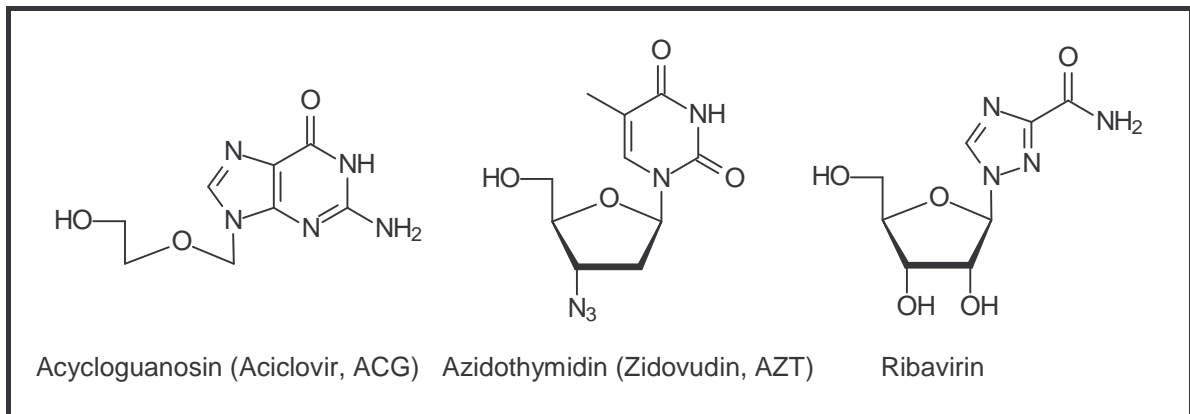


Abb. 4.7: Strukturen der Nucleosidanaloga Acycloguanosin, Azidothymidin und Ribavirin

Am Beispiel des Nucleosidanalogs Azidothymidin (AZT) soll der Wirkmechanismus verdeutlicht werden: Nach Applikation wird AZT durch zelluläre Kinasen in das Triphosphat überführt, das bevorzugt von der Reversen Transkriptase des Retrovirus HIV als Substrat verwendet wird. Die Affinität des AZT-Triphosphats zur Reversen Transkriptase ist etwa einhundert mal höher als die zu den zellulären DNA-Polymerasen. Das Fehlen einer 3'-Hydroxylfunktion führt z.B. beim HIV schon in einem sehr frühen Stadium, nämlich vor der Integration des Virusgenoms in die Wirtszell-DNA, zum Kettenabbruch (Abb. 4.8). AZT ist seit 1987 in der Therapie des HIV zugelassen.

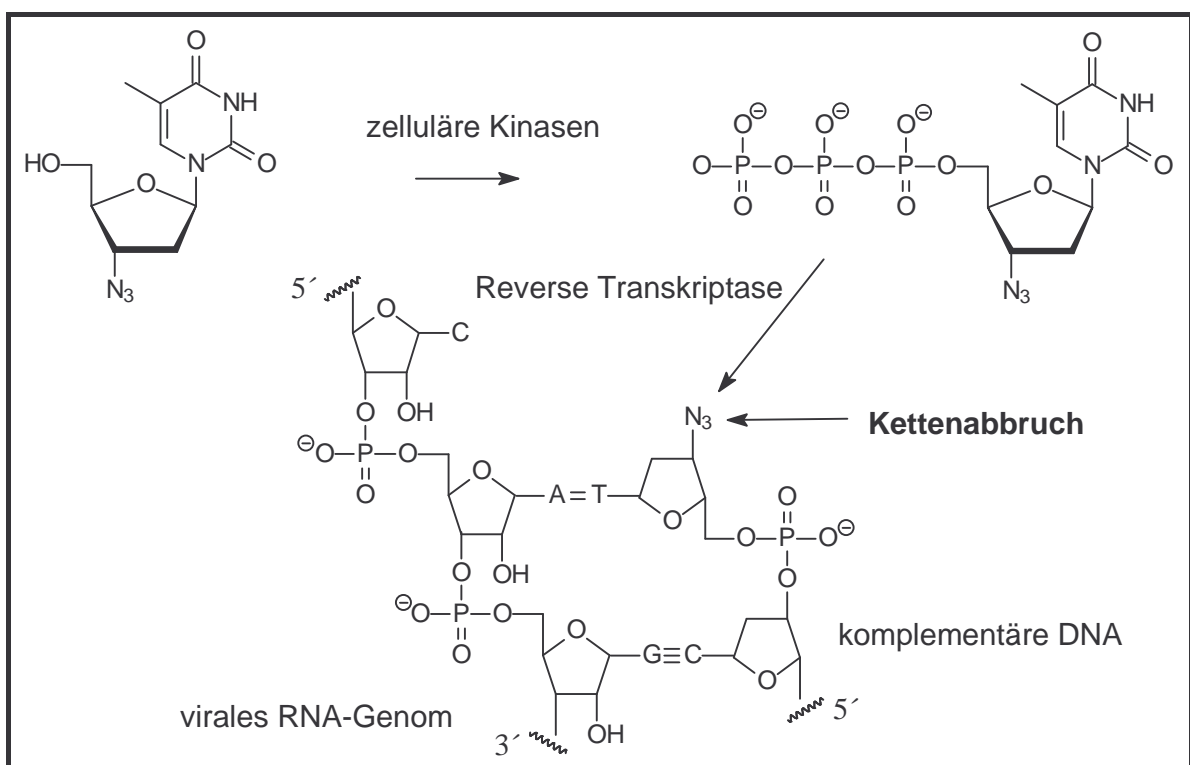


Abb. 4.8: Wirkmechanismus von Azidothymidin (AZT)

Weitere virenspezifische Angriffspunkte sind beispielsweise Polymerasen, die das Virus selbst codiert und die sich dadurch von den zellulären Polymerasen unterscheiden. Gleiches gilt für virale Helikasen oder Proteasen. Im Falle des HCV ist ein NS3-Protease-Inhibitor gefunden worden, der eine Spaltung der NichtStrukturproteine NS4 und NS5 des Polyprotein-Precursors verhindert. Der aus *Streptomyces* sp. isolierte Naturstoff (Sch 68631) hat eine inhibitorische Aktivität von 2,5 µg/ml *in vitro* (Chu, 1996). Auch die Hemmung virusspezifischer Prozesse wie Adsorption, Uncoating, Self-Assembly oder die Freisetzung der Virionen ist denkbar. Bei Viren, wie beispielsweise dem Hepatitis C Virus, die in ihrem Genom hochkonservierte, funktionelle Bereiche besitzen, ist eine Eliminierung des Virus mit Hilfe von Ribozymen (Lieber, 1996; Sakamoto, 1996) oder Antisense Oligonukleotiden (Wakita, 1994; Seki, 1995; Mizutani, 1995; Alt, 1995; Hanecak, 1996; Vidalin, 1996; Lima, 1997; Caselmann, 1997; Alt, 1997; Zhang, 1999; Wakita, 1999; Brown-Driver, 1999; Alt, 1999) denkbar. Mit Hilfe dieser Werkzeuge kann die genomische Viren RNA blockiert oder sogar enzymatisch geschnitten werden.

Trotz der zahlreichen aufgezeigten Angriffspunkte ist eine spezifische Therapie gegen Hepatitis C bislang nicht verfügbar. Fast zehn Jahre lang hat sich in der klinischen Praxis die Gabe von Interferon- α bewährt (Di Bisceglie, 1989; Davis, 1989; Hayashi, 1992). Seit Mai 1999 steht mit einer Interferon- α / Ribavirin Kombinationstherapie eine verbesserte Therapie zur Verfügung (Di Bisceglie, 2000). Ribavirin (Abb. 4.7) alleine verabreicht wirkt überhaupt nicht gegen das HCV, obwohl es zahlreiche andere Viren hemmt. Möglicherweise verstärkt Ribavirin die Wirkung von Interferon α .

Interferone sind antiviral wirkende Cytokine, die durch eine virale Infektion induziert werden. Interferone wirken antiviral durch die Stimulation der Produktion zweier Enzyme: einer Protein-Kinase und einer Oligoadenylat-Synthetase. Die Kinase blockiert den Translations-Initiationsfaktor eIF2 α , der die Initiator-tRNA zur 40 S-Ribosomenuntereinheit transportiert. Dadurch kommt es zur Inhibierung der viralen Proteinsynthese. Eine Aktivierung der 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase katalysiert die Bildung von 2',5'-Oligoadenylaten, die die Endoribonuklease RNase L zur Hydrolyse von einzelsträngiger mRNA oder rRNA mobilisiert (Abb. 4.9). Diese beiden Mechanismen rufen eine Hemmung des Zellwachstums und der Zellproliferation hervor (antiproliferative Wirkung). Ferner besitzen Interferone eine immunmodulierende Wirkung, indem sie weitere Cytokine freisetzen. Interferone aktivieren natürliche Killerzellen und T-Lymphozyten und erhöhen die Fähigkeit von infizierten Zellen, virale Proteinfragmente auf ihrer Oberfläche zu präsentieren (Mutschler, 1996).

Interferon α und Interferon β gehören zu den säurestabilen Typ-I-Interferonen. Ihre Expression erfolgt in infizierten Wirtszellen und wird durch Bestandteile der Viren eingeleitet, die bestimmte Transkriptionsfaktoren aktivieren. Interferon α wird hauptsächlich in Makrophagen und Monozyten synthetisiert, weshalb es auch Leukozyteninterferon genannt wird. Interferon β wird in virusinfizierten Fibroblasten gebildet. Das säurelabile Interferon γ (Typ-II-Interferon) wird von T-Helferzellen synthetisiert (Modrow, 1997).

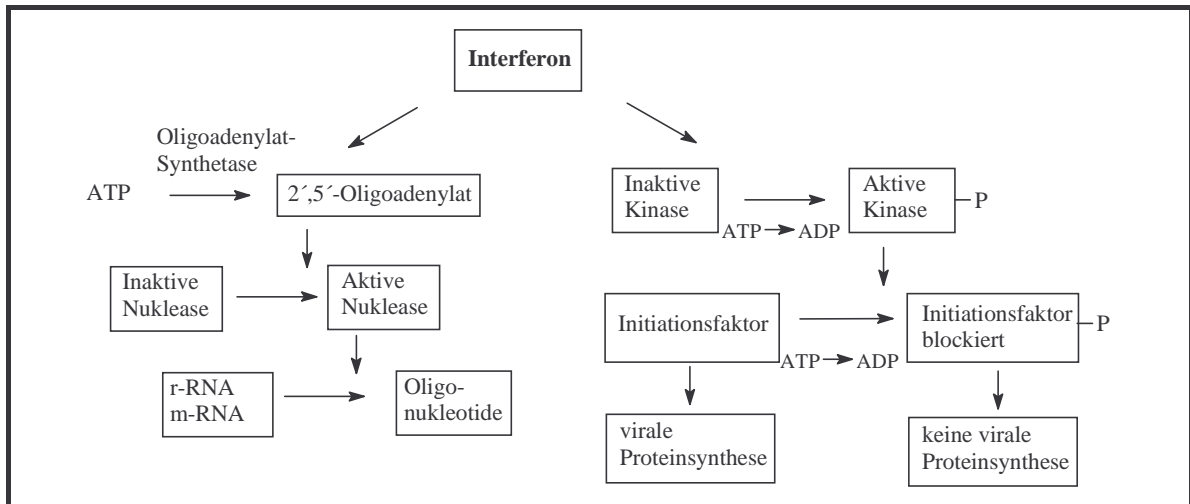


Abb. 4.9: Antiproliferative Wirkmechanismen der Interferone

Wie bereits erwähnt entwickeln etwa 70 % aller HCV-Infizierten einen chronischen Krankheitsverlauf. Eine Behandlung mit Interferon α ist nicht immer von Erfolg gekrönt und verursacht starke Nebenwirkungen. Die Standardtherapie erfordert jeden zweiten Tag die subkutane Applikation von 3 bis 6 Millionen Einheiten Interferon über sechs bis zwölf Monate. Zusätzlich wird Ribavirin oral verabreicht. Etwa 50 % der chronisch HCV-Infizierten sind nach einem halben Jahr virenfrei. Etwa 60 % von ihnen erleidet jedoch einen Rückfall, so daß man momentan nur ca. 20 % aller chronisch Infizierten langfristig heilen kann (Davis, 1989; Abb, 1996). Entscheidend für den Erfolg sind verschiedene Faktoren: Alter, Geschlecht, Alkoholkonsum und vor allem die HCV-Genotypen. Unglücklicherweise spricht der in Deutschland sehr häufige Genotyp 1b nur sehr schlecht auf die Interferontherapie an. Die größten Erfolgchancen hat eine junge, relativ frisch infizierte Frau mit den Genotypen 2 oder 3. Immerhin hat sich die Erfolgsrate durch die Kombinationstherapie nahezu verdoppelt (Cohen, 1999). Zusätzlich zu den geringen Erfolgsaussichten einer Interferon-Behandlung treten oft starke Nebenwirkungen auf. Unmittelbar nach der Injektion kommt es zu hohem Fieber und die geistige und körperliche Leistungsfähig-

keit ist über den gesamten Behandlungszeitraum deutlich herabgesetzt. Etwa jeder vierte Interferonpatient erleidet starke Depressionen, die ebenfalls behandelt werden müssen. Auch Ribavirin ist nicht frei von Nebenwirkungen, da es unspezifisch sowohl das Capping der viralen RNA-Transkripte als auch das zellulärer Transkripte inhibiert (Modrow, 1997). Eine weitere Optimierung der HCV-Behandlung wird sich in naher Zukunft durch die Verwendung von pegyliertem Interferon ergeben. Dieses Präparat muß nur noch einmal wöchentlich appliziert werden und zeichnet sich durch eine bessere Verträglichkeit aus.

4.3.6 Antisense-Strategien gegen HCV

Aufgrund des hohen Konservierungsgrads der 5'-NCR und ihrer Funktionalität als IRES bietet diese Region optimale Voraussetzungen, die Translation der viralen Proteine mit Hilfe von Antisense Oligonukleotiden spezifisch zu inhibieren und das Virus möglicherweise durch einen RNase H vermittelten Mechanismus vollständig zu eliminieren. In den bislang veröffentlichten Antisense-Studien gegen das HCV sind die Antisense Oligonukleotide demzufolge gegen die 5'-NCR oder gegen den Anfang des sich anschließenden Core-Gens gerichtet. In allen Studien steht das Screening nach einer potenten Angriffsstelle für Antisense Oligonukleotide im Vordergrund. Dies stellt eine große Herausforderung dar, da eine geeignete Zielsequenz in starkem Maße von ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur abhängt. Dies wiederum verdeutlicht die Notwendigkeit der Suche nach geeigneten Sekundär- und Tertiärstrukturmodellen (siehe Kap. 4.3.1).

Das experimentelle Screening nach potenten Antisense Oligonukleotiden ist sehr aufwendig und teuer. Die Kenntnis eines Sekundärstrukturmodells allein kann bestenfalls als Hinweis auf eine geeignete Region dienen, wird jedoch keinen potenten Wirkstoff hervorbringen. Würde man die inhibierenden Eigenschaften aller möglichen 20mer Antisense Oligonukleotide gegen die komplette 5'-NCR mit ihren 342 Nukleotiden untersuchen, so müßten 323 unterschiedliche 20mere synthetisiert und getestet werden. Eine solche Studie bezieht sich lediglich auf eine Art der Modifikation, zumeist Vollthioate, und das Ergebnis ist durch die Invarianz der Länge eingeschränkt. Häufig aber führen Verkürzungen um eine Einheit bereits zu drastischen Veränderungen der Inhibitoreigenschaften, so daß zusätzlich auch Oligonukleotide mit einer kleineren oder größeren Zahl an Nukleotiden gescreent werden müssen. Die substanziellen Aktivitätseinbußen, die eine Verkürzung eines 20mer Antisense Oligonukleotids auf ein 18mer bewirken kann, sind in einer HCV-Antisense-Studie der Fa. ISIS Pharmaceuticals dargestellt (Hanecak, 1996). Der Ansatz, Antisense

Oligonukleotide durch das Testen einer großen Zahl von Sequenzen zu finden (Hanecak, 1996; Lima, 1997; Brown-Driver, 1999), ist unbefriedigend und widerspricht dem Grundgedanken des Antisense-Konzepts als rationell zu entwerfende Wirkstoffklasse.

Eine Alternative bieten theoretische, computergestützte Analysen der RNA-Faltung. Die zunehmende Leistungsfähigkeit von Computern ermöglicht heute eine Vorhersage der Sekundärstrukturen von RNA-Oligomeren verbunden mit einer nach semiempirischen Regeln durchgeführten Suche nach lokalen Zielsequenzen (Patzel, 1999). Voraussetzung für diesen Ansatz ist ein grundlegendes Verständnis der Prinzipien, die sowohl für die Stabilität von RNA-Strukturelementen und Antisense Oligonukleotiden als auch für deren Wechselwirkung von Bedeutung sind.

Modifikation	Länge	Nukleotide im 5'-NCR	Assay	Autor
Vollthioat	27, 28	38-65, 134-175, 312-339, 341-377	<i>in vitro</i>	Wakita, 1994
Vollthioat	17, 20	342-363	<i>in vivo</i>	Mizutani, 1995
Vollthioat	23	326-348	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Alt, 1995
Vollthioat	20	254-289, 322-341 326-345 330-349 336-359	<i>in vivo</i>	Hanecak, 1996
Vollthioat	18	348-365	<i>in vitro</i>	Alt, 1997
2'-O-Methyl	20	325-344, 340-359 345-364 350-369 355-374	<i>in vitro</i>	Brown-Driver, 1999
term. Thioat	23	326-348	<i>in vitro</i>	Alt, 1999
term. Benzyl	23	326-348	<i>in vivo</i>	
term. Methyl	23	326-348	<i>in vivo</i>	
Vollthioat	20	(ISIS 6547) 330-349	<i>in vivo</i>	Zhang, 1999
Vollthioat/5-Methylcytidin	20	(ISIS 14803) 330-349		
	18-20	12-29, 28-37, 350-369, 367-386	empirisch	Sczakiel, 2000

Tab. 4.3: Antisense-Studien mit der 5'-NCR und dem Core des HCV als Zielsequenz. Angegeben sind Sequenzen mit dem höchsten Inhibitionspotential.

Die bisherigen Bemühungen, geeignete Zielsequenzen in der 5'-NCR des HCV zu identifizieren, beruhen zumeist auf experimentellen Daten. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Georg Sczakiel ist es gelungen, eine empirische Vorhersage geeigneter Zielsequenzen für den HCV-Genotyp 1b zu treffen (Sczakiel, 2000). Tabelle 4.3 gibt die wichtigsten Ergebnisse zu dieser Fragestellung wieder. Die umfangreichsten Studien wurden in

der Fa. ISIS Pharmaceuticals durchgeführt. Die erste Arbeit umfaßt mehr als 50 Antisense Oligonukleotide (Hanecak, 1996). Zunächst wurde die komplette 5'-NCR und der Beginn der Core-Region mit 20mer Vollthioaten untersucht, die um je zehn Nukleotide in der Zielsequenz verschoben waren. Die Regionen mit der größten Inhibierung wurden dann in Schritten von zwei Nukleotiden wiederum mit 20mer Vollthioaten detaillierter analysiert. Letztlich wurde das beste 20mer noch in der Länge variiert (Hanecak, 1996). Eine ähnliche Untersuchung führte die Fa. ISIS Pharmaceuticals mit 2'-modifizierten Antisense Oligonukleotiden durch (Brown-Driver, 1999). Dabei erhielt man mit 2'-*O*-Methoxyethyl-modifizierten Oligonukleotiden im Bereich der HCV-Sequenz 335 bis 379 mit Phosphorothioaten vergleichbare Resultate. Mit dem Antisense-Oligonukleotid ISIS 14803 hat die Fa. ISIS Pharmaceuticals im Januar 2000 eine erste Substanz in die klinische Phase I gebracht (www.isip.com). Die Zielsequenz sind die Nukleotide 330 bis 349 des HCV-Genoms. Es handelt sich um ein 20mer Vollthioat, in dem alle Cytidine durch 5-Methylcytidin ersetzt wurden. Dadurch wird die Bindungsaffinität zum RNA-Target unter Erhalt der RNase H Aktivität erhöht (Zhang, 1999).

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Caselmann (früher Klinikum Großhadern, heute Universitätsklinikum Bonn) ist es uns ebenfalls gelungen, ein potentes Antisense Oligonukleotid gegen Hepatitis C Virus-RNA zu entwickeln. Dabei handelt es sich um ein 23mer Vollthioat gerichtet gegen die Nukleotide 326 bis 348 des HCV-Genoms, also einer sehr ähnlichen Sequenz des sich zur Zeit in der klinischen Phase I befindlichen Wirkstoffs der Fa. ISIS Pharmaceuticals (Alt, 1995). In Weiterführung dieser Arbeit konnten sehr effektiv wirkende, terminal modifizierte Oligonukleotide synthetisiert werden. Dabei wurden am 3'- und 5'-Ende je drei Phosphodiesterbindungen als Phosphorothioate, Methyl- oder Benzylphosphonate modifiziert (Eisenhardt, 1996; Caselmann, 1997; Alt, 1999). Mit dieser Strategie konnte die Lipophilie der Antisense Oligonukleotide erhöht und die RNase H Aktivität aufgrund der Abfolge von 16 natürlichen Phosphodiesterbindungen erhalten werden.

Die Auswahl der optimalen Zielsequenz ist eine Fragestellung, für die es keine Patentlösung gibt. Computergestützte Genomanalysen können die Suche sicherlich unterstützen, werden das Inhibierungsexperiment aber nicht ersetzen können. Die in Tabelle 4.3 zusammengefaßten Ergebnisse der Antisense-Arbeiten zeigen deutlich bevorzugte Zielregionen auf. Besonders die Bereiche stromabwärts und stromaufwärts des AUG-Startcodons wurden als effektive Zielsequenzen identifiziert - ein Indiz für die Bedeutung dieser Region bei der Entwicklung antiviraler Antisense Oligonukleotide gegen das Hepatitis C Virus.

5. Aufgabenstellung

Diese Arbeit befaßt sich mit der Synthese, Anwendung und Eigenschaften neuartiger Antisense Oligonukleotide, die gegen das RNA-Genom des Hepatitis C Virus gerichtet sind. Zahlreiche Schwierigkeiten in Zusammenhang mit der Anwendung therapeutischer Nucleinsäuren konnten bislang nicht befriedigend gelöst werden. Hier soll vor allem der Fragestellung nachgegangen werden, inwieweit eine Derivatisierung von Antisense Oligonukleotiden mit Gallensäuren wie Cholsäure und Taurocholsäure einen Einfluß auf ein leberselektives „Drug Targeting“ hat und ob membranständige, für Gallensäuren spezifische Carriersysteme in Hepatozyten eine Verbesserung der Zellaufnahme bewirken können.

Die Durchführung dieses Projekts erfolgt in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang H. Caselmann an der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität in Bonn. Hier werden sämtliche biologische *in vitro* und *in vivo* Assays sowie die Untersuchung des Drug Targetings an einer transgenen Maus durchgeführt.

Die bisherigen Arbeiten dieser Zusammenarbeit führten zu terminal modifizierten 23mer Antisense Oligonukleotiden, die die Expression des Hepatitis C Virus Genoms *in vitro* und *in vivo* unter Erhalt der RNase H Aktivität effizient inhibierten (Eisenhardt, 1996; Alt, 1999). Um die Wahrscheinlichkeit eines carriervermittelten Oligonukleotidtransports zu verbessern, soll durch systematische Verkürzung des 23mers eine Sequenz minimaler Länge mit einem maximalen Inhibitionspotential gefunden werden. Nach Abschluß des Screenings soll die verkürzte Sequenz mit Gallensäuren und Cholesterol über die 3-Position des Steroidgerüsts verknüpft werden. Da sich basenlabile Benzylphosphonat Antisense Oligonukleotide, die durch Substitution eines nicht verbrückenden Sauerstoffatoms der Phosphodiesterseinheit durch eine Benzylgruppe erhalten werden, als besonders effizient *in vivo* gezeigt hatten, muß eine neue Strategie für die Derivatisierung mit Cholsäure und Taurocholsäure entwickelt werden. Die bisherigen Versuche, Gallensäuren an Oligonukleotide zu knüpfen, erfolgten postsynthetisch unter Verwendung von Hydroxylbasen zum Verseifen der veresterten Säurefunktion. Zum Nachweis des Drug Targetings oder einer effizienten Zellaufnahme müssen die Oligonukleotide zusätzlich mit einem Farbstoff oder radioaktiv markiert werden. Diese erheblich modifizierten Antisense Oligonukleotide sind nach Aufreinigung und Charakterisierung auf ihre Duplexstabilität zu DNA- und RNA-Target Sequenzen sowie auf ihren veränderten, lipophilen Charakter zu überprüfen. In der Arbeitsgruppe von Prof. Caselmann werden diese Antisense Oligonuk-

6. Chemische Synthesen

6.1 Auswahl der Synthesestrategie

Prinzipiell lassen sich Oligonukleotide an verschiedenen Positionen derivatisieren. Modifikationen der Phosphodiesterbindung werden zumeist zur Erhöhung der enzymatischen Stabilität gegenüber Nukleasen eingebracht. Die Derivatisierung der Hydroxylgruppen des Zuckerrings kann dem gleichen Zweck dienen. Mit Modifikationen der 3'-Position werden häufig Bausteine generiert, die von Polymerasen nicht mehr verlängert werden können und als antivirale Wirkstoffe oder bei der Sequenzierung eine wichtige Rolle spielen. Vielfach werden über die 2'- und 3'-Position auch Farbstoffe angekuppelt. Eine Modifikation über die funktionellen Gruppen der Nukleobasen ist ebenfalls möglich. Auch das 3'- und 5'-Ende eines unter Standardbedingungen synthetisierten Oligonukleotids bietet die Möglichkeit einer Derivatisierung (Uhlmann, 1986). Diese läßt sich nach Einbringen geeigneter reaktiver Gruppen sowohl an fester Phase wie auch postsynthetisch, also nach Abspaltung des Oligonukleotids vom festen Träger durchführen.

Eine Kupplung von Gallensäuren sollte am oder in der Nähe des 3'- oder 5'- Endes der Basensequenz erfolgen. Zum einen erscheint der Transfer eines linearen Biomakromoleküls durch ein hepatisches Transportprotein wahrscheinlicher. Zum anderen kann die Hybridisierung zum Target-Strang unter Erhalt der RNase H Aktivität durch eine zentrale Gallensäuremodifikation beeinträchtigt werden.

Die amphiphilen Gallensäuren zeichnen sich durch eine Carbonsäurefunktion im Falle der Cholsäure und durch eine Sulfonsäuregruppe im Falle der Taurocholsäure als in Nucleinsäuren nicht vorhandene Funktionalitäten aus. Außerdem besitzen diese beiden Gallensäuren drei sich in ihrer Reaktivität unterscheidende Hydroxylgruppen in den Positionen 3α , 7α und 12α . Bislang sind zwei unterschiedliche Strategien zur Kupplung von Gallensäuren an Oligonukleotide publiziert worden. 1994 gelang zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die erfolgreiche Reaktion eines aktivierten Cholsäurederivats mit einem Oligonukleotid, an dessen 3'- oder 5'-Ende an fester Phase ein Aminolinker ansynthetisiert worden war (Manoharan, 1994; Chow, 1994). Eine Verknüpfung über die Säurefunktionen der Gallensäuren ist aber nicht sinnvoll, da jegliche Veränderung der Seitenkette die Affinität zu hepatischen Transportsystemen vermindert (Kramer, 1999; siehe hierzu auch Kapitel 3.5.4).

Da eine Substitution der 3 α -Hydroxylgruppe keinen Einfluß auf die Erkennung durch Gallensäurecarrier zu haben scheint und diese Position eine deutlich erhöhte Reaktivität gegenüber der 7 α - und 12 α -Hydroxylgruppe aufweist, bietet sich die Kupplung über die 3-Position des Steroidgerüsts an (Kramer, 1999). Dies erfordert einen größeren Syntheseaufwand, da die Gallensäuren an ihren Säurefunktionen und möglicherweise auch an ihren Hydroxylgruppen geschützt werden müssen. Die 3 α -Hydroxylgruppe läßt sich zudem nur nach vorheriger Derivatisierung beispielsweise mit einem Amino-gelabelten Oligonucleotid verknüpfen. Die Umsetzung dieses Konzepts ist erstmals 1999 mit der Gallensäure Cholsäure geglückt (Pagels, 1999; Petzinger, 1999).

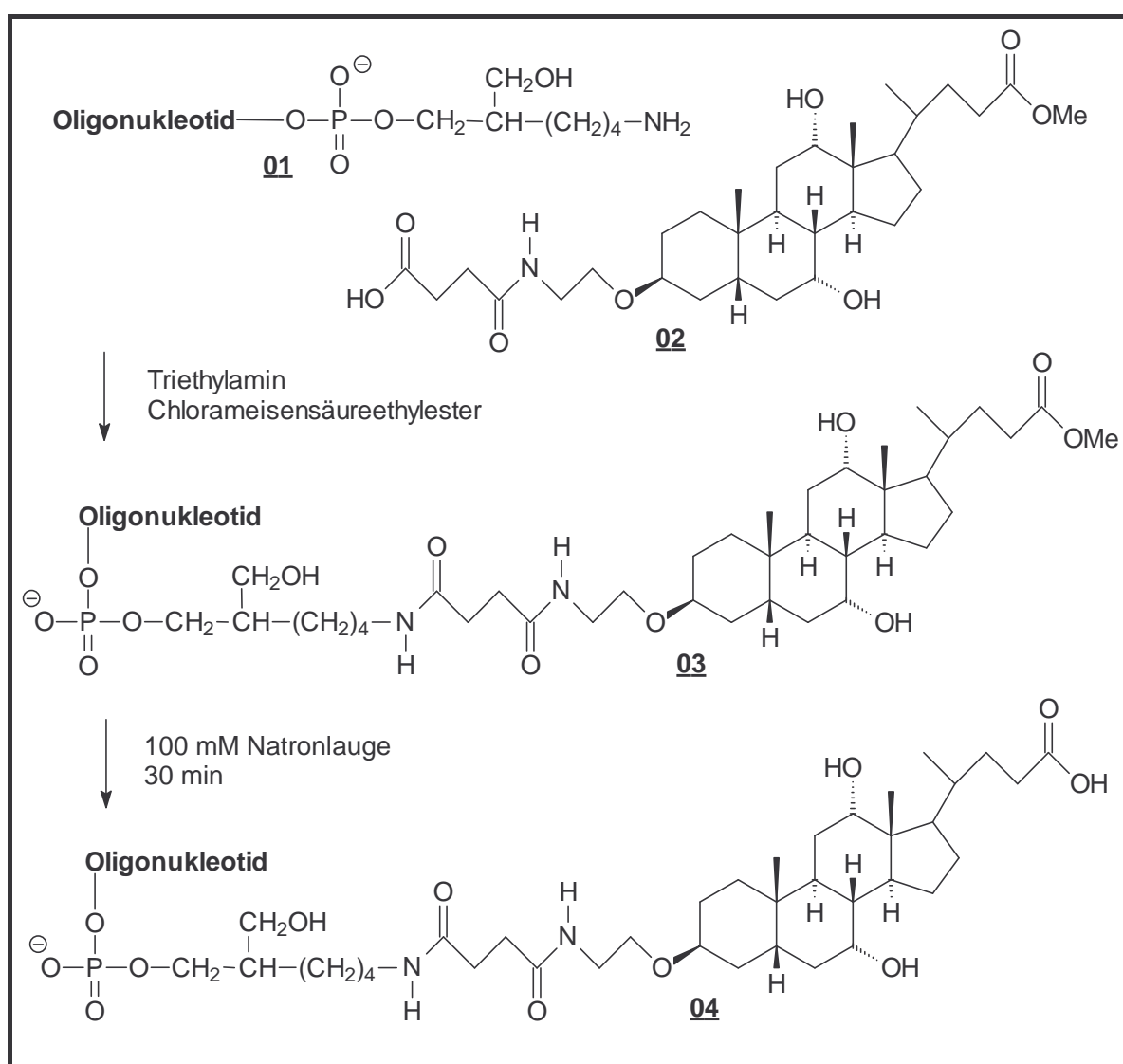


Abb. 6.1: Synthese Cholsäure gekuppelter Oligonucleotide (Pagels, 1999; Petzinger, 1999)

Zunächst wurde Cholsäure in mehreren Reaktionsschritten durch Derivatisierung der 3-Position zu 3 β -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxicholsäuremethylester umgesetzt (Wess, 1992). Die Alkoholfunktion des Ethoxylinkers wurde anschließend zum Azid substituiert, um nach Reduktion mit Palladium auf Aktivkohle 3 β -(2-Aminoethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxicholsäuremethylester zu erhalten (Wess, 1993a). Die Aminofunktion wurde in Gegenwart von TEA mit Bernsteinsäureanhydrid zum Monoamid **02** amidiert. Die auf diese Weise in die Cholsäure eingeführte Carbonsäurefunktion konnte nach Aktivierung durch Chlorameisensäureethylester mit einem am 3'- oder 5'-Ende mit einer Aminogruppe derivatisierten Oligonukleotid wie Verbindung **01** gekuppelt werden. Die Kupplung verlief nur in Lösung erfolgreich, nicht jedoch an fester Phase. Die als Methylester geschützte Carbonsäurefunktion des resultierenden Oligonukleotid-Cholsäure Konjugats **03** mußte im letzten Reaktionsschritt freigesetzt werden. Nach Hydrolyse mit 100 mM Natriumhydroxidlösung wurde das Cholsäure gekuppelte Oligonukleotid **04** als Endprodukt erhalten (Pagels, 1999; Petzinger, 1999).

Die vorgestellte Synthese wurde mit Oligonukleosid-Phosphorothioaten durchgeführt. Durch die Verwendung von Hydroxylbasen bei der Verseifung des Cholsäuremethylesters ist diese Synthese nicht mit Oligonukleotiden durchführbar, die aus basenlabilen Alkylphosphonaten wie Methyl- oder Benzylphosphonaten aufgebaut sind. Aus diesem Grund muß für diese Derivate eine andere Schutzgruppenstrategie für die Carbonsäurefunktion der Cholsäure entwickelt werden. Die für eine Steigerung der hepatischen Zellaufnahme am aussichtsreichsten erscheinenden Taurocholsäure gekuppelten Oligonukleotide sind bislang noch nicht synthetisiert worden. Um nicht eine unabhängige, völlig identische Synthese für die Taurocholsäurederivatisierung durchführen zu müssen, wäre eine divergente Synthesestrategie mit möglichst später Amidierung des Cholsäurebausteins mit einem Taurinderivat zum analogen Taurocholsäurebaustein wünschenswert.

Besonders elegant erscheint die Entwicklung einer Methode, bei der die Kupplung der Gallensäuren an fester Phase durchgeführt werden kann. Zur Entschützung der Säurefunktionen kann anschließend ein zusätzlicher Reaktionsschritt vor der Abspaltung vom Trägermaterial erfolgen. Dies scheint vor allem für die veresterten Cholsäurederivate plausibel, da die Verwendung von Stickstoffnukleophilen bei der Abspaltung vom Träger und der Basenschutzgruppen zu unerwünschter Amidbildung führt. Die Synthese und die Lösung der Schutzgruppenproblematik für die Verknüpfung von Cholsäure mit basenlabilen Oligonukleotiden werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

6.2 Darstellung von Cholsäurederivaten für die Festphasensynthese

Ausgehend von kommerziell erhältlicher Cholsäure wurden in den ersten drei Reaktionsschritten die funktionellen Gruppen derart geschützt, daß die selektive Einführung eines Linkers über die 3-Position möglich wird. Dabei wurde die unterschiedliche Reaktivität der drei sekundären Hydroxylgruppen ausgenutzt.

6.2.1 Selektives Schützen der funktionellen Gruppen der Cholsäure

Aufgrund ihres stark amphiphilen Charakters ist Cholsäure in den meisten Lösungsmitteln nahezu unlöslich. In einem Liter Wasser lösen sich etwa 92 mg dieser Gallensäure. In Methanol können 0,1 g Cholsäure je ml gelöst werden. Allein um die Löslichkeit von Cholsäure auf zahlreiche gängige Lösungsmittel auszudehnen, ist es sinnvoll, die Funktionalitäten mit Schutzgruppen zu versehen. Im ersten Reaktionsschritt wurde die Carbonsäurefunktion in der Seitenkette der Cholsäure **05** salzsauer in Methanol verestert. Der Cholsäuremethylester **06** wurde nach 20 h Rühren bei RT in 1 %igem, salzsaurem Methanol quantitativ erhalten. Nach Kristallisation aus Diethylether/Toluol = 10:1 konnte das Produkt in 89 %iger Ausbeute isoliert werden. Die Charakterisierung erfolgte mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie durch Elementaranalyse und ESI-Massenspektrometrie.

Zur Acetylierung von Hydroxyverbindungen wird häufig die Umsetzung des Alkohols in Pyridin mit Essigsäureanhydrid als milde und zuverlässige Methode benutzt. Sterisch gehinderte sekundäre oder tertiäre Alkohole lassen sich mit dieser Methode oft nicht acetylieren. Im Falle des Cholsäuremethylesters **06** wird lediglich das $3\alpha,7\alpha$ -Diacetat erhalten. Erst der Ersatz des Pyridins durch 4-Pyrrolidinopyridin **07**, das eine außerordentlich starke katalytische Wirkung aufweist, ermöglicht die Acetylierung der axialen 12α -Hydroxylgruppe. Die katalytische Wirkung von 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 4-Pyrrolidinopyridin (PPY) beruht nicht auf der gegenüber Pyridin gesteigerten Basizität, sondern auf der Zunahme der nukleophilen Katalyse (Höfle, 1972; Höfle, 1978). Zur Durchführung der Acetylierung wurde der Cholsäuremethylester **06** in Dichlormethan gelöst und mit 0,5 mol des Katalysators 4-Pyrrolidinopyridin **07** bezogen auf den Cholsäuremethylester **06** versetzt. Nach Zugabe von Triethylamin und Essigsäureanhydrid wurde das Reaktionsgemisch 18 h bei RT gerührt. Dabei konnte der Grad der Acetylierung dünn-schichtchromatographisch bis zur quantitativen Umsetzung verfolgt werden. Der

3 α ,7 α ,12 α -Triacetylcholsäuremethylester **08** wurde nach Extraktion ohne weitere Aufreinigung in 99 % Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung wurde mit Hilfe der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie mittels Elementaranalyse und ESI-Massenspektrometrie vorgenommen.

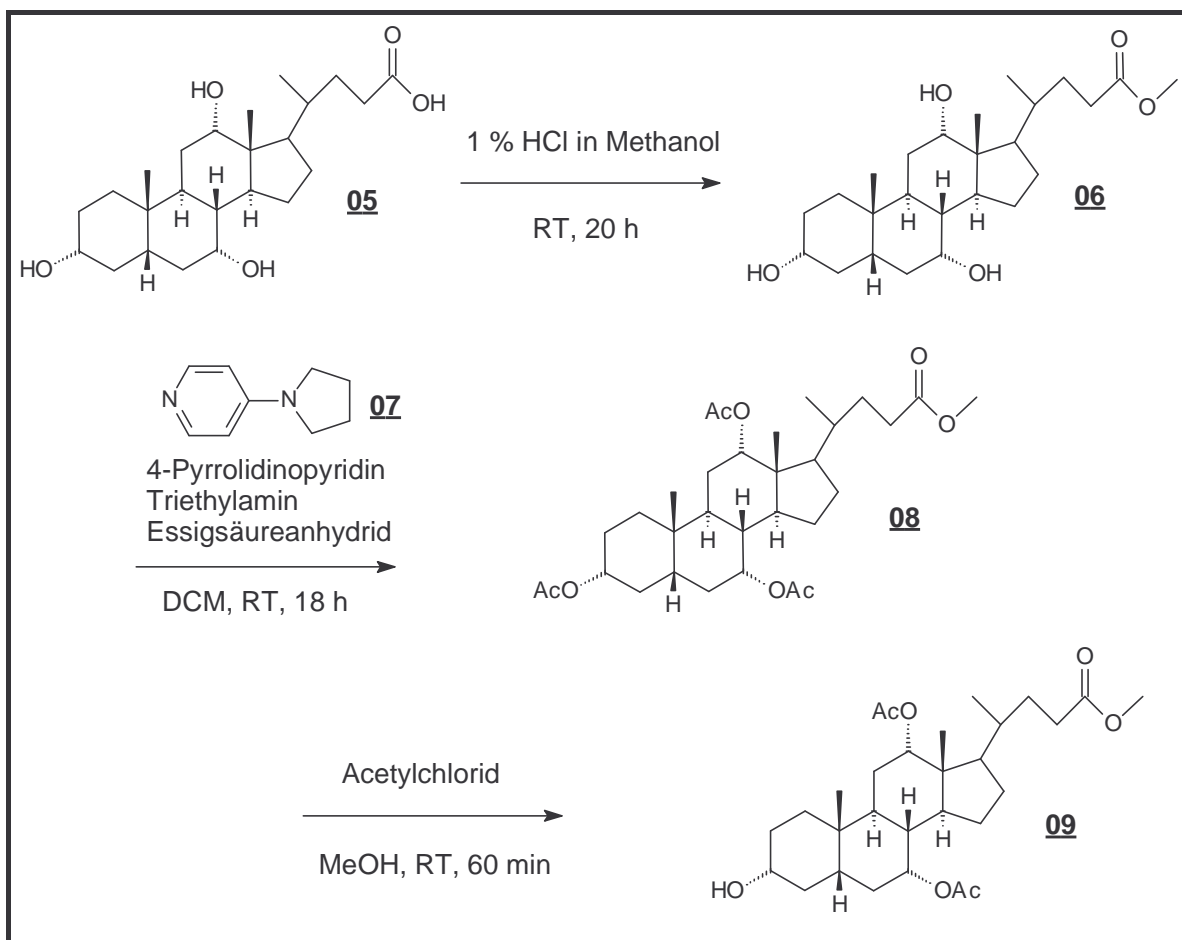


Abb. 6.2: Syntheschema zur Darstellung von 7 α ,12 α -Diacetylcholsäuremethylester **09**

Die selektive Hydrolyse der reaktiveren, äquatorialen 3 α -Acetylgruppe in Gegenwart der axialen 7 α - und 12 α -Acetylgruppen gelang in salzsaurem Methanol. Zur Durchführung der Verseifung wurde das Triacetat **08** in absolutem Methanol gelöst. Nach vorsichtiger Zugabe von etwa 5 Äquivalenten Acetylchlorid wurde das Reaktionsgemisch kontinuierlich dünnschichtchromatographisch analysiert. Nach etwa einer Stunde war die Deacetylierung der 3 α -Position vollständig und es konnten Spuren des Monoacetats mit deutlich niedrigerem R_f -Wert detektiert werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonatlösung abgebrochen und nach chromatographischer Aufreinigung wurden 96 % des 7 α ,12 α -Diacetylcholsäuremethylesters **09** erhalten. Durch die Verseifung der 3 α -

Acetylgruppe verschiebt sich das $^1\text{H-NMR}$ Signal für das 3β -Proton wieder hochfeldig von zuvor 4,45 ppm nach 3,47 ppm (Dias, 1977). Das Signal für das C-3 Kohlenstoffatom verschiebt sich von 74,1 ppm nach 71,6 ppm. Neben dem NMR-spektroskopischen Nachweis wurde das Produkt mittels Elementaranalyse und ESI-Massenspektrometrie nachgewiesen.

6.2.2 Einführen eines Linkers über die 3α -Hydroxyfunktion

In den folgenden vier Reaktionsschritten wurde ein kurzer Alkyllinker über die 3α -Hydroxylgruppe in das Gallensäuregerüst eingeführt. Diese Derivatisierung der Cholsäure ist von Wess *et al.* erstmals beschrieben worden (Wess, 1992). Zunächst wurde die 3α -Hydroxylgruppe mit Allylbromid verethert. Die Doppelbindung des Allylethers wurde oxidativ gespalten und der resultierende Aldehyd zum Alkohol reduziert. Danach wurde der Methyl-ester in der Seitenkette des Cholsäurederivats mit Natriumhydroxid verseift, um ein anderes Schutzgruppenkonzept und die Derivatisierung zur Taurocholsäure zu realisieren.

Zur Veretherung wurde der $7\alpha,12\alpha$ -Diacetylcholsäuremethylester **09** in DMF gelöst und nach Zugabe eines großen Überschusses an DIPEA und Allylbromid für 18 h bei 120 °C gerührt. Nach Aufarbeitung und Flashchromatographie wurden 89 % des 3α -Allylether- $7\alpha,12\alpha$ -diacetylcholsäuremethylesters **10** als glasiges, zähes Harz isoliert. Durch den Einfluß der Allylethereinheit verschiebt sich das $^1\text{H-NMR}$ -Signal für das 3β -Proton hochfeldig auf 3,15 ppm. Außerdem wurde das Produkt mittels $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie nachgewiesen.

Im nächsten Reaktionsschritt erfolgte die oxidative Spaltung des ungesättigten Allylsystems. Die Lemieux-Reaktion ist eine Abfolge aus *cis*-Dihydroxylierung der Doppelbindung und anschließender Spaltung des intermediär entstehenden, vicinalen Diols. Dabei wird zunächst in einer konzertierten Addition mit Osmiumtetroxid ein zyklischer Ester gebildet. Da Osmiumtetroxid in katalytischer Menge zugegeben wird, kann es nach Zugabe eines weiteren Oxidationsmittels unter Verseifung des zyklischen Esters reoxidiert werden. Ein zweites Äquivalent des Oxidationsmittels wie beispielsweise Periodat baut das vicinale Diol unter Spaltung der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zu Carbonylverbindungen ab. Der 3α -Allylether- $7\alpha,12\alpha$ -diacetylcholsäuremethylester **10** wurde in THF/Wasser = 3:1 gelöst. Der Lösung wurde der fünfzigste Teil an Osmiumtetroxid in Form einer 2,5 %igen Lösung in *tert*-Butanol zugesetzt. Nach einer Stunde wurden portionsweise 2,5 Äquivalente Natrium(meta)periodat zugegeben. Nach dreistündigem Rühren bei RT wurde

aufgearbeitet und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an Kieselgel aufgereinigt. Die Ausbeute an 3α -(Ethan-2-yl-1-ether)- $7\alpha,12\alpha$ -diacetylcholsäuremethylester **11** betrug 72 % und die Charakterisierung erfolgte mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie durch Elementaranalyse und ESI-Massenspektrometrie.

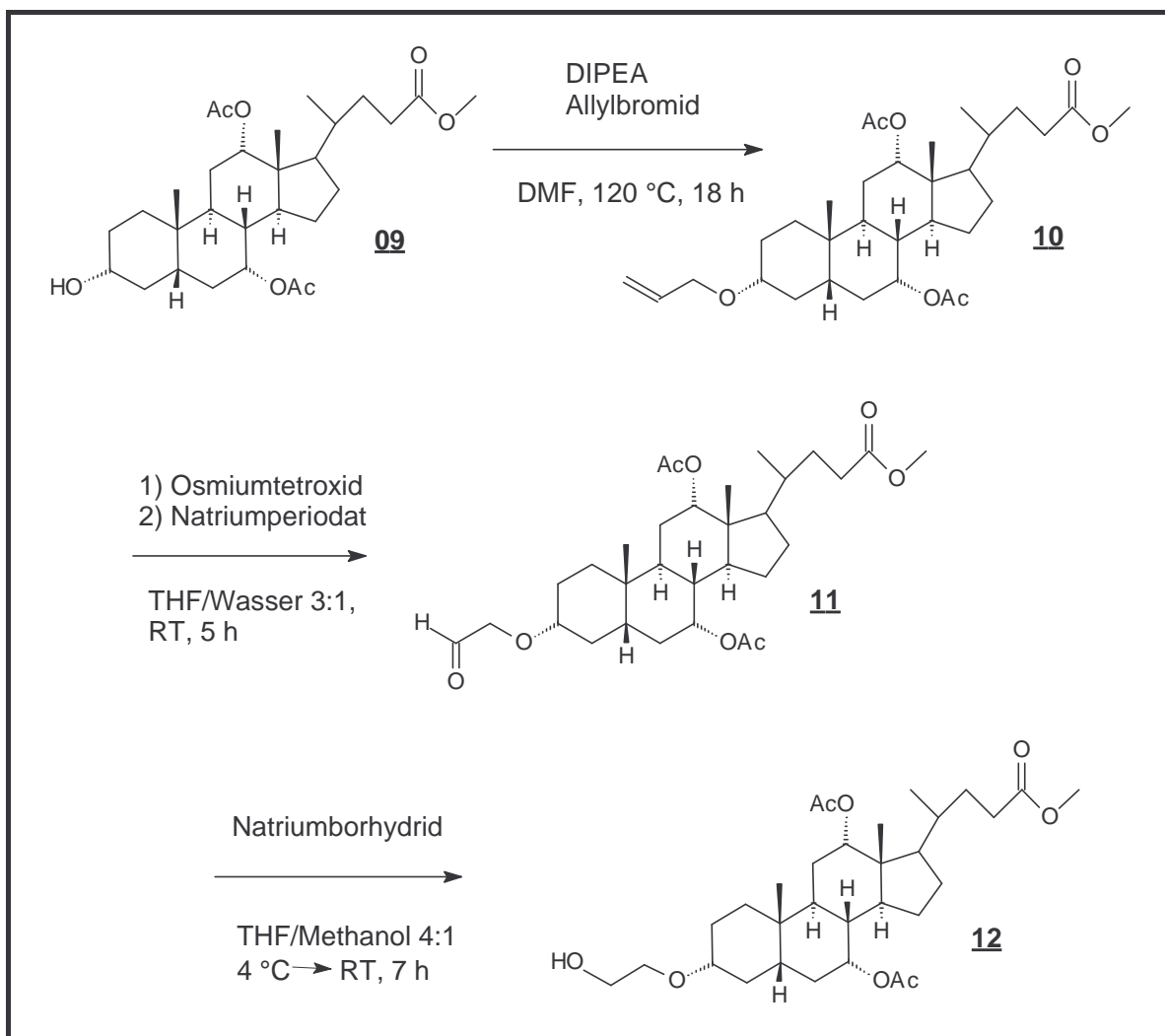


Abb. 6.3: Einführen eines Linkers über die 3α -Position des Steroidgerüsts (Wess, 1992)

Der erhaltene Aldehyd **11** wurde anschließend zum Alkohol reduziert. Dazu wurde Aldehyd **11** im Lösungsmittelgemisch THF/Methanol = 4:1 gelöst und mit Natriumborhydrid versetzt. Nach siebenstündigem Rühren bei RT war die Reduktion beendet und das Produkt 3α -(2-Hydroxyethoxy)- $7\alpha,12\alpha$ -diacetylcholsäuremethylester **12** wurde nach Aufarbeitung und Reinigung durch Flashchromatographie in 91 % Ausbeute erhalten. Der Charakterisierung diente die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie die Elementaranalyse und ESI-Massenspektrometrie.

Alternativ zur Lemieux-Reaktion mit sich anschließender Reduktion wäre eine Hydrobrierung des allylischen Systems möglich gewesen. Dabei wird ein Trialkylboran mit einer basischen, wäßrigen Lösung von Wasserstoffperoxid unter direkter Bildung einer Hydroxylfunktion oxidiert. Über diese Reaktion wäre im Resultat ein um eine Kohlenstoffeinheit verlängerter Linker an der 3 α -Position eingeführt worden.

Der jetzt vorliegende 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylester **12** wäre direkt in ein Phosphoramidit überführbar, das im Rahmen einer Oligonukleotid-Festphasensynthese am 5'-Ende als letzter, nicht mehr verlängerbarer Baustein gekuppelt werden könnte. Wie bereits erwähnt, führt jedoch die Anwendung von Stickstoffnukleophilen - wie sie für die Abspaltung des Oligonukleotids von der festen Phase verwendet werden - zu unerwünschter Amidbildung. Zum anderen kann die basische Hydrolyse mit Hydroxylbasen nicht bei basenlabilen Oligonukleotiden mit internukleotidischen Alkylphosphonateinheiten durchgeführt werden. Dieser Widerspruch und die Idee, ein Gallensäure-Phosphoramidit mit hoher Kupplungsausbeute zu generieren, führte zur Entwicklung einer neuen Schutzgruppenstrategie für die Säurefunktion.

6.2.3 Schutzgruppenstrategie für die Säurefunktion der Cholsäure

An die Stelle einer basischen Verseifung eines Carbonsäureesters könnte beispielsweise die saure Katalyse eines sterisch anspruchsvollen Esters treten. Die Ester tertiärer Alkohole können basisch nur noch schlecht verseift werden. Dagegen lassen sie sich durch moderate, saure Hydrolyse spalten. Ein Beispiel sind die *tert*-Butylester, die stabil gegenüber milder, basischer Hydrolyse durch Hydrazin oder Ammoniak sind. Die Frage, ob eine saure Katalyse möglich ist, ohne daß es zur Depurinierung des Oligonukleotids kommt, konnte im folgenden Kontrollexperiment geklärt werden (Abb. 6.4).

Zur Synthese von Cholsäure-*tert*-butylester **14** wurde Cholsäure **05** in trockenem Benzol suspendiert und zum Rückfluß erhitzt. Der siedenden Suspension wurde das *N,N*-Dimethylformamid-*di-tert*-butylacetal **13** zugetropft. Nach 4 h Reaktionszeit wurde die Suspension aufgearbeitet. Nach Flashchromatographie konnten 70 % des *tert*-Butylesters isoliert werden, der durch ¹H-NMR-Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie charakterisiert wurde (Widmer, 1983). Abbildung 6.4 zeigt, daß zur säurekatalysierten Hydrolyse des *tert*-Butylesters **14** die Acidität von Essigsäure nicht ausreicht. Mit Ameisensäure hingegen verläuft die Spaltung des Esters glatt. Die Acidität der Ameisensäure wiederum ist die Ursache von Depurinierungsreaktionen an den Purinbasen in Oligonukleotiden. Mit

diesem Ergebnis scheidet auch die säurekatalysierte Hydrolyse als mögliche Alternative zur basischen Verseifung aus. Die Inkubation mit konz. Ammoniak führte erwartungsgemäß nicht zur Hydrolyse des *tert*-Butylesters **14**.

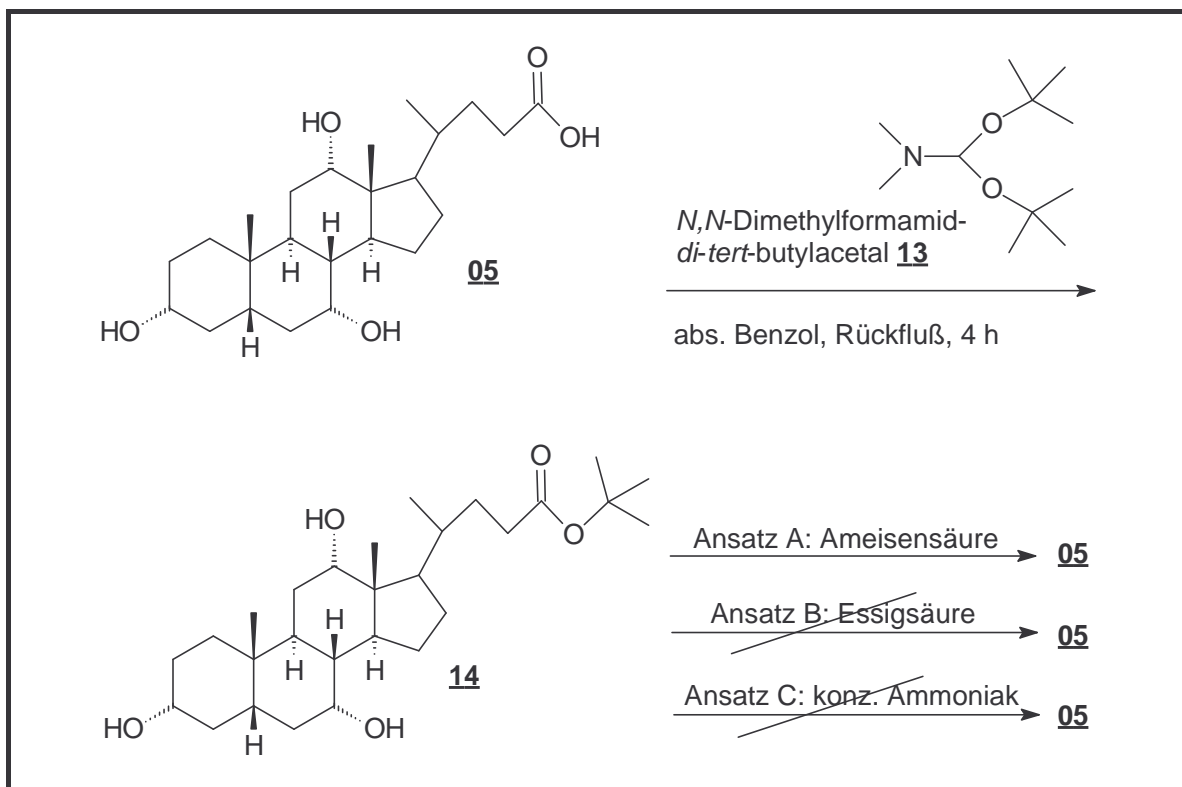


Abb. 6.4: Versuche zur säurekatalysierten Hydrolyse von *tert*-Butylestern

1985 führte Hayakawa den Allylester als Schutzgruppe für die internukleotidische Bindung von Oligonukleotiden ein (Hayakawa, 1985). Die Deallylierung erfolgte unter milden Bedingungen durch kurze Behandlung mit einer Lösung aus 0,05 Äquivalenten Tetrakis(triphenylphosphin)palladium, 0,3 Äquivalenten Triphenylphosphin und einem Überschuß eines Nucleophils wie Butylamin in THF (Hayakawa, 1993). Die Palladium (0) katalysierte Reaktion verläuft über die oxidative Addition des allylischen Substrats unter Austausch zweier Liganden am Palladium. Aus dem intermediär entstehenden π -Allyl-Palladium (II) Komplex wird der Palladium (0) Katalysator durch den Angriff des Nucleophils an einem terminalen Kohlenstoffatom der delokalisierten Allyleinheit regeneriert.

Zur Durchführung eines Kontroll-experiments wurde Cholsäureallylester **15** synthetisiert und unter Palladium (0) Katalyse wieder gespalten. Der Cholsäureallylester **15** war analog der Darstellung von Cholsäuremethylester **06** durch Rühren von Cholsäure **05** in salzsaurem Allylalkohol in 70 % Ausbeute erhältlich. Nach Charakterisierung durch ^1H -NMR-Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie wurde der Cholsäureallylester **15** in

Dichlormethan gelöst und mit dem Abspaltungsreagenz aus 0,1 Äquivalenten Tetrakis-(triphenylphosphin)palladium, 0,1 Äquivalenten Triphenylphosphin und einem fünffachen Überschuß des Nukleophils Diethylammoniumhydrogencarbonat versetzt. Die Spaltung des Allylesters wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach zehn Minuten konnte durch DC nur noch die freie Säure nachgewiesen werden. Damit stand eine geeignete Methode zur selektiven Entschützung der Carbonsäurefunktion zur Verfügung.

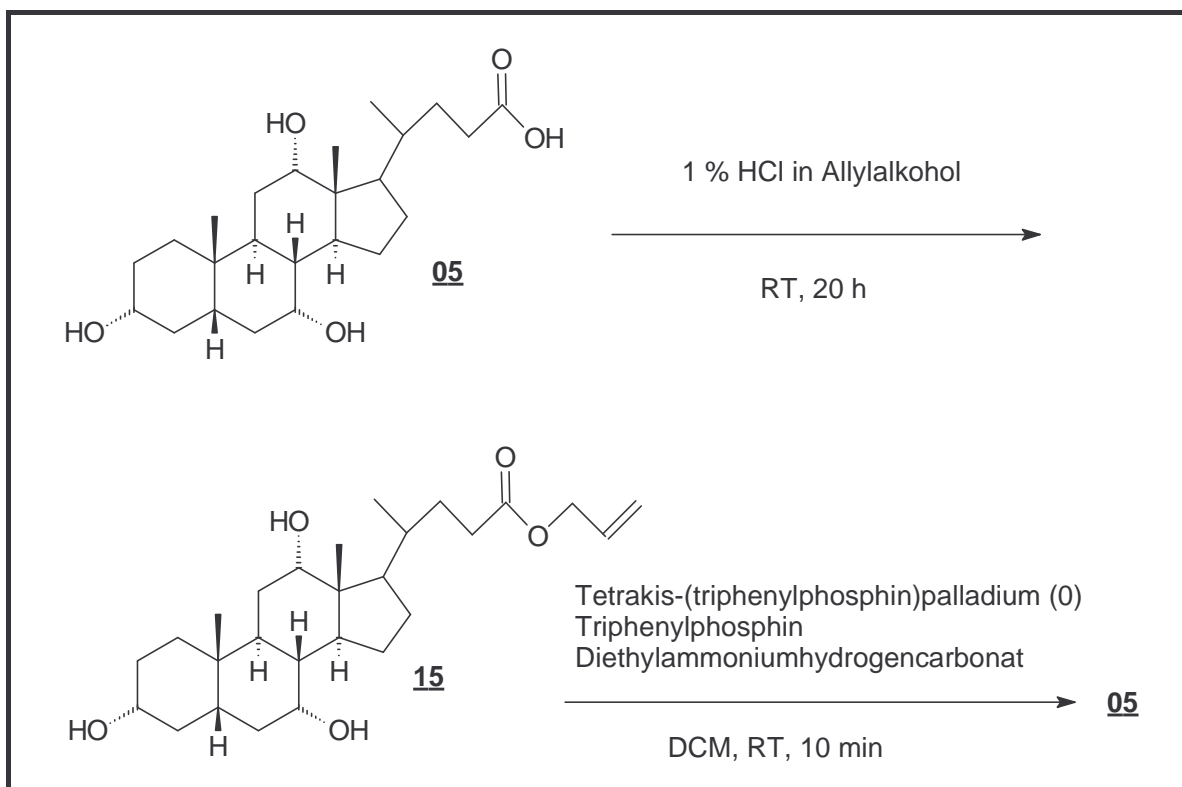


Abb. 6.5: Versuche zur Palladium (0) katalysierten Spaltung von Allylestern

6.2.4 Umsetzung des Allylester-Konzepts

Zur Umsetzung des neuen Schutzgruppenkonzepts muß eine Umesterung des bereits synthetisierten 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylesters **12** erfolgen. Die Umesterung wurde in zwei voneinander unabhängigen Reaktionen durchgeführt, da das verseifte Produkt auch als Ausgangsmaterial für die Taurocholsäurederivatisierung dienen soll, wie in Abschnitt 6.3 gezeigt wird.

Zur basischen Verseifung des Methylesters wurde Verbindung **12** in wenig Acetonitril gelöst und mit einer 0,5 M wäßrigen Kaliumhydroxidlösung versetzt. Nach 150 min war die Esterhydrolyse vollständig. Nach Aufarbeitung und Flashchromatographie konnten

aber lediglich 40 % Ausbeute erzielt werden. Die Charakterisierung der 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäure **16** gelang mit ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie durch ESI-Massenspektrometrie. Aufgrund der Acetylschutzgruppen in 7 α - und 12 α -Position war Verbindung **16** im Gegensatz zur Cholsäure **05** (vgl. Abb. 6.5) in Dichlormethan löslich. Deshalb konnte die Allylierung nach Lösen des Cholsäurederivats **16** in Dichlormethan und Zugabe von 10 Äquivalenten DIPEA und 15 Äquivalenten Allylbromid durchgeführt werden (Jansen, 1990). Nach dem Rühren über Nacht bei RT wurde das Reaktionsgemisch aufgearbeitet und am Chromatotron aufgereinigt. Der resultierende 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäure-allylester **17** wurde in 74 % Ausbeute isoliert und durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie durch ESI-Massenspektrometrie nachgewiesen. Die freie, primäre Hydroxylgruppe des Ethoxylinkers an der 3 α -Position wurde im letzten Reaktionsschritt vor der Festphasensynthese eines Gallensäure-Oligonukleotids in ein kupplungsfähiges Phosphoramidit überführt.

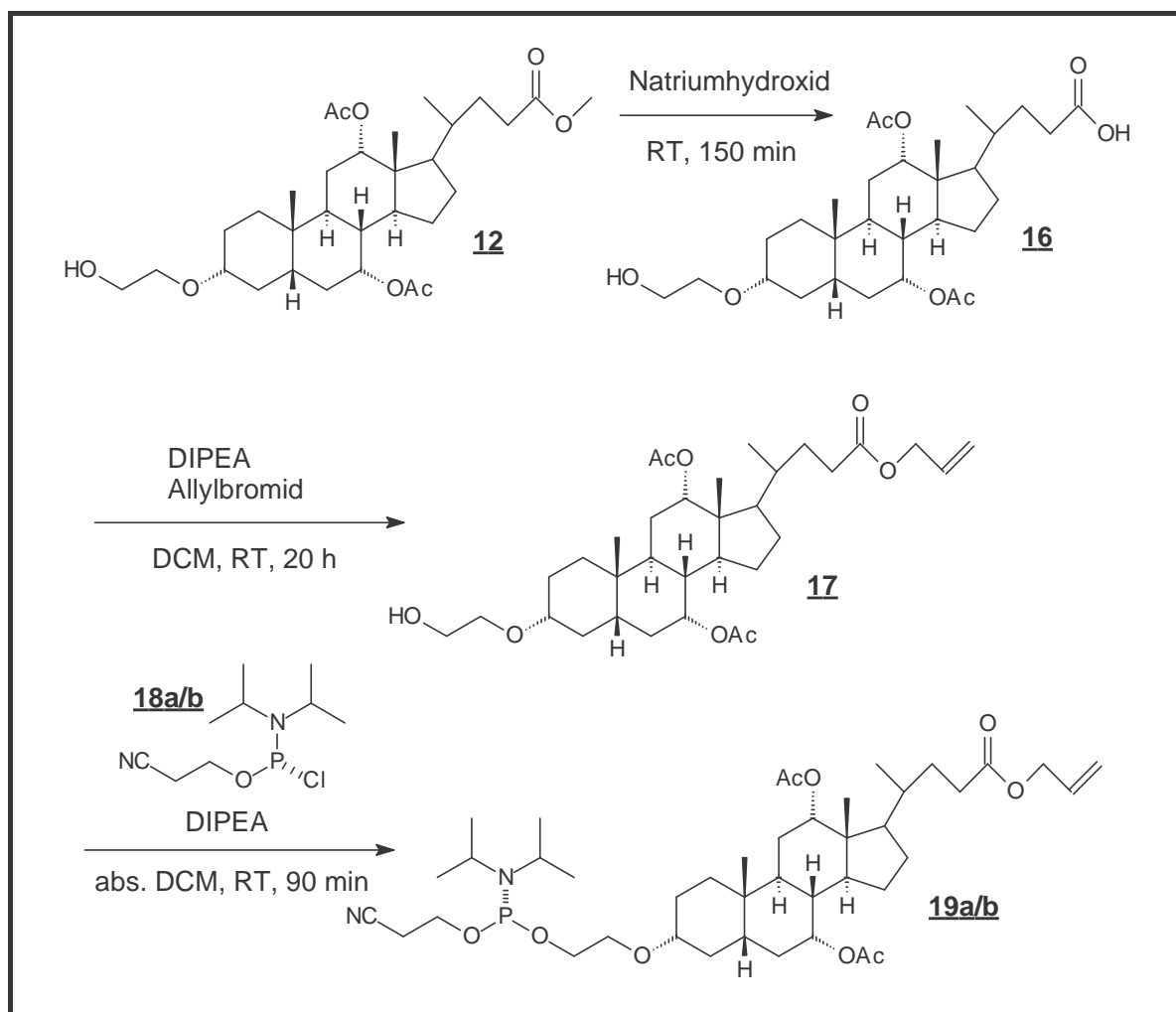


Abb. 6.6: Umesterung und Phosphitylierung eines Cholsäurederivats

Phosphoramidite haben sich sowohl bei der DNA- als auch bei der RNA-Synthese bewährt und sind heute die am häufigsten verwendeten Bausteine für die Oligonukleotid-Festphasensynthese. Für unmodifizierte DNA- oder RNA sind Phosphoramidite der verschiedenen Nucleoside mit Kupplungsausbeuten > 99 % kommerziell erhältlich. Phosphoramidite bestehen chemisch gesehen aus einem dreiwertigen Phosphor mit einer *N,N*-Diisopropylaminogruppe als auszutauschender Amiditkomponente und einem β -Cyanoethylrest als Schutzgruppe (Adams, 1983).

Aufgrund der leichten Aktivierbarkeit von Phosphoramiditen stellt die Phosphitylierung zumeist den letzten Reaktionsschritt bei der Synthese neuer, nicht kommerziell erhältlicher Bausteine dar. Im Falle des 3α -(2-Hydroxyethoxy)- $7\alpha,12\alpha$ -diacetylcholsäureallylesters **17** mußte die freie Hydroxylgruppe des Ethoxylinkers phosphityliert werden. Die Standardmethode ist die Reaktion einer Hydroxylgruppe mit Phosphorigsäuremono-(2-cyanethylester)-diisopropylamidchlorid (auch: 2-Cyanethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit) **18a/b** (Sinha, 1983) in trockenem Dichlormethan in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin (Hünigs Base) bei Raumtemperatur (Beaucage, 1981; McBride, 1983; Gait, 1984; Eckstein, 1991).

Zur Durchführung der Phosphitylierung wurde 3α -(2-Hydroxyethoxy)- $7\alpha,12\alpha$ -diacetylcholsäureallylester **17** im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Nach dem Lösen in trockenem Dichlormethan unter Schutzgasatmosphäre wurden 4 Äquivalente DIPEA sowie 1,5 Äquivalente des Phosphitylierungsreagenzes **18a/b** zugegeben. Die Lösung wurde 90 min bei RT gerührt und dann aufgearbeitet. Das Phosphoramidit **19a/b** wurde nach Flashchromatographie mit einer Reinheit von >90 % aller phosphorhaltigen Produkte durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Zusätzlich erfolgte die Charakterisierung durch ^1H -Spektroskopie sowie durch ESI-Massenspektrometrie.

Das synthetisierte Phosphoramidit **19a/b** ließ sich in trockenem Acetonitril lösen und nach Aktivierung durch 1*H*-Tetrazol am 5'-Ende eines Oligonukleotids ankuppeln. Nach Palladium (0) katalysierter Spaltung des Allylesters wurde das Oligonukleotid innerhalb von 24 h durch Inkubation mit konz. Ammoniaklösung vom Träger gespalten und entschützt. Nach dessen Aufreinigung durch RP-HPLC ergab jedoch die massenspektrometrische Analyse, daß sich wider Erwarten die Acetylschutzgruppen in der 7α - und 12α -Position nicht abspalten ließen. Auch eine Erhöhung der Abspalttemperatur auf 55 °C für 24 h verlief erfolglos. Ebenso wenig erfolgreich war die Verwendung von ammoniakalischem Methanol oder die Inkubation mit DBU in Methanol. Während sich in 2'- und 3'-Position acetylierte Ribose problemlos ammoniakalisch deacetylieren läßt, scheint die mit

der schlechten räumlichen Zugänglichkeit korrelierende niedrige Reaktivität der 7 α - und 12 α -Hydroxylfunktion eine Deacetylierung unter Abspaltbedingungen für Oligonukleotide zu verhindern. Dies macht die Suche nach einer alternativen Schutzgruppenstrategie für diese Positionen erforderlich. Oder sollte die niedrige Reaktivität dieser Hydroxylgruppen sogar einen Verzicht auf Schutzgruppen ermöglichen ?

6.2.4.1 Lösung der Schutzgruppenproblematik für die 7 α - und 12 α -Hydroxylgruppe

Der Versuch, die 7 α - und 12 α -Hydroxylgruppe ungeschützt in der Phosphitylierungsreaktion und später in der Oligonukleotidsynthese an der festen Phase einzusetzen, stellt zunächst die einfachste Lösung des Schutzgruppenproblems dar, da diese Positionen vor der Einführung einer anderen Schutzgruppe sowieso entschützt werden müssen. Bei diesem Konzept besteht aber die Gefahr der Mehrfachphosphitylierung bei der Phosphitylierungsreaktion und bei der Synthese an der festen Phase können Kupplungsreaktionen an den freien Hydroxylgruppen auftreten. Die Einführung einer primären Hydroxylgruppe über einen Ethoxy-Linker an der 3 α -Position läßt jedoch eine hohe Regioselektivität der Phosphitylierung bei Einhaltung entsprechender Reaktionsbedingungen und Reaktionszeiten an der 3 α -Position erwarten..

Zuerst mußte der 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylester **12** vollständig entschützt werden. Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten: Die Deacetylierung und die anschließende Verseifung des Methylesters. Zur Deacetylierung wurde die Verbindung **12** in trockenem Methanol gelöst und mit 5,4 M Natriummethanolat-Lösung versetzt, bis eine 0,5 M Lösung vorlag. Unter dünnschichtchromatographischer Kontrolle wurde das Reaktionsgemisch für 5 h zum Siedepunkt erwärmt. Es wurde etwas Natriummethanolat-Lösung nachdosiert und nach einer weiteren Stunde unter Rückfluß war die Deacetylierung vollständig. Die Zwischenverbindung wurde nach Zugabe von Wasser in der erhaltenen Natriumhydroxid-Lösung verseift. Diese Reaktion war nach 18 h Rühren bei RT beendet. Aufgrund der bereits diskutierten Löslichkeitsprobleme der Cholsäure **05** mußte bei der Aufarbeitung von 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxycholsäure **20** mit ähnlichen Schwierigkeiten gerechnet werden. Nach dem Entfernen des Methanols durch Destillation wurde der Rückstand in heißem Wasser gelöst und mit halbkonz. Salzsäure angesäuert. Die ölige Phase aus freier Säure wurde nach dem Überführen der Wasserphase in einen Scheidetrichter in heißem Chloroform gelöst. Die Wasserphase wurde

noch dreimal mit heißem Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet und eingengt. Die rohe Säure ließ sich aus siedendem Chloroform umkristallisieren. Das Produkt **20** wurde in 80 % Ausbeute als 1:1 Adukt mit Chloroform erhalten, wie die Elementaranalyse ergab. Die weitere Charakterisierung erfolgte mit ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie ESI-Massenspektrometrie. Im Gegensatz zur alleinigen Verseifung des Methylesters **12**, die nur zu 40 % Ausbeute führte, ergab die vollständige Entschüttung zu Cholsäurederivat **20** eine Ausbeutesteigerung auf 80 %.

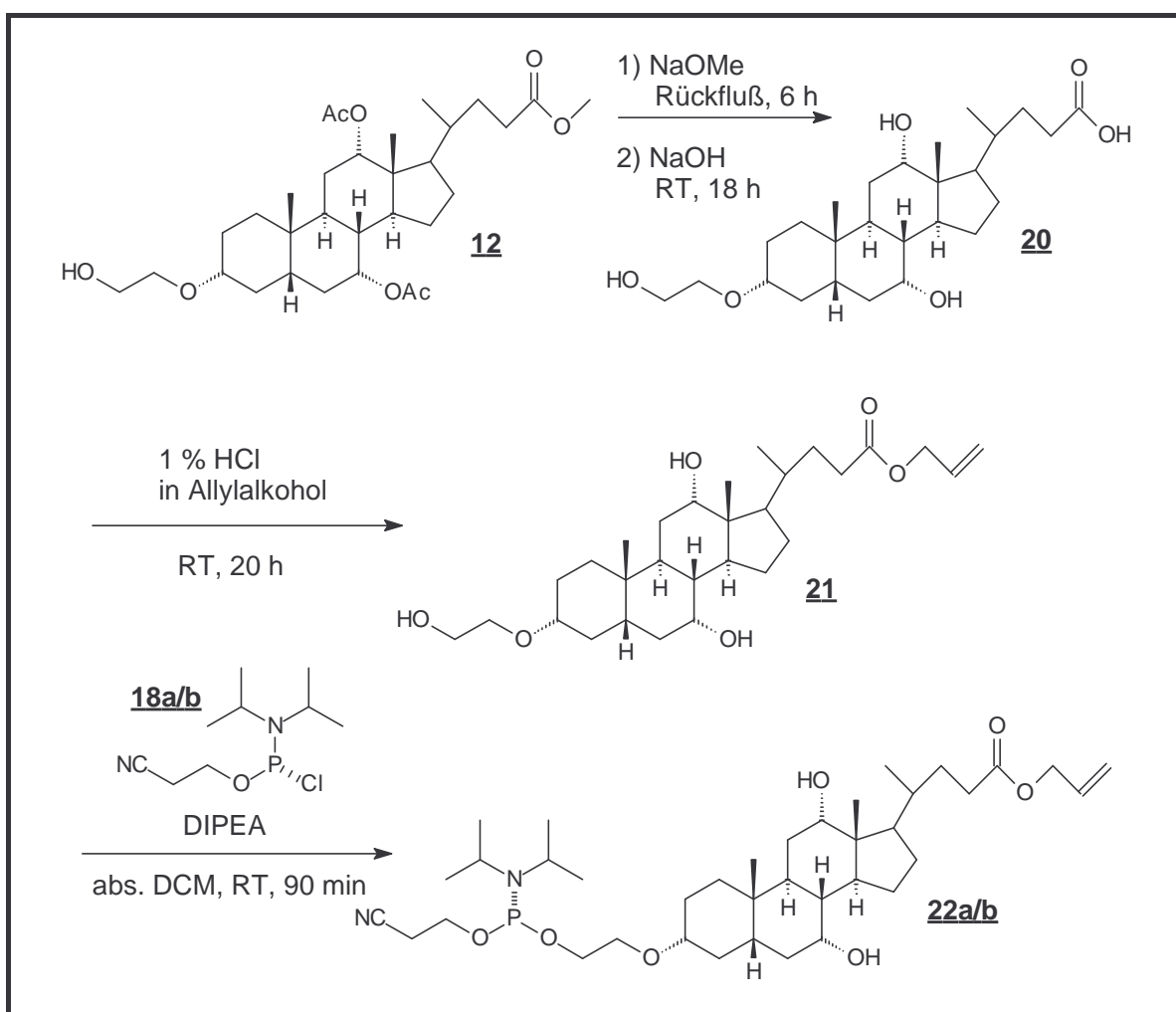


Abb. 6.7: Synthese des Phosphoramidits **22a/b** der Cholsäure

Die Veresterung von 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxycholester **20** zum Allyl-ester konnte aufgrund der veränderten Löslichkeitseigenschaften gegenüber der diacetylierten Verbindung **16** nicht in Dichlormethan mit DIPEA und Allylbromid erfolgen. Vielmehr mußte auf die saure Veresterung in Allylalkohol zurückgegriffen werden. Hierzu wurde Verbindung **20** in frisch destilliertem Allylalkohol gelöst, mit HCl angesäuert und

für 20 h bei RT gerührt. Nach Aufarbeitung und Aufreinigung am Chromatotron wurde der 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxycholsäureallylester **21** in 80 % Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung von **21** wurde mit Hilfe der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie mittels Elementaranalyse und ESI-Massenspektrometrie vorgenommen.

Zur Phosphitylierung wurde die Trihydroxyverbindung **21** im evakuierten Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon als Schutzgas wurde **21** in trockenem Dichlormethan gelöst und mit 4 Äquivalenten Hünigs Base versetzt. Um eine Mehrfachphosphitylierung zu unterdrücken, durfte nur ein geringer Überschuss an Phosphitylierungsreagenz **18a/b** möglichst langsam zugegeben werden. Deshalb wurden nur 1,1 Äquivalente des Phosphorigsäuremono-(2-cyanethylester)-diisopropylamidchlorids **18a/b** tropfenweise zugegeben. Nach 90 min Rühren bei RT wurde die Reaktion abgebrochen und aufgearbeitet. Das Phosphoramidit **22a/b** ließ sich jedoch nicht wie die diacetylierte Verbindung durch Flashchromatographie an Kieselgel aufreinigen. Dies ist ein Hinweis auf die erhöhte Labilität des Phosphoramidits **22a/b**, das möglicherweise durch schwach saure Bedingungen aktiviert in Lösung dimerisieren kann. Aus diesen Gründen wurde das rohe Produkt zur Oligonukleotidsynthese an der festen Phase eingesetzt. Die Charakterisierung des rohen Phosphoramidits **22a/b** durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie ergab eine Reinheit von >85 % aller phosphorhaltigen Produkte. Eine oxidierte Substanz konnte neben kleineren Verunreinigen als Hauptverunreinigung detektiert werden. Im Bereich der Produktsignale konnte kein Hinweis auf eine Phosphitylierung der 7 α - oder 12 α -Hydroxylgruppe gefunden werden, auch wenn die chemischen Verschiebungen der phosphitylierten, sekundären Hydroxylgruppen sich nicht sehr stark von den Produktsignalen unterscheiden sollten. Ein Vergleich der ^{31}P -NMR-Spektren des diacetylierten Phosphoramidits **19a/b** mit Phosphoramidit **22a/b** zeigte keine auffälligen Unterschiede. Das ^{31}P -NMR Spektrum von Verbindung **22a/b** ist im Anhang (Kap. 14.1) abgebildet. Zusätzlich wurde eine Charakterisierung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie vorgenommen. Die massenspektrometrische Analyse zeigte außerdem, daß kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden war und allenfalls Spuren von zweifach phosphityliertem Produkt entstanden waren. Aus diesen Gründen wurde das rohe Phosphoramidit **22a/b** an das 5'-Ende eines Antisense Oligonukleotids nach 1*H*-Tetrazol Aktivierung angekuppelt. Wie noch gezeigt wird, verlief die Kupplung ohne weitere Reaktion an den ungeschützten 7 α - oder 12 α -Hydroxylgruppen. In Abbildung 6.8 ist der Syntheseweg zu Phosphoramidit **22a/b** nochmals übersichtlich dargestellt.

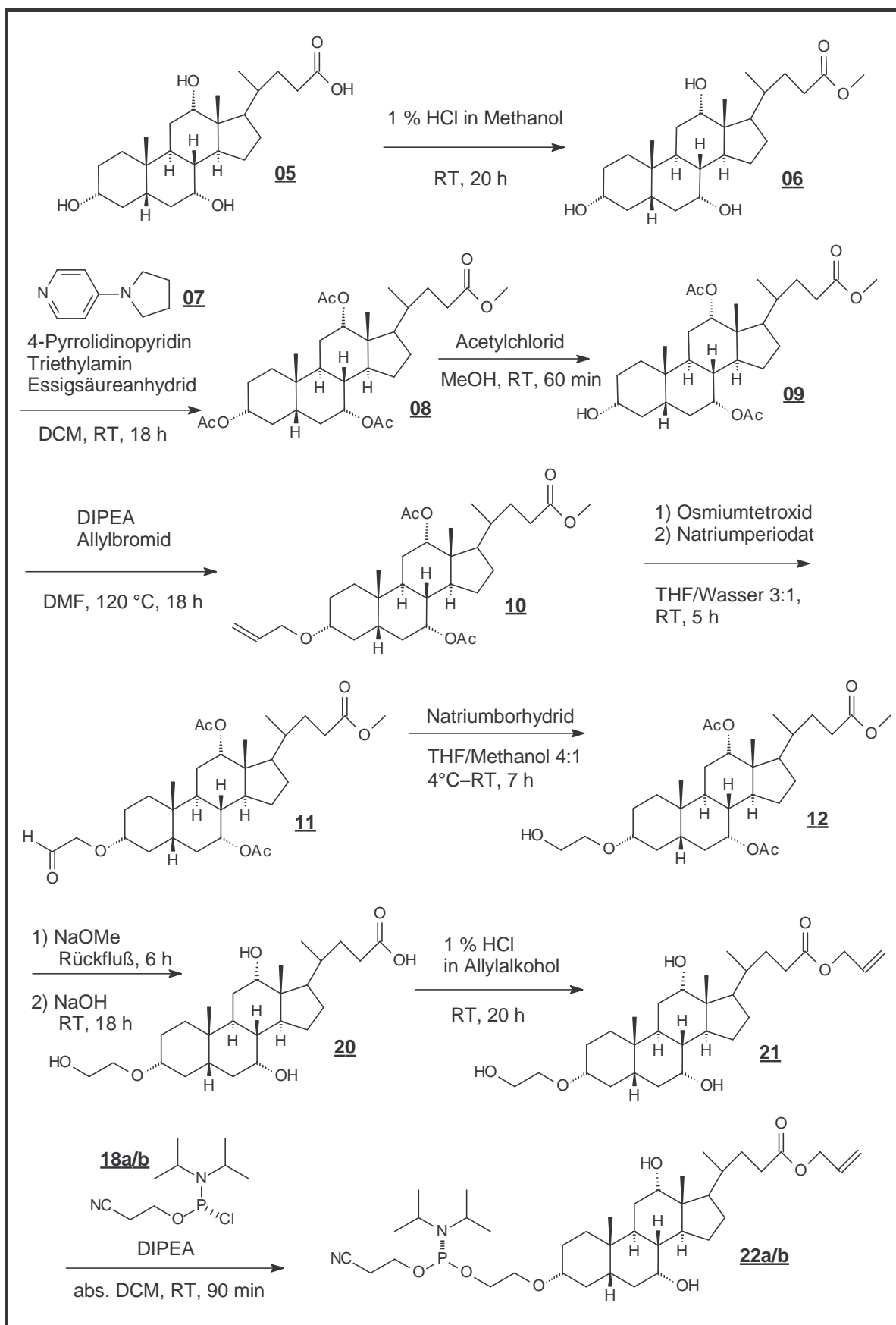


Abb. 6.8: Vollständige Synthese zum Phosphoramidit der Cholsäure **22a/b**

6.3 Darstellung von Taurocholsäurederivaten für die Festphasensynthese

Die Darstellung eines Taurocholsäure-Phosphoramidits kann prinzipiell mit einer analogen Synthese wie für die Cholsäure gezeigt erfolgen. Da dies mit einem hohen synthetischen Aufwand verbunden ist und Taurocholsäure als Ausgangsmaterial außerdem sehr teuer ist, stellt sich die Frage, ob die Säurefunktion der Cholsäure zu einem möglichst späten Zeitpunkt in der Abfolge der Reaktionen zu einem Taurocholsäurederivat amidiert werden kann. Die völlig geschützte Verbindung 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxycholsäure **20** ist eine geeignete Zwischenverbindung, um eine Amidierung durchzuführen. Verbindung **20** unterscheidet sich von der Cholsäure **05** lediglich durch einen kurzen Linker an der 3 α -Position. Da alle Funktionalitäten identisch sind, können Testreaktionen zur Amidierung an käuflicher Cholsäure vorgenommen werden.

Um Taurocholsäure aus Cholsäure zu erhalten, muß die Carbonsäurefunktion der Cholsäure mit Taurin (2-Aminoethansulfonsäure) **23** amidiert werden. Somit unterscheiden sich diese beiden Gallensäuren chemisch gesehen in ihren Seitenketten: Taurocholsäuren besitzen eine Sulfonsäurefunktion, die ebenfalls mit einer geeigneten Schutzgruppe versehen werden muß. Sulfonsäureester werden unter *O*-Alkylspaltung verseift und sind im Gegensatz zu den Carbonsäureestern gute Alkylierungsmittel. Die höhere Elektrophilie des α -C-Atoms eines Sulfonsäureesters gegenüber dem Schwefel der Sulfonsäuregruppe ermöglicht die Spaltung des Esters zum Beispiel mit Stickstoffnucleophilen, wie sie bei der Abspaltung und Entschützung von Oligonukleotiden ohnehin verwendet werden (Musicki, 1991). Ein am 5'-Ende gekuppelter Sulfonsäureester läßt sich somit ohne zusätzliche Entschützungsschritte spalten. Die wichtigsten Methoden zur Darstellung von Sulfonsäureestern aus Sulfonsäuren sind in Abbildung 6.9 dargestellt.

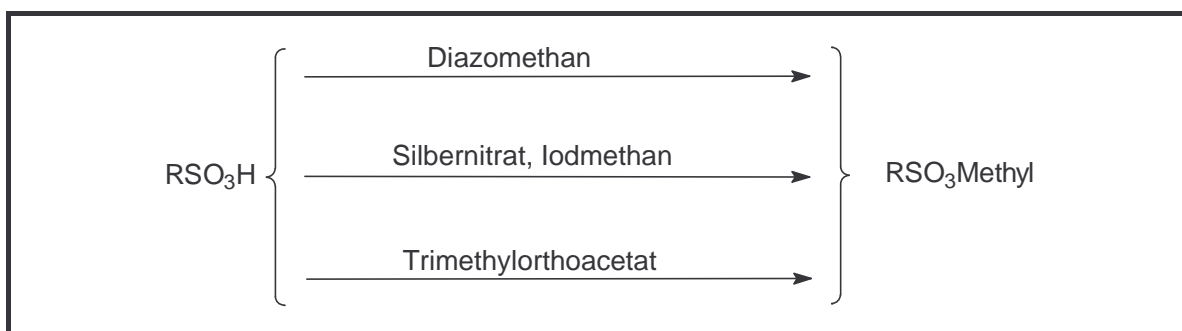


Abb. 6.9: Möglichkeiten der Synthese von Sulfonsäureestern

Sulfonsäuren lassen sich mit Diazomethan hervorragend in die entsprechenden Methylester überführen. Nachteilig beim Umgang mit Diazomethan (Sdp. $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$) sind seine hohe Toxizität, seine Kancerogenität und seine Explosionsfähigkeit. Deshalb wurden zunächst andere Methoden getestet. Die Überführung von Sulfonsäuren in ihre Silbersalze erhöht häufig deren Löslichkeit in Acetonitril, so daß mit Hilfe von Alkylierungsreagenzien die Veresterung ermöglicht wird (Emmons, 1953; Ninomiya, 1984; Lepoittevin, 1992). Dieses Verfahren wurde auf Taurin und auf Fmoc geschütztes Taurin angewendet. Die Ausbeuten an Produkt waren aber jeweils gering. Ebenso verhielt es sich, wenn man ein Taurocholsäurederivat auf diese Weise verestern wollte. Erfolgreicher verlief die Umsetzung von Taurin mit Orthoestern. Taurin wurde in Triethylorthoacetat suspendiert und 46 h zum Rückfluß ($142\text{ }^{\circ}\text{C}$) erwärmt (Padmapriya, 1985; Trujillo, 1993). Danach wurden feste Bestandteile abfiltriert und alle Lösungsmittel abdestilliert. Das resultierende, bräunliche Öl enthielt den gewünschten 2-Aminoethansulfonsäureethylester **24**, wie durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie gezeigt werden konnte. Aufreinigung des Rohprodukts führte zur Zersetzung des Esters. Es zeigte sich, daß die Nebenprodukte die Amidierung nicht beeinträchtigten. Vor jeder Amidierung wurde der 2-Aminoethansulfonsäureethylester **24** frisch hergestellt. Nach Etablierung dieser Methode wurde die Veresterung mit Diazomethan nicht weiter verfolgt.

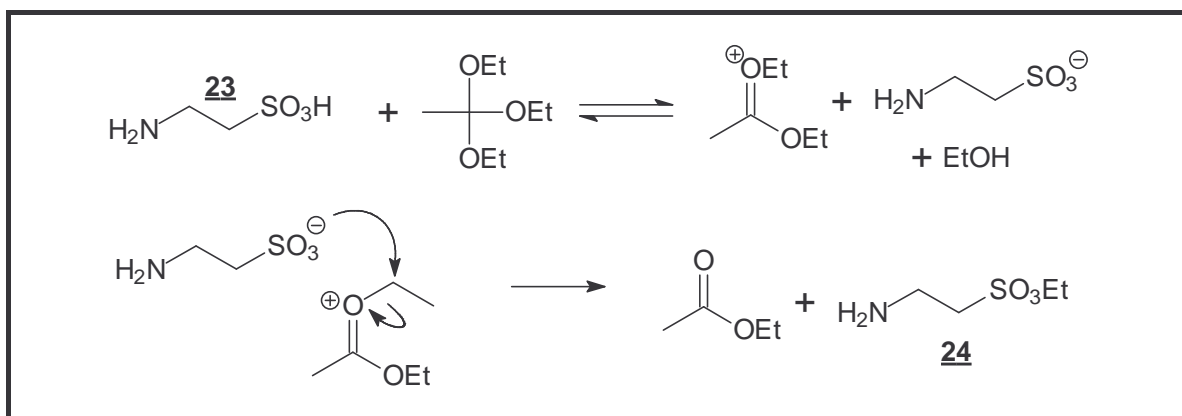


Abb. 6.10: Angenommener Mechanismus für die Veresterung von Sulfonsäuren mit Orthoestern (Trujillo, 1993)

Die Amidkupplung des 2-Aminoethansulfonsäureethylesters **24** wurde zunächst an Cholsäure optimiert. Anschließend wurde die Methode auf die 3α -(2-Hydroxyethoxy)- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxycholsäure **20** übertragen. Zur Durchführung der Amidkupplung wurde das Cholsäurederivat **20** in trockenem Dioxan suspendiert. Nach Zugabe von *n*-Tributylamin löste sich die Säure rasch auf. Nach 30 min wurde Chlorameisensäureethylester zugetropft und

45 min bei RT gerührt. Das resultierende gemischte Anhydrid wurde mit einer Lösung des rohen 2-Aminoethansulfonsäureethylesters **24** gelöst in Dioxan/Wasser versetzt. Nach anfänglicher Gasentwicklung wurde noch 75 min weitergerührt (Norman, 1955). Nach Aufarbeitung und Flashchromatographie wurde der 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxytaurocholsäureethylester **26** in 82 % Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie durch Elementaranalyse und ESI-Massenspektrometrie.

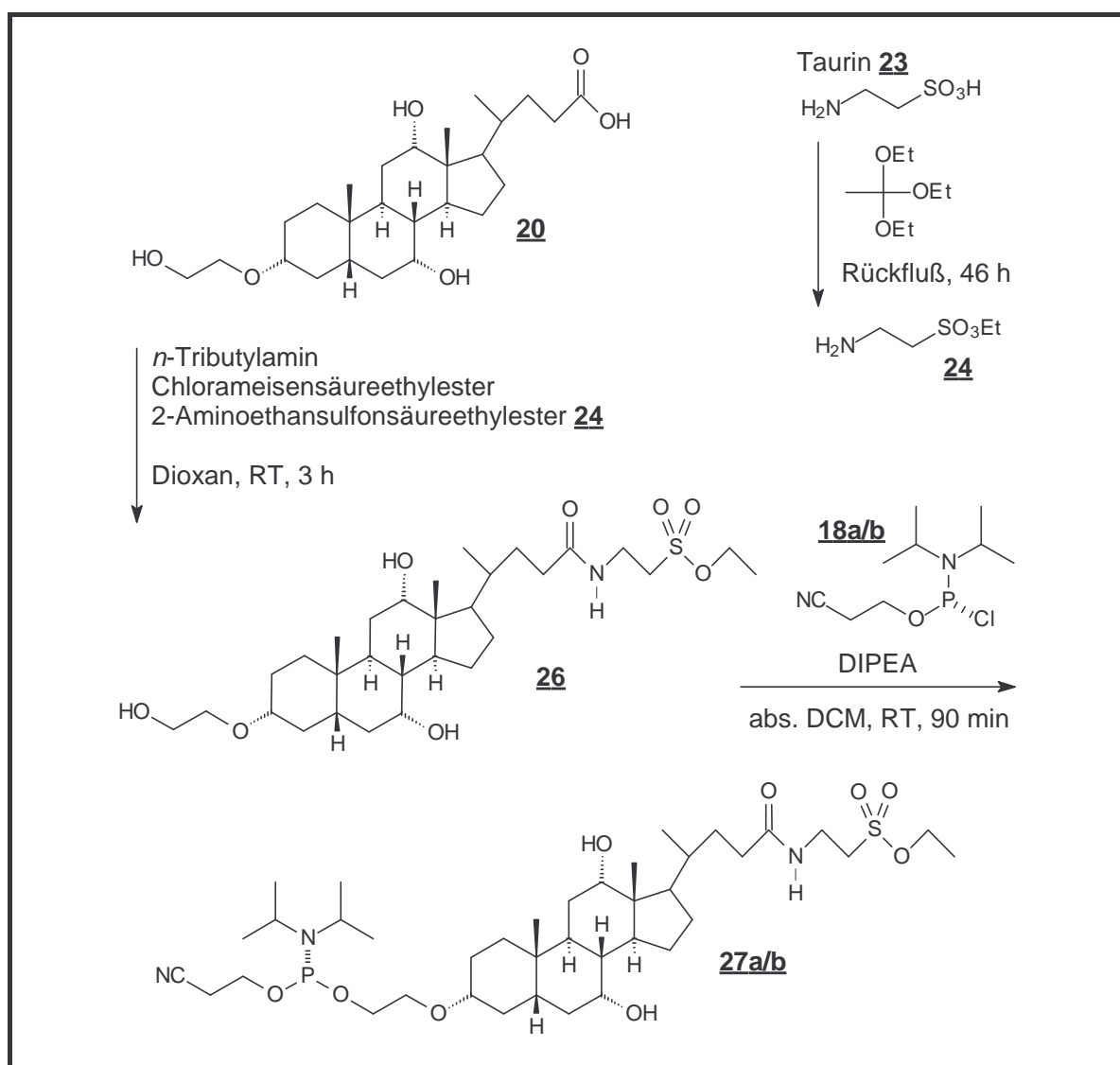


Abb. 6.11: Synthese des Phosphoramidits **27a/b** der Taurocholsäure

Betrachtet man die gesamte Synthese der beiden Phosphoramidite **22** und **27a/b**, so ist die zuletzt beschriebene Amidkupplung die einzige abweichende Reaktion. Synthetisch besonders wertvoll ist die im Syntheseverlauf späte Derivatisierung zur Taurocholsäure. Der

in Analogie zum Allylester **21** dargestellte Sulfonsäureethylester **26** kann nun unmittelbar phosphityliert werden.

Für die Phosphitylierung des 3α -(2-Hydroxyethoxy)- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxytaurocholsäureethylesters **26** gelten die gleichen Bedingungen wie für die bereits diskutierte Phosphitylierung des 3α -(2-Hydroxyethoxy)- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxycholsäureallylesters **21**. Die Trihydroxyverbindung **26** darf nur mit einem geringen Überschuß an Phosphitylierungsreagenz versetzt werden und die Zugabe muß portionsweise geschehen. Das über Phosphorpentoxid im evakuierten Exsikkator getrocknete Taurocholsäurederivat **26** wurde unter Argon in Dichlormethan gelöst und mit 4 Äquivalenten DIPEA versetzt. Tropfenweise wurden 1,1 Äquivalente des Phosphorigsäuremono-(2-cyanethylester)-diisopropylamidchlorids **18a/b** zugegeben. Nach 90 min Rühren bei RT wurde die Reaktion abgebrochen und aufgearbeitet. Das rohe Phosphoramidit **27a/b** ließ sich ebenfalls nicht ohne Zersetzung aufreinigen und wurde deshalb als gut getrocknetes Rohprodukt in der Oligonukleotidsynthese eingesetzt. Die Reinheit lag bei >75 % aller phosphorhaltigen Verbindungen, wie die Interpretation eines ^{31}P -NMR-Spektrums des Rohprodukts ergab. Besonders im tieffeldigen Bereich der dreiwertigen Phosphorverbindungen war eine größere Zahl an Nebenprodukten entstanden. Die weitere Charakterisierung erfolgte durch ^1H -NMR-Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie.

Damit ist die Synthese kupplungsfähiger Phosphoramidite der Gallensäuren Cholsäure und Taurocholsäure abgeschlossen. Im nächsten Abschnitt werden die Synthesewege zu analogen Cholesterol-Phosphoramiditen beschrieben.

6.4 Darstellung von analogen Cholesterol-Phosphoramiditen

Die Einführung eines 2-Hydroxyethoxylinkers über die 3β -Position des Cholesterols erfolgte wie in Kapitel 6.2.2 beschrieben in Analogie zu den Gallensäurederivaten. Dabei wurde der an der 3α -Position eingeführte Allylether oxidativ gespalten und der resultierende Aldehyd zum Alkohol reduziert (Wess, 1992). Dieser Reaktionsverlauf kann neben der gewünschten Spaltung der Allylfunktion zur oxidativen Spaltung der 5,6-Doppelbindung des Cholesterols führen (Schröder, 1980). Trotz dieser zu erwartenden Nebenreaktion sind Alternativen rar. Die von Galynker und Still beschriebene Tosylierung unter Inversion der 3β -Hydroxylgruppe verläuft beim Cholesterol vermutlich durch den Einfluß des homoallylischen Systems unter Retention (Galynker, 1982). Die anschließende

Substitution mit Glykol wiederum unter Inversion hätte zur gewünschten 3 β -Konfiguration geführt (Davis, 1962). Dieser Schritt verläuft beim Cholesterol bedingt durch das homoallylische System in guten Ausbeuten. Während für die Gallensäuren die Tosylierung nach Galynker glatt unter Inversion verläuft, ergibt in diesem Fall die Alkoholyse durch Glykol vermutlich aufgrund der fehlenden 5,6-Doppelbindung nur geringe Ausbeuten, so daß diese Methode bei den Gallensäurederivaten auch nicht zur Anwendung kam (Wess, 1992).

6.4.1 Einführung des 2-Hydroxyethoxy-Linkers analog zur Cholsäurederivatisierung

Cholesterol **28** besitzt im Gegensatz zu den Gallensäuren eine axiale 3 β -Hydroxylgruppe. Abgesehen von der 5,6-Doppelbindung sind keine weiteren Funktionalitäten vorhanden. Die Darstellung des 3 β -Allylethers konnte direkt mit kommerziell erhältlichem Cholesterol begonnen werden. In Analogie zur Veretherung des geschützten Cholsäurederivats **09** wurde Cholesterol **28** in trockenem DMF gelöst und nach Zugabe eines zwanzigfachen Überschusses an DIPEA und Allylbromid für 18 h bei 120 °C gerührt. Nach Aufarbeitung, Aufreinigung durch Flashchromatographie und Umkristallisation aus Ethanol konnten 67 % des 3 β -Allylether-cholesterols **29** erhalten werden. Die Charakterisierung erfolgte durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie sowie mit Hilfe der ESI-Massenspektrometrie und Elementaranalyse.

Die oxidative Spaltung des Allylethers **29** erfolgte ebenfalls in Analogie zur Spaltung des Cholsäurederivats, wobei durch eine mögliche Hydroxylierung der 5,6-Doppelbindung des Cholesterols die Gefahr von Nebenreaktionen gegeben ist. Das 3 β -Allylether-cholesterol **29** wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus THF/Wasser = 3:1 gelöst und mit einer katalytischen Menge Osmiumtetroxid gelöst in *tert*-Butanol versetzt. Nach portionsweiser Zugabe von 2,5 Äquivalenten Natrium(meta)periodat wurde insgesamt 5 h bei RT gerührt. Obwohl die Umsetzung nach dünnschichtchromatographischer Analyse nicht vollständig war, wurde abgebrochen, um die Wahrscheinlichkeit einer Hydroxylierung der 5,6-Doppelbindung nicht zu erhöhen. Nach Aufarbeitung und Flashchromatographie konnten 28 % des Edukts **29** reisoliert werden. Außerdem wurden 41 % des gewünschten 3 β -(Ethan-2-yl-1-ether)-cholesterols **30** erhalten. Die Ausbeutedifferenz zu 100 % liegt in der gleichen Größenordnung wie die des reisolierten Edukts. Dies deutet auf zusätzlichen Verbrauch an Oxidationsmittel durch *cis*-Hydroxylierung der 5,6-Doppelbindung hin, obwohl dieses Nebenprodukt nicht nachgewiesen werden konnte. Die Charakterisierung von

Aldehyd **30** gelang mit Hilfe der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie ESI-Massenspektrometrie und Elementaranalyse.

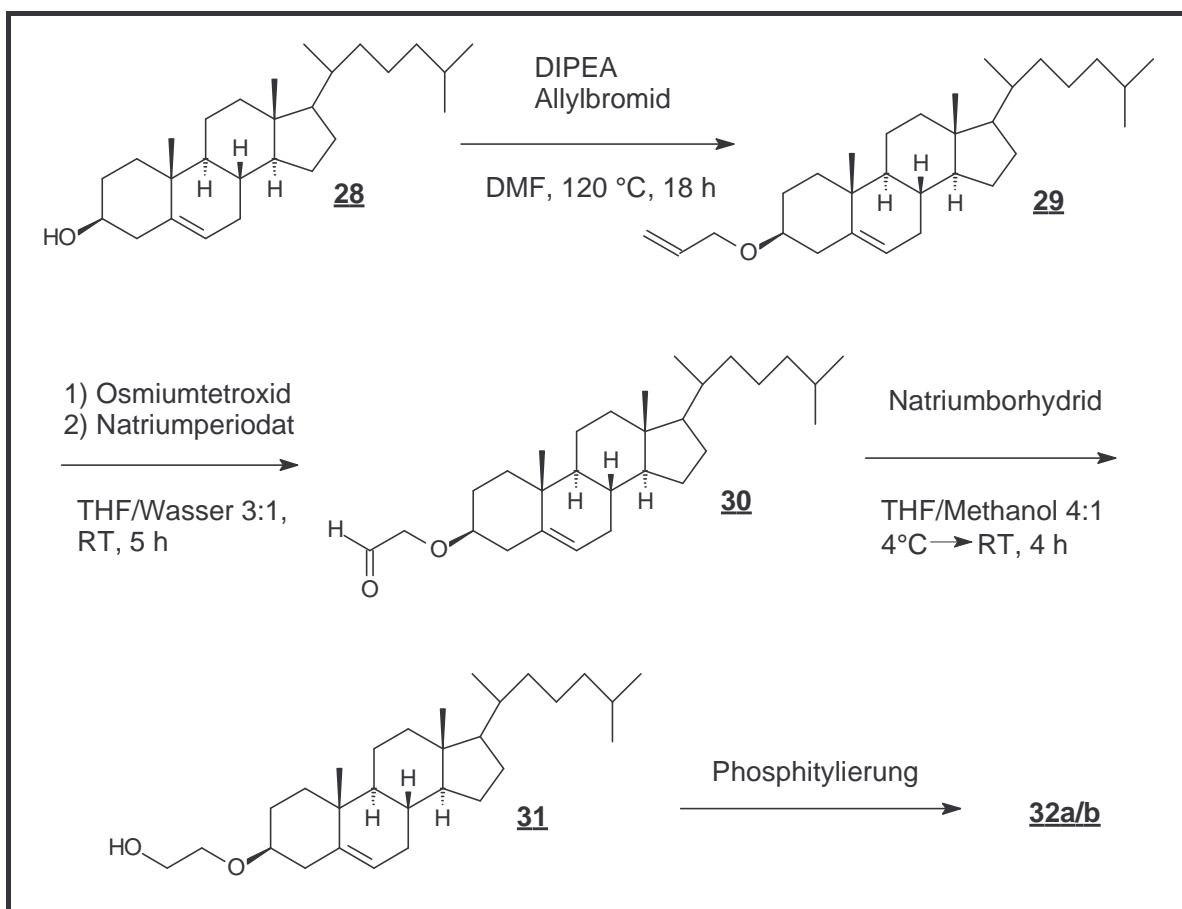


Abb. 6.12: Einführen eines 2-Hydroxyethoxy-Linkers über die 3 β -Position

Die anschließende Reduktion des Aldehyds **30** mit 0,5 Äquivalenten Natriumborhydrid in THF/Methanol = 4:1 war nach vierstündigem Rühren bei RT abgeschlossen. Nach Aufarbeitung wurde das Rohprodukt aus Methanol umkristallisiert und anschließend durch Flashchromatographie aufgereinigt. Das 3 β -(2-Hydroxyethoxy)-cholesterol **31** wurde in 91 % Ausbeute erhalten und durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie ESI-Massenspektrometrie und Elementaranalyse charakterisiert. Die Gesamtausbeute dieser aus drei Schritten bestehenden Reaktionsfolge betrug insgesamt 25 %.

6.4.2 Phosphitylierung des 3 β -(2-Hydroxyethoxy)-cholesterols

Die Phosphitylierung des 3 β -(2-Hydroxyethoxy)-cholesterols **31** zum kupplungsfähigen Phosphoramidit erfolgt unter ähnlichen Bedingungen wie für die Gallensäuren beschrie-

ben. Im Unterschied zu den Phosphoramiditen der Gallensäuren erhöhen die fehlenden, ungeschützten Funktionalitäten die chemische Stabilität des Phosphoramidits. Dadurch kann die Reaktion mit einem größeren Überschuß an Phosphitylierungsreagenz durchgeführt werden und die chromatographische Aufreinigung dieses Phosphoramidits wird möglich.

Zur Phosphitylierung wurde Alkohol **31** im evakuierten Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon wurde das Cholesterolderivat in Dichlormethan gelöst und mit 4 Äquivalenten DIPEA versetzt. Tropfenweise wurden 1,5 Äquivalente des Phosphorigsäuremono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamidchlorids **18a/b** zugegeben. Nach 90 min Rühren bei RT wurde die Reaktion abgebrochen und aufgearbeitet. Das rohe 3β -[(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy]-cholesterol **32a/b** wurde am Chromatotron aufgereinigt. Es konnten 94 % eines weißen, amorphen Pulvers isoliert werden. Die Charakterisierung gelang mit ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie sowie mit ESI-Massenspektrometrie.

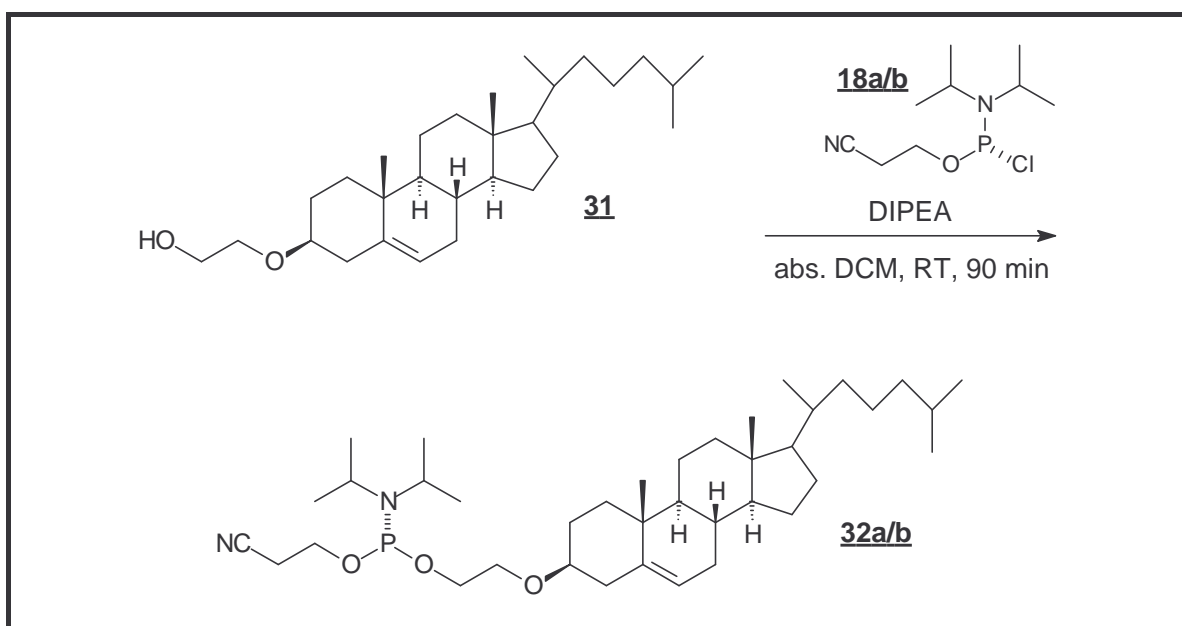


Abb. 6.13: Synthese des Phosphoramidits **32a/b** des Cholesterols

Mit der Darstellung des Cholesterol-Phosphoramidits **32a/b** liegen nun drei unterschiedliche Phosphoramidite vor, die unter Standardbedingungen an das 5'-Ende eines an fester Phase immobilisierten Oligonukleotids gekuppelt werden können. Für die Cholsäure modifizierten Oligonukleotide wurden zur Entschützung der als Allylester vorliegenden Carbonsäurefunktion geeignete Abspaltbedingungen entwickelt. In Abbildung 6.14 ist eine

Übersicht der neuen Phosphoramidite mit ihren phosphorchemischen Verschiebungen gegeben. Im folgenden Abschnitt wird die automatisierte Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden besprochen.

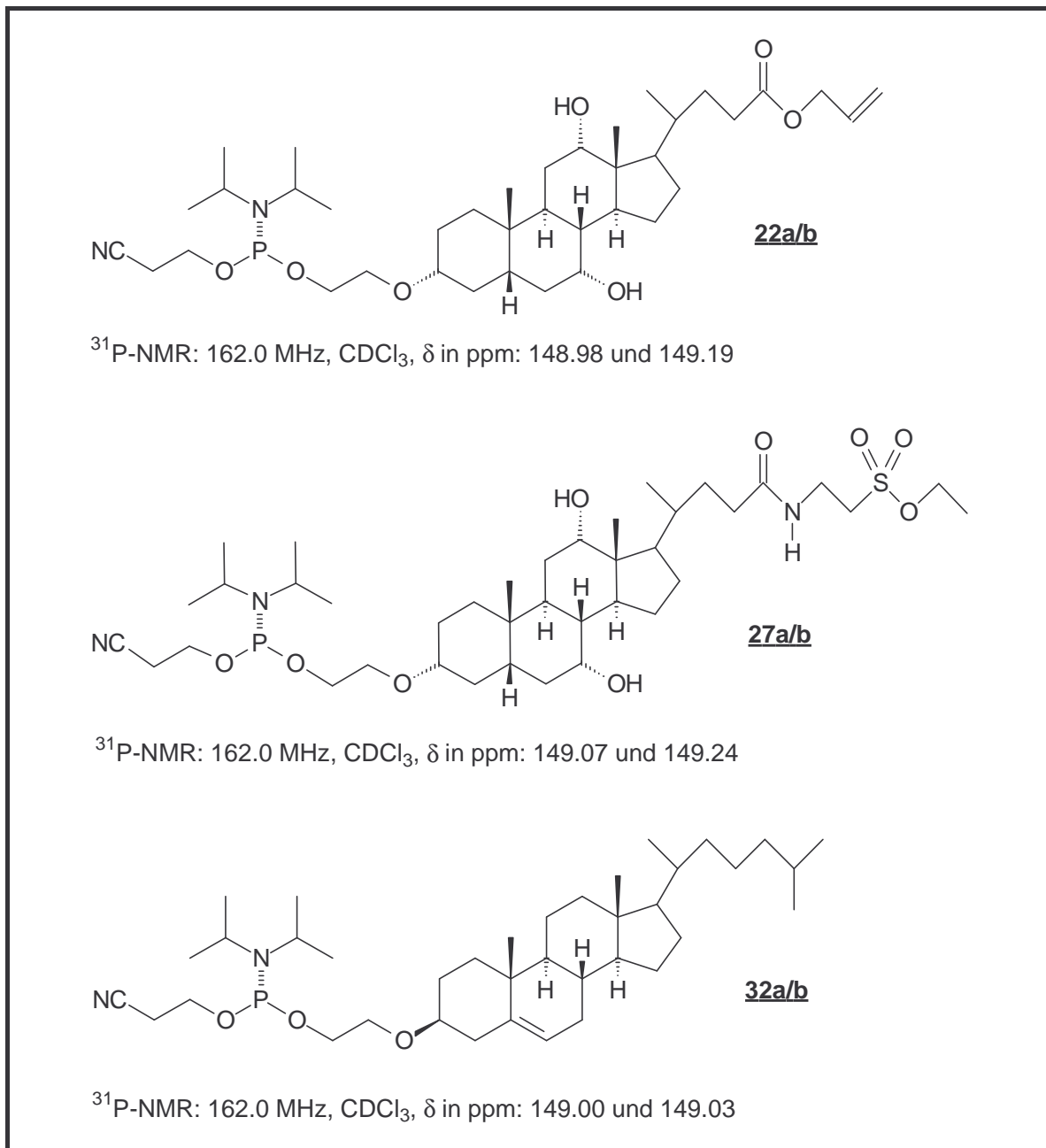


Abb. 6.14: Strukturen der Phosphoramidite zur 5'-Derivatisierung

7. Synthese von Oligonukleotiden

7.1 Enzymatische Synthese von Oligonukleotiden

Die enzymatische Synthese von Ribonukleotiden oder Desoxyribonukleotiden wird von Polymerasen katalysiert. Dabei werden 5'-Triphosphate unter Freisetzung von Pyrophosphat mit der freien 3'-Hydroxylgruppe des zuletzt gekuppelten Bausteins verknüpft. Die enzymatische Synthese erfolgt demnach in 5'→3'-Richtung. Für den Start der DNA-Synthese - beispielsweise bei der Replikation - ist eine bereits vorhandene Kette, der sogenannte Primer, mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe erforderlich, der an eine einzelsträngige Matrize hybridisiert ist. Die Polymerase katalysiert den nukleophilen Angriff der 3'-Hydroxylgruppe des Primers mit der α -Phosphatgruppe eines zur folgenden Base der einzelsträngigen Region komplementären 5'-Triphosphats. Im Gegensatz hierzu beginnt die RNA-Synthese beim Transkriptionsprozeß durch die Erkennung von Promotorstellen auf der DNA-Matrize. Für die RNA-Synthese wird kein Primer benötigt.

Das Prinzip der enzymatischen DNA-Synthese wird beispielsweise bei der *in vitro* Amplifikation der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und bei der Sequenzierungsmethode nach Sanger ausgenutzt (Kapitel 1.1). Mit Hilfe von templatgesteuerten DNA-Synthesen lassen sich deutlich längere Oligonukleotide darstellen als auf chemischem Wege. Ligasen beispielsweise katalysieren die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe der einen DNA-Kette und der 5'-Phosphatgruppe einer zweiten. Die zu verknüpfenden DNA-Ketten müssen jedoch zu einem doppelhelikalen Molekül gehören. Ligasen sind somit wichtige Werkzeuge in der Gentechnologie. Aber erst eine effiziente chemische Synthese eröffnete den unbegrenzten und raschen Zugang zu beliebigen Desoxyribo- und Ribonukleinsäuren.

7.2 Chemische Synthese von Oligonukleotiden

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden erfolgt ebenfalls durch Polykondensation einzelner Nukleotidbausteine. Aufgrund der höheren Reaktivität der primären 5'-Hydroxylgruppe im Vergleich zur sekundären 3'-Hydroxylgruppe erfolgt bei der chemischen Synthese der Aufbau der Sequenz in 3'→5'-Richtung. Nukleinsäuren sind sehr empfindlich gegenüber einer ganzen Reihe chemischer Reaktionen, so daß während der ge-

samten Oligonukleotidsynthese nur milde Bedingungen vorliegen dürfen. Im Gegensatz zur enzymatischen Synthese erfordert die chemische Knüpfung einer Phosphodiesterbindung das Schützen aller nicht an der Bindungsbildung beteiligten nukleophilen Zentren. Hierzu zählen die anionische Phosphodiesterbindung und die exozyklischen Aminogruppen der Heterobasen. Die 5'-Hydroxylgruppe des Monomeren, das gekuppelt werden soll, muß ebenfalls geschützt werden, während die 3'-Hydroxylgruppe je nach Methode phosphoryliert oder phosphityliert wird, um spezifisch an die Oligonukleotidkette zu kondensieren.

Zu den wichtigsten Methoden für die chemische Synthese von Oligonukleotiden zählen die Phosphodiester- (Brown, 1979a), die Phosphotriester- (Narang, 1980; Narang, 1983), die H-Phosphonat- (Garegg, 1986) und die Phosphoramiditmethode (Beaucage, 1981; Caruthers, 1987; Beaucage, 1993). Die Phosphoramiditmethode ist heute die wichtigste Strategie zur Herstellung von Oligonukleotiden durch automatisierte Festphasensynthese. Die monomeren Bausteine für die Polykondensation sind die sogenannten Phosphoramidite. Diese dreiwertigen Phosphorverbindungen tragen eine *N,N*-Diisopropylaminogruppe als Amiditkomponente und zeichnen sich nach Aktivierung zumeist mittels 1*H*-Tetrazol durch sehr hohe Kupplungsausbeuten und eine geringe Neigung zu Nebenreaktionen aus. Nicht aktiviert sind die Phosphoramidite bei -20 °C problemlos über längere Zeit lagerfähig. Deshalb werden häufig auch nichtnukleosidische Moleküle in Phosphoramidite überführt, um sie an Oligonukleotide kuppeln zu können. Außerdem lassen sich modifizierte Phosphoramidite darstellen, deren β -Cyanoethylgruppe beispielsweise gegen Methyl-, Phenyl- oder Benzylgruppen oder auch Fluorid substituiert ist. Auf diese Weise können spezifisch Phosphatrückgrat Modifikationen in Oligonukleotide eingebracht werden. Die Synthese solcher Bausteine wird in den Kapiteln 9.1 und 10.1 besprochen. Für eine ausführliche Diskussion der verschiedenen Methoden zur chemischen Synthese von Oligonukleotiden sei auf Übersichtsartikel verwiesen (Beaucage, 1981; Sinha, 1983; Gait, 1984; Caruthers, 1985; Caruthers, 1987; Beaucage, 1992; Beaucage, 1993).

7.3 In dieser Arbeit synthetisierte Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zu den verschiedensten Zwecken unterschiedlich modifizierte Oligonukleotide synthetisiert. Das Spektrum reicht von natürlicher DNA und RNA über Phosphorothioate, Methyl- und Benzylphosphonate bis hin zu den 5'-Gallensäurederivaten. Häufig wurden verschiedene Modifikationen wie beispielsweise Benzylphos-

phonate und Gallensäuren gleichzeitig in einen Strang eingebaut. Die Oligonukleotidsynthesen mit diesen selbst hergestellten Phosphoramiditen erfolgten im wesentlichen unter Standardbedingungen. Lediglich die Kupplungszeit der Amidite wurde von 30 s auf 300 s verlängert. Die jeweils eingebaute Phosphatrückgrat Modifikation, 3'- oder 5'-Modifikation oder auch die Länge des entsprechenden Oligonukleotids hat jedoch einen entscheidenden Einfluß auf die verwendeten Abspaltbedingungen und Aufreinigungsmethoden. Hier wurden zum Teil erheblich von den Standardmethoden abweichende Wege beschritten, die im folgenden erläutert werden.

7.3.1 Synthese von Phosphorothioaten

Das Screening der kürzesten Sequenz mit den besten Inhibitoreigenschaften gegen die Hepatitis C Virus RNA erfolgte ausgehend von einem 23mer durch sukzessive Verkürzung um je drei Nukleotide. Deshalb wurden unterschiedliche 8mere, 11mere, 14mere, 17mere und 20mere synthetisiert und in einem *in vitro* Translationsassay auf ihr Inhibitionspotential getestet (siehe Kapitel 8.2). Die Oligonukleotide wurden an je drei terminalen Phosphodiesterbindungen beschwefelt. Die übrigen Phosphodiesterbindungen wurden nicht modifiziert. Die Synthese derartiger Oligonukleotide erfolgt heute routinemäßig durch automatisierte DNA-Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode. Durch freie Wahl des Oxidationsmittels kann jeder beliebige Phosphitriester durch Sauerstoff oder Schwefel oxidiert werden. Die Dimethoxytritylschutzgruppe an der 5'-Hydroxylfunktion des zuletzt gekuppelten Monomers wurde zunächst nicht entfernt, um durch die erhöhte Lipophilie des Produkts eine bessere Retardierung bei der Aufreinigung durch RP-HPLC gegenüber Abbruchsequenzen zu erzielen. Die Abspaltung des synthetisierten Oligonukleotids vom Trägermaterial und dessen Entschützung erfolgte mit konz. Ammoniak bei 55 °C über Nacht oder innerhalb von 24 h bei RT. Zur semipräparativen Aufreinigung durch RP-HPLC an POROS-R3 Material konnte die filtrierte Ammoniaklösung direkt auf das Säulenmaterial gespritzt werden. Das aufgereinigte und eingeeengte Produkt wurde zur Entfernung der 5'-Dimethoxytritylschutzgruppe für 30 min mit 80 %iger Essigsäure behandelt. Ein Aliquot der essigsäuren Lösung wurde separat eingeeengt und als Ammoniumsalz der Charakterisierung durch ESI- oder MALDI-Massenspektrometrie zugeführt. Der Hauptteil der Lösung wurde nach dem Einengen als Natriumsalz gefällt und nach UV-spektroskopischer Ausbeutebestimmung in biologischen Assays verwendet. Die genaue Vorgehensweise bei den einzelnen Aufarbeitungsschritten ist in Kapitel 12.3 beschrieben.

7.3.2 Synthese Phosphatrückgrat- und 5'-Cholsäure modifizierter Oligonukleotide

Die Synthese derartiger Oligonukleotide geht mit Neuerungen im Vergleich zur Standardmethode einher. Die Vorbereitungen zur Durchführung der Synthese sind sehr aufwendig, insbesondere wenn anstelle der Phosphorothioate Benzylmodifikationen in das Phosphatrückgrat des Oligonukleotids eingeführt werden sollen. Die Darstellung Benzylmodifizierter Oligonukleotide erfolgt durch Kupplung von Benzylphosphoramiditen der vier Nucleoside, die zunächst synthetisiert werden müssen. Die Synthese dieser Bausteine ist in Kapitel 9.1 beschrieben. Inklusiv des Cholsäurephosphoramidits **22a/b** werden neun verschiedene Phosphoramidite benötigt. Die gut getrockneten Amiditkomponenten werden in käuflichem Acetonitril gelöst, das speziell für die Oligonukleotidsynthese getrocknet ist. Die etwa 100 mM Lösungen werden unter Schutzgas an die Positionen fünf bis neun des DNA-Synthesizers installiert. Gelangen auch nur Spuren von Luftfeuchtigkeit in eine Amiditlösung, ist der Erfolg der gesamten Synthese fraglich. Die eigentliche Synthese wird wieder unter Standardbedingungen durchgeführt mit der Ausnahme, daß die Kupplungszeiten der selbst synthetisierten Amidite von 30 s auf 300 s verlängert werden.

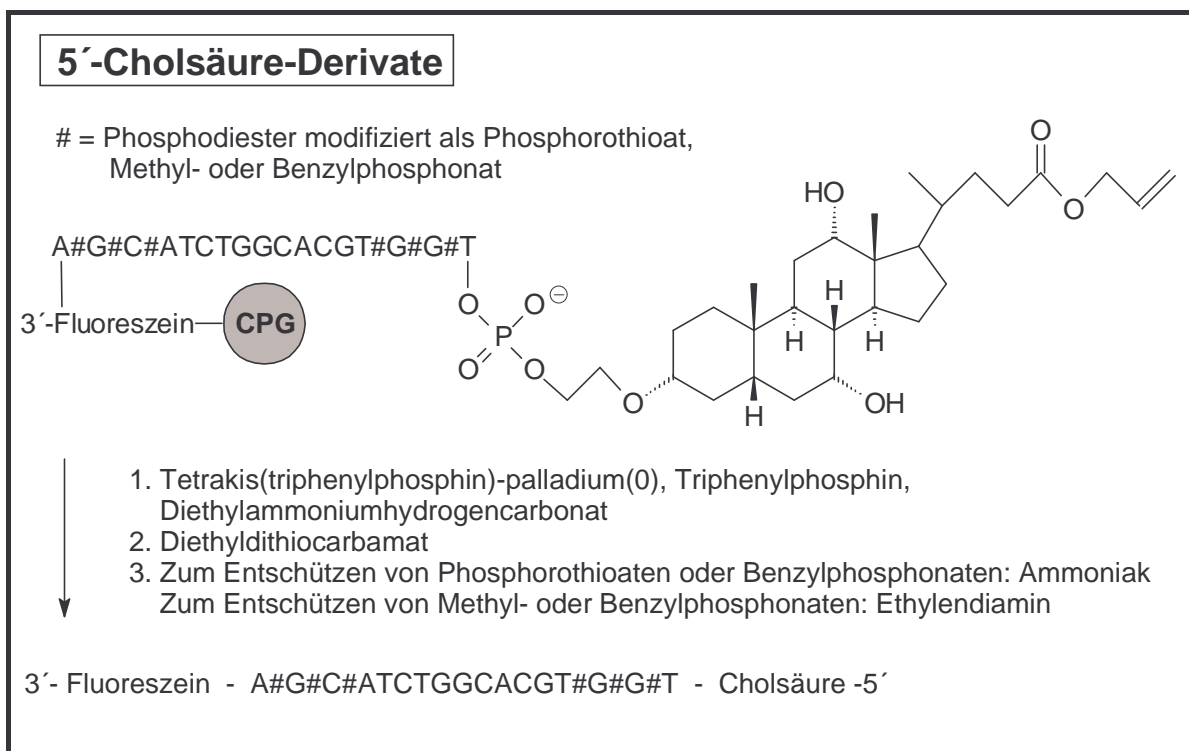


Abb. 7.1: Synthese 5'-Cholsäure modifizierter Oligonukleotide: Für die Spaltung des Allylesters der Cholsäure und die Entschützung des Oligonukleotids in Gegenwart von Alkylphosphonaten gelten besondere Abspaltbedingungen.

Die Oligonukleotidsynthese ist mit der Kupplung des Cholsäurebausteins am 5'-Ende abgeschlossen. An der festen Phase muß zunächst die als Allylester geschützte Carbonsäurefunktion der Cholsäure entschützt werden. Hierzu wurde eine Lösung aus 18 mg (15 µmol) Tetrakis-(triphenylphosphin)palladium, 18 mg (69 µmol) Triphenylphosphin und 18 mg (133 µmol) Diethylammoniumhydrogencarbonat gelöst in 1,2 ml Dichlormethan mit Hilfe zweier Spritzen durch die unversehrte Synthes Säule geleitet (Hayakawa, 1993). Nach 24 h bei RT wurde die Säule mit 10 ml Dichlormethan, 10 ml Aceton und 10 ml Wasser gespült. Zur Komplexbildung von Palladiumresten wurde 30 min mit einer wäßrigen 0,1 M Lösung von Diethyldithiocarbamat inkubiert. Danach wurde die Säule mit 10 ml Wasser, 10 ml Aceton und 10 ml Dichlormethan gewaschen und das Trägermaterial mittels Durchleiten von Argongas getrocknet. Für Phosphorothioate kann nun die Abspaltung vom Trägermaterial und Entschützung unter Standardbedingungen fortgesetzt werden.

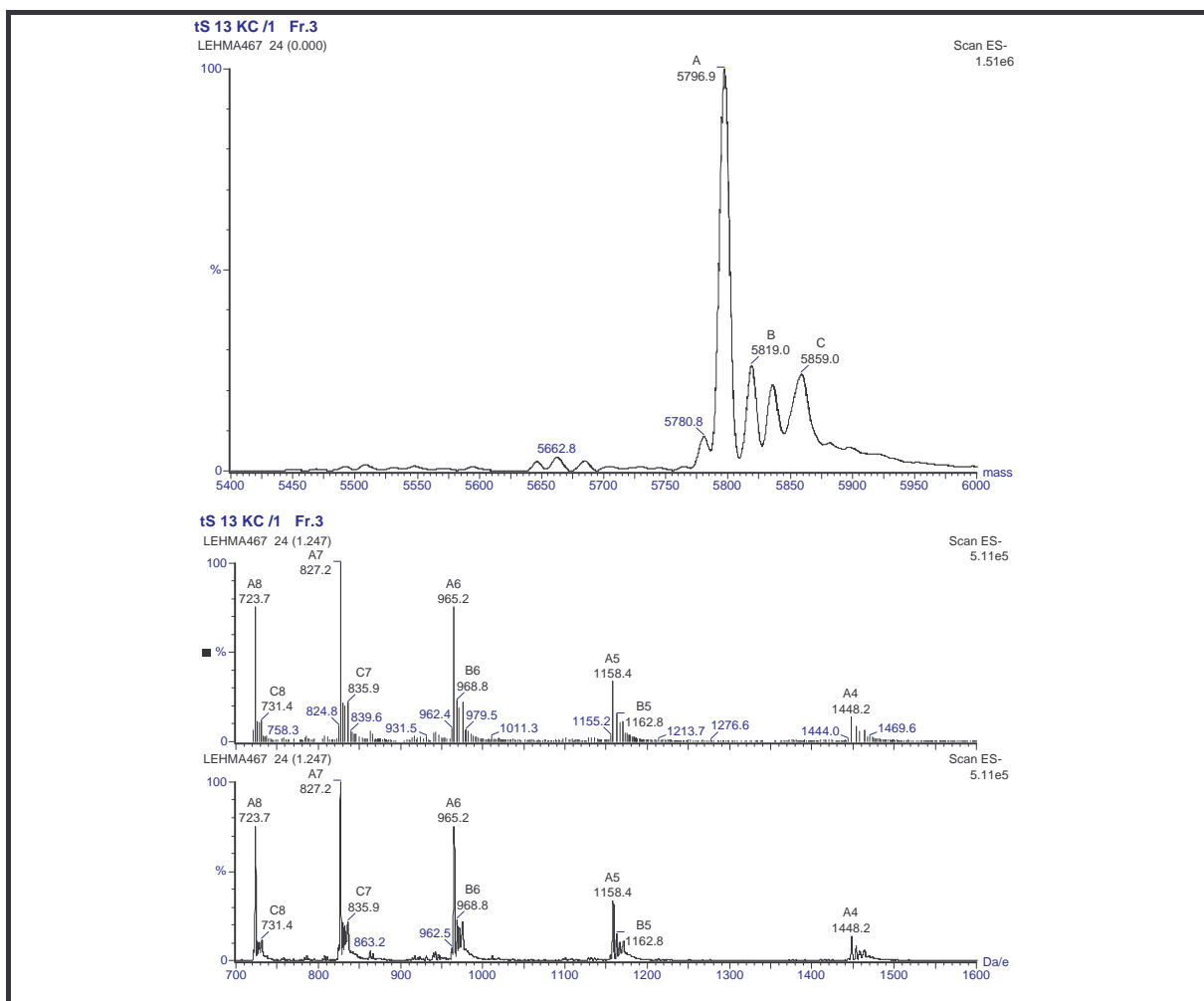


Abb. 7.2: ESI-Massenspektren des Antisense Oligonukleotids *tS-13KC* mit der Sequenz 5'-Cholsäure - T°G°C°TGCACGCTCTA°G°G°A -3' (° = Phosphorothioat)
Berechnete Masse [M-H]: 5795,4 Dalton; Gefundene Masse [M-H]: 5796,9 Dalton

Die erhöhte Labilität von Alkylphosphonaten gegenüber Basen erfordert hingegen abweichende Abspaltbedingungen. Mit Methyl- oder Benzylphosphatrückgrat Modifikationen veränderte Oligonukleotide wurden durch einstündige Inkubation mit konz. Ammoniak bei RT vom Träger abgespalten. Die Ammoniaklösung wurde im Vakuum abgezogen und der Rückstand in einer Mischung aus Wasser/Ethanol/Acetonitril/Ethylendiamin (5 : 47,5 : 47,5 : 100) aufgenommen. Nach sechs Stunden bei RT war die Entschützung vollständig und die Lösung wurde mit Essigsäure neutralisiert (Hogrefe, 1993). Später stellte sich heraus, daß die Benzylmodifikationen im Gegensatz zu den Methylmodifikationen eine Behandlung mit Ammoniak für 24 h bei RT ohne Ausbeuteverlust überstanden.

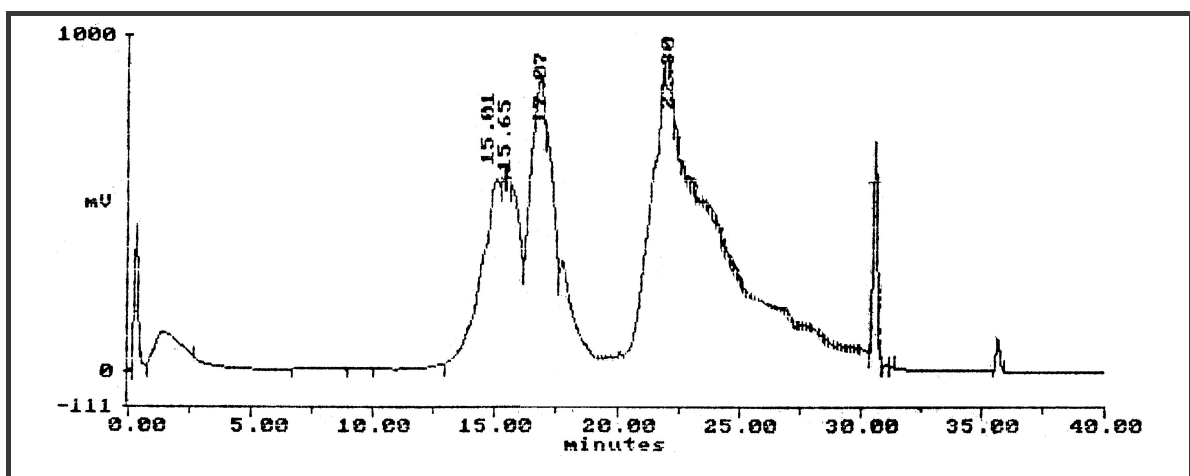


Abb. 7.3: RP-HPLC: Rohspektrum des Antisense Oligonukleotids tS-13KT mit der Sequenz 5'- Taurocholsäure - T°G°C°TGCACGCTCTA°G°G°A -3' (° = Phosphorothioat). Der Peak bei 22,3 min ist das Taurocholsäure-gekuppelte Oligonukleotid.

Die Aufreinigung erfolgte wiederum über RP-HPLC an POROS-R3-Material. Die Retardierung gegenüber Oligonukleotiden, die das Cholsäureamidit **22a/b** nicht gekuppelt hatten, war erheblich niedriger als die durch die 5'-Dimethoxytritylgruppe induzierte Retardierung. Aus diesem Grund wurden Gallensäure-modifizierte Oligonukleotide zweimal über RP-HPLC aufgereinigt. Am 3'-Ende zusätzlich mit Fluoreszeिन gelabelte Oligonukleotide wurden außerdem durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgereinigt. Der Nachweis für die Darstellung der korrekten Sequenzen wurde mittels ESI-Massenspektrometrie der Ammoniumsalze der Substanzen erbracht. Ein Beispiel für ein ESI-Massenspektrum eines terminal beschwefelten und 5'-Cholsäure modifizierten Antisense Oligonukleotids (**tS-13KC**) ist in Abbildung 7.2 gezeigt. Außerdem wurde die Reinheit der Substanzen durch analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese und analytische RP-HPLC nachgewiesen. Die entsprechenden Gelfotos und RP-HPLC Läufe sind in Ka-

pitel 8.3 gezeigt. Die in Form ihrer Natriumsalze gefällten Antisense Oligonukleotide wurden den biologischen Assays zugeführt.

7.3.3 Synthese Phosphatrückgrat- und 5'-Taurocholsäure oder 5'-Cholesterol modifizierter Oligonukleotide

5'-Taurocholsäure- und 5'-Cholesterol-Derivate bedürfen bezüglich ihrer Entschützung keiner besonderen Behandlung. Das als Sulfonsäureethylester vorliegende Taurocholsäurederivat wurde mit Ammoniak von der festen Phase gespalten und in Abhängigkeit der Phosphatrückgrat Modifikation mit Ammoniak oder Ethylendiamin entschützt. Dabei greift das entsprechende Stickstoffnukleophil den elektrophilen α -Kohlenstoff des Ethylesters unter Bildung des Sulfonats an (Musicki, 1991). Dies steht in Einklang mit der Wirkung von Alkylsulfonsäureestern als Alkylierungsmittel und ihrer damit einher gehenden hohen Toxizität.

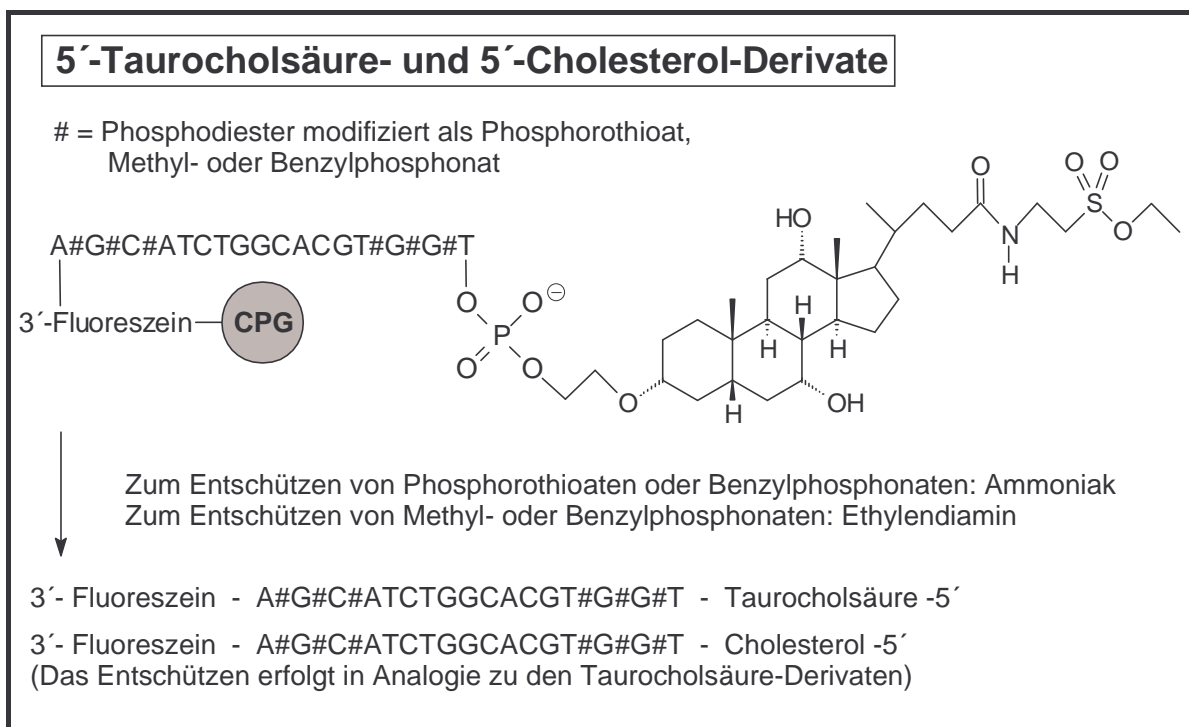


Abb. 7.4: Synthese 5'-Taurocholsäure und 5'-Cholesterol modifizierter Oligonukleotide

Die hohe Lipophilie des Cholesterols führte dazu, daß sich das Cholesterol-Phosphoramidit **32a/b** nicht standardisiert in reinem Acetonitril löste. Erst nach Lösen in einem Teil Dichlormethan und Zugabe von zwei Teilen Acetonitril lag eine klare Lösung vor, die ohne Schwierigkeiten für die 5'-Derivatisierung mit Cholesterol eingesetzt werden konnte.

Auch hier erfolgte die Wahl der Abspalt- und Entschützungsbedingungen nur in Abhängigkeit der eingebauten Phosphatrückgrat Modifikation, da das Cholesterolemolekül außer der 5,6-Doppelbindung keine weiteren funktionellen Gruppen aufweist.

Die Aufreinigung durch RP-HPLC gelang besonders gut bei den 5'-Cholesterolderivaten, da derartige Oligonukleotide aufgrund der hohen Lipophilie eine enorme Retardierung gegenüber Abbruchsequenzen erfuhren. Die Retardierung von Taurocholsäurederivaten zu unvollständigen Sequenzen war deutlich geringer, so daß diese stets zweimal chromatographiert wurden. Fluoreszein markierte Derivate wurden außerdem durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgereinigt. Die Charakterisierung dieser Derivate erfolgte in Analogie zu den Cholsäure-Modifikationen durch ESI-Massenspektrometrie, analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese und analytische RP-HPLC (Kapitel 8.3).

7.3.4 Synthese von kurzen Sequenzen: DNA-Hexamere

Selbstkomplementäre, Benzyl-modifizierte DNA-Hexamere wurden zur Diskussion von Schmelzkurven UV-spektroskopisch und zur Bestimmung von B→Z-Übergängen CD-spektroskopisch untersucht. Die Hexamere enthalten eine modifizierte Internukleotidbindung und liegen somit als Paar von Diastereomeren vor. Die Diastereomeren konnten chromatographisch aufgetrennt werden. Die Ergebnisse dieser Studien werden ausführlich in Kapitel 9 besprochen.

Die Synthese der Hexamere erfolgte an der festen Phase. Unmodifizierte Hexamere und Phosphorothioate wurden nach Standardbedingungen wie in Kapitel 7.3.1 beschrieben dargestellt. Benzyl-modifizierte Oligonukleotide wurden noch an der festen Phase detrityliert und anschließend durch Inkubation mit Ammoniak vom Träger gespalten und mit Ethylendiamin oder Ammoniak entschützt. Die Aufreinigung erfolgte an LiChrospher RP 18 Material mit einem Acetonitril Gradienten von 0 % bis 30 % in 0,1 M TEAA (pH = 7,0) innerhalb von 40 min. Die Trennung der Diastereomeren gelang anschließend mit einem isokratischen Eluenten von 13 % Acetonitril in TEAA-Lösung (Flußrate: 0,6 ml/min). Die gleichen Bedingungen ermöglichten bereits die Trennung analoger Methylphosphonate (Schwarzer, 1997; Lehmann, 1999a). Eine Aufreinigung durch Fällern ist bei Oligonukleotiden dieser Länge meistens nicht möglich, da sie in den alkoholischen Lösungen löslich sind. Die Charakterisierung der isomerenreinen Hexamere gelang wie in Abbildung 7.5 gezeigt durch analytische RP-HPLC. Im Anhang (Kapitel 14.1) sind die zugehörigen ESI-Massenspektren gezeigt.

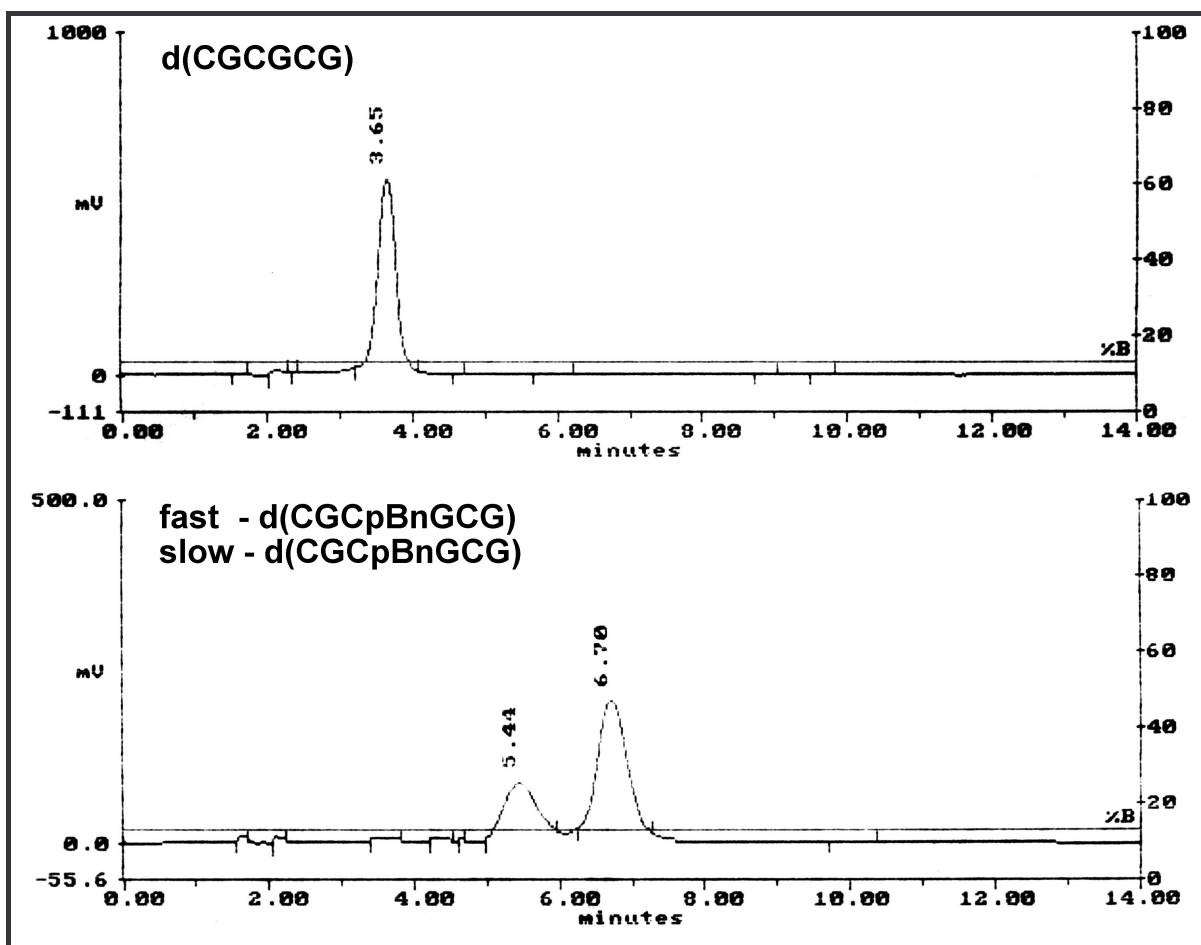


Abb. 7.5: RP-HPLC des unmodifizierten Hexamers $d(\text{CGCGCG})$ **58** und der koinjezierten Hexamere fast/slow $d(\text{CGCP}_n\text{GCG})$ **60a** und **60b**; 13 % Acetonitril in 0,1 M TEAA (pH = 7,0).

Hexamere mit mehreren, jedoch nicht direkt aufeinanderfolgenden, diastereomerenreinen Alkylphosphonatzentren können auch durch die Block-Kupplungsstrategie aufgebaut werden (Löschner, 1990). Bei dieser ebenfalls nicht stereokontrollierten Methode werden bereits die Dinukleosid-Alkylphosphonate chromatographisch getrennt. Nach Freisetzung der geschützten 3'-Hydroxylgruppe können diese Dimere ihrerseits wieder in Phosphoramidite überführt werden und als Synthesebausteine für die Festphasensynthese dienen.

7.3.5 Dimersynthese in Lösung

Zur Untersuchung der Eigenschaften neuer Phosphatrückgrat Modifikationen und zur Bestimmung der absoluten Konfiguration des dadurch chiralen Phosphors wurden geschützte Dimerbausteine synthetisiert und chromatographisch in ihre Diastereomeren aufgetrennt. Für die Methylphosphonate wurden bereits alle 16 möglichen Dimere dargestellt, die Dia-

stereomerenpaare chromatographisch getrennt und deren absolute Konfiguration mit Hilfe der NMR-ROESY Technik zugeordnet (Löschner, 1990; Lebedev, 1993; Schell, 1998a; Schell, 1998b).

Phosphatrückgrat-modifizierte DNA-Dimere lassen sich auf verschiedenen Wegen darstellen. Die von Löschner weiterentwickelte Eintopfsynthese nach Engels und Jäger ermöglicht die direkte Herstellung von Dinukleosid-Methylphosphonaten (Engels, 1982a; Engels, 1982b; Löschner, 1989a; Löschner, 1989b; Engels, 1991b). Dabei werden durch Reaktion von Dichlormethylphosphin und entsprechend geschützten Nukleosiden ohne Isolierung einer reaktiven, phosphorhaltigen Zwischenverbindung direkt die Dinukleosid-Methylphosphonate erhalten. Die bei dieser Methode gefundene Diastereoselektivität ist durch die Reaktionstemperatur und Wahl der Nukleoside - 5'-Purine oder 5'-Pyrimidine - beeinflussbar. Bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde für das Dimer $d(\text{Cp}_{\text{Me}}\text{A})$ eine Diastereomerenverhältnis Rp:Sp von 8:1 gefunden.

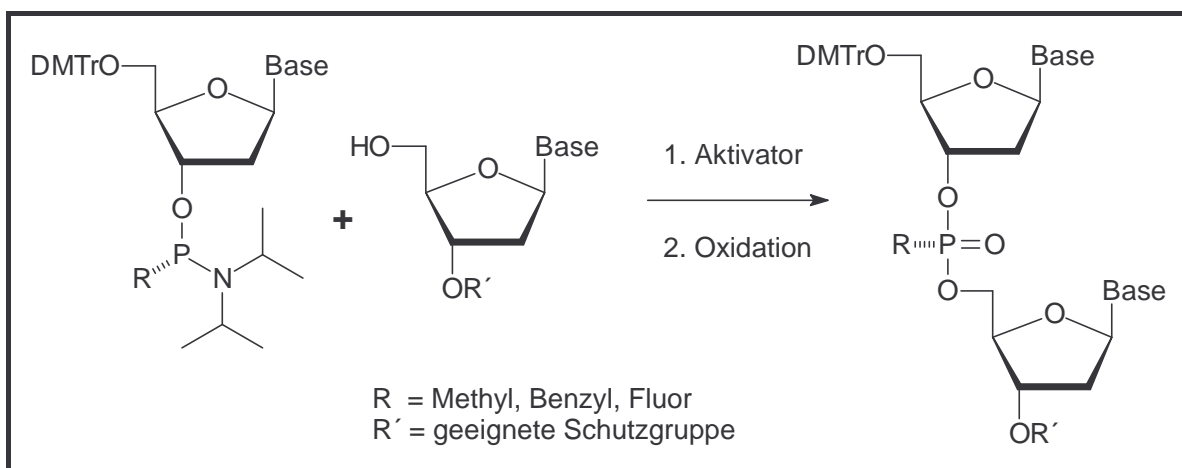


Abb. 7.6: Synthese von Phosphatrückgrat-modifizierten DNA-Dimeren nach der Phosphoramidit-Methode

Die in dieser Arbeit hergestellten Dimerbausteine wurden ausschließlich durch die auch bei der Festphasensynthese verwendete Phosphoramiditchemie generiert. Dazu wurde das Phosphoramidit in einem trockenem Lösungsmittel gelöst und in Gegenwart eines geeigneten Aktivators zum Dimer gekuppelt und oxidiert. Als Lösungsmittel kamen Acetonitril, Tetrahydrofuran oder Dichlormethan zum Einsatz. Die Suche nach einem geeigneten Aktivator führte sowohl bei den Benzylphosphonaten wie auch bei den Fluorphosphonaten zu einem Ersatz des 1*H*-Tetrazols. Die Synthese und Eigenschaften dieser beiden Verbindungsklassen werden in den Kapiteln 9 und 10 ausführlich diskutiert.

8. Antisense Oligonukleotide gegen HCV

8.1 Übersicht der bisherigen Resultate

Gegen das Hepatitis C Virus kann man sich derzeit weder immunisieren lassen noch steht für den Infizierten eine erfolgversprechende Therapie zur Verfügung. Neben der seit 1999 zugelassenen α -Interferon/Ribavirin Kombinationstherapie wurden in den vergangenen Jahren große Anstrengungen unternommen, die Vermehrung des Virus durch eine Blockade des Translations- oder Replikationsapparats mit Hilfe von Antisense Oligonukleotiden einzuschränken (siehe Kapitel 4.3.6).

Zu den ersten Arbeiten auf diesem Gebiet zählte die Entdeckung eines *in vitro* und *in vivo* effektiv wirkenden 23mer Vollthioats, das gegen die Nukleotide 326-348 des RNA-Genoms des HCV (Typ 1b) gerichtet war (Alt, 1995). Legt man den Sekundärstrukturvorschlag von Honda und Mitarbeitern zugrunde (Honda, 1996), so hybridisiert diese Sequenz mit ihrem 3'-Ende im Bereich eines „Pseudoknots“, während das 5'-Ende eine „Hairpin“-Struktur mit einem Stamm aus fünf Basenpaaren und einem Heptaloop überlagert. Dieser Heptaloop ist die einzige längere Einzelstrangregion innerhalb dieses Fensters und enthält zudem das AUG-Startcodon für die Proteinbiosynthese des Polyproteinprecursors. Die dreidimensionale Struktur dieser Region dient als „internal ribosomal entry site“ (IRES).

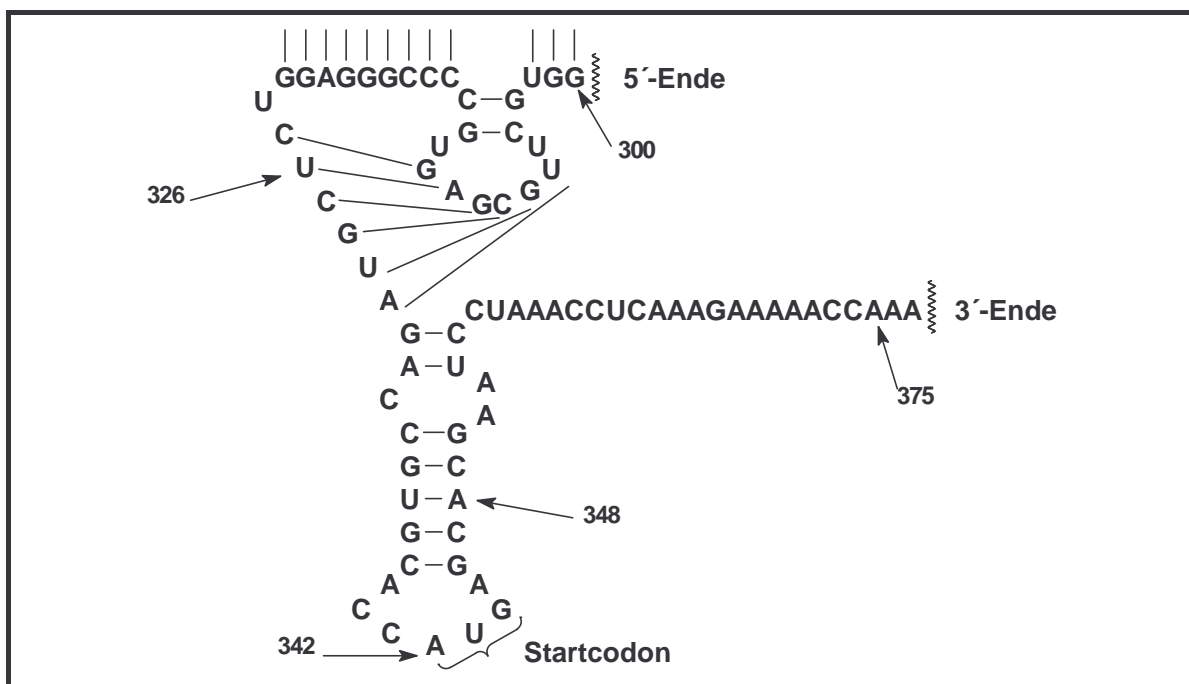


Abb. 8.1: Ausschnitt aus dem Sekundärstrukturmodell des NCR des HCV (Honda, 1996)

In weiteren Studien mit dieser Sequenz wurden Art und Anzahl der Phosphatrückgrat Modifikationen variiert. Neben den ionischen Phosphorothioaten wurden auch anionische Methyl- und Benzylphosphonat-Modifikationen in das Rückgrat der Nucleinsäuren eingeführt. Die Anzahl veränderter Internukleotidbindungen wurde auf sechs je 23mer reduziert. Die Modifikationen wurden sowohl über die Sequenz verteilt als auch je drei an beiden Enden positioniert.

Bei der enzymatischen Degradierung dieser Antisense Oligonukleotide wurden nach Zugabe von 3'-Exonukleasen Halbwertszeiten von zum Teil über 24 h gefunden. Alle 23mere wiesen zu komplementären DNA- und RNA-Zielsequenzen ausreichend hohe Duplexstabilitäten auf. Erwartungsgemäß wurde für die terminal modifizierte Oligonukleotide, die 16 aufeinanderfolgende, reguläre Phosphodiesterbindungen enthalten, im Heteroduplex eine deutlich stärkere Aktivierung der RNase H beobachtet. Durch RP-HPLC konnte für die Methyl- und Benzylphosphonate eine Erhöhung ihrer Lipophilie im Vergleich zu den Phosphorothioaten festgestellt werden (Eisenhardt, 1996; Alt, 1999).

Für alle modifizierte Antisense Oligonukleotide konnte in einem *in vitro* Translations-Assay eine hyperbolische, dosisabhängige Inhibierung gefunden werden, wobei die Oligonukleotide mit den verteilten Modifikationen bei niedrigen Konzentrationen deutlich schwächer wirkten. Die IC_{50} -Werte für die terminal modifizierte 23mere lagen bei 0,6 $\mu\text{mol/l}$ für das Phosphorothioat, 0,2 μM für das Methylphosphonat und 1,3 μM für das Benzylphosphonat. Die maximale Inhibierung bei einer Wirkstoffkonzentration von 10 μM betrug 80,4 % \pm 2,1 % für das terminale Phosphorothioat, 92,4 % \pm 1,9 % für das terminale Methylphosphonat und 87,0 % \pm 3,7 % für das terminale Benzylphosphonat. Die terminal modifizierte Antisense Oligonukleotide erwiesen sich im *in vitro* Translations-Assay als spezifische und effektive Inhibitoren der HCV-Translation (Eisenhardt, 1996; Alt, 1999).

Für die Zellkultur-Experimente wurden HepG2 Zellen mit den Antisense Oligonukleotiden und einem Plasmid, das die HCV-Luciferase-RNA exprimiert, cotransfiziert. Die stärkste Inhibierung wurde mit 96,3 % \pm 0,6 % für das terminal modifizierte Benzylphosphonat gefunden. Im Vergleich zu den Kontrolloligonukleotiden war die Inhibierung zudem hochspezifisch. Die weiteren Wirkstoffe zeigten entweder nur eine deutlich schwächere Inhibierung der Translation oder wirkten im Vergleich zu ihren Kontrolloligonukleotiden unspezifisch. Beim terminal modifizierten Phosphorothioat beispielsweise zeigten die Sense- und die Mismatch-Kontrolle eine ähnlich erfolgreiche Inhibierung wie der eigentliche Wirkstoff. Bei den analogen Methylphosphonaten wurde für die Sense-Kontrolle

sogar eine deutlich bessere Wirkung als für das komplementäre Antisense Oligonukleotid gefunden (Eisenhardt, 1996; Alt, 1999).

Terminal modifizierte 23mer Antisense Oligonukleotide gegen Hepatitis C Virus RNA haben sich als potente Inhibitoren der viralen Translation *in vitro* und *in vivo* erwiesen. Dabei zeigten die Benzylphosphonate die effektivste und spezifischste Inhibierung. Um ein verbessertes „Drug Targeting“ verbunden mit einer erhöhten hepatozellulären Aufnahme durch Gallensäurecarrier zu erzielen, sollte - ausgehend von dem bekannten 23mer - die kürzeste Sequenz mit bestmöglicher Inhibierung der viralen Translation gefunden werden. Je geringer der Oligonukleotidanteil in einem Oligonukleotid-Gallensäure Konjugat ist, desto stärker kommt der Gallensäurecharakter des Wirkstoffs zur Geltung. Außerdem erscheint die Zellaufnahme durch ein aktives Transportsystem mit „kleineren“ Molekülen wahrscheinlicher. Die Verkürzung des 23mers und die Suche nach der optimalen Zielsequenz sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

8.2 Auswahl der Zielsequenz

Bereits das Verkürzen einer effizienten Antisense Sequenz um ein einziges Nukleotid kann zu einer drastischen Abnahme des Inhibitions potentials führen (Hanecak, 1996). Diesem Ergebnis steht allerdings der enorme Aufwand beim experimentellen Screening entgegen, wollte man alle theoretisch möglichen Antisense Oligonukleotide mit unterschiedlicher Länge testen. Aus diesem Grunde wurde die Sequenz des 23mer Antisense Oligonukleotids **tS-10** zunächst sukzessive in Schritten von je drei Nukleotiden verkürzt. Die daraus resultierenden zwei 20mere, drei 17mere, vier 14mere usw. wurden als terminal modifizierte Phosphorothioate am DNA-Synthesizer hergestellt und *in vitro* und *in vivo* auf ihr Antisense Potential untersucht. Außerdem wurde UV-spektroskopisch bestimmt, ob die Sequenzen einen Schmelzübergang aufweisen, der auf eine uni- oder bimolekulare Duplexbildung des Wirkstoffs schließen läßt.

Die bereits erwähnte Nomenklatur der Oligonukleotide ist wie folgt zu verstehen: Das „t“ bedeutet, daß es sich um ein terminal modifiziertes Antisense Oligonukleotid mit je drei Modifikationen am 3'- und am 5'-Ende handelt. Der folgende Großbuchstabe bezeichnet die Art der Phosphatrückgrat Modifikation. Das „S“ steht für Schwefel (Phosphorothioat), das „B“ bedeutet, daß es sich um ein Benzylphosphonat handelt. Die Numerierung folgt der Chronologie der Synthese der Oligonukleotide. Ein angehängtes „K“ weist auf eine Mismatch-Kontrolle hin. Bei der Kupplung der Gallensäuren und Farbstoffe wer-

den später weitere Termini eingeführt. Die wichtigsten verkürzten Sequenzen sind zusammen mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analytik und den jeweiligen Extinktionskoeffizienten in Tabelle 8.1 gezeigt.

Name	Sequenzen der terminal beschweifelten (°), verkürzten Antisense Oligodesoxynukleotide in 5' → 3'-Richtung	Ber. Masse [Da]	Gef. Masse [Da]	Extinktionskoeffizient bei 260 nm
	348 Nukleotide des HCV-Genoms 326			
tS-10	T°G°C°TCATGGTGCACGGTCTA°C°G°A	7152,0	7152,1	221,72
tS-10K	T°G°C°T \underline{G} ATG \underline{C} TGCACG \underline{T} CTA° \underline{G} °G°A	7152,0	7152,8	220,44
tS-11	T°C°A°TGGTGCACGGTCTA°C°G°A	6229,4	6244,0	196,08
tS-11K	T° \underline{G} °A°TG \underline{C} TGCACG \underline{T} CTA° \underline{G} °G°A	6229,4	6227,5	194,80
tS-12	T°G°C°TCATGGTGCACGGT°C°T°A	6220,4	6222,0	190,86
tS-12K	T°G°C°T \underline{G} ATG \underline{C} TGCACG \underline{T} °C°T°A	6220,4	6223,4	185,82
tS-13	T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	5322,8	5320,4	167,24
tS-13K	T°G° \underline{C} °TGCACG \underline{T} CTA° \underline{G} °G°A	5282,8	5281,9	162,92
tS-14	T°C°A°TGGTGCACGGT°C°T°A	5297,8	5298,3	165,22
tS-15	T°G°C°TCATGGTGCAC°G°G°T	5313,8	5312,6	159,68
tS-19	T°G°C°ACGGTCTA°C°G°A	4360,2	4361,0	137,56
tS-20	C°G°T°GCTCATGGTGC°A°C°G	5298,8	5298,1	159,06
tS-21	G°T°G°CTCATGGTGC°A°C	4680,4	4678,8	141,26
tS-22	T°G°C°TCATGGT°G°C°A	4062,0	4061,5	123,52
tS-23	T°G°G°TGCACGGTC°T°A°C	4680,4	4679,3	142,38
tS-24	T°G°G°TGCACGGTCT°A°C°G	5009,6	5007,0	153,56
tS-25	T°C°A°TGGTGCACGGTC°T°A°C	5587,0	5589,6	171,22
tS-26	T°C°A°TGGTGCAC°G°G°T	4391,2	4390,8	134,04
tS-27	T°C°A°TGGTGC°A°C	3428,6	3427,5	103,88
tS-28	T°C°A°TG°G°T°G	2537,0	2536,8	77,92
tS-29	T°C°A°TGGTG	2488,8	2488,1	77,92
tS-30	C°T°C°AT°G°G°T	2497,0	2496,9	74,84
tS-31	G°C°T°CA°T°G°G	2522,0	2522,6	77,34
tS-32	C°A°T°GG°T°G°G	2522,0	2520,8	75,44
tS-33	T°G°C°TC°A°T°G	2497,0	2497,0	73,88
tS-34	A°T°G°GT°G°C°A	2546,1	2546,2	83,18

Tab. 8.1: Sequenzen für das Screening nach dem kürzesten, effektivsten Antisense Oligonukleotid gegen HCV-RNA. Zusätzlich sind die berechneten und mittels MALDI-Massenspektrometrie bestimmten Massen sowie die Extinktionskoeffizienten angegeben.

8.2.1 Beschreibung der Testsysteme

Das Inhibitionspotential der verkürzten Antisense Oligonukleotide wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. W.H. Caselmann an selbst entwickelten Testsystemen bestimmt. Die Testsysteme - ein *in vitro* Translations-Assay und ein Zellkultur Translations-Assay - wurden von Michael Alt 1995 entwickelt (Alt, 1995). Im Unterschied zu dem in der Literatur beschriebenen Zellkultur Translations-Assay wurden HepG2-Zellen nicht mehr transient, sondern stabil mit einem entsprechenden Plasmid-Konstrukt transfiziert. Bei beiden Testsystemen handelt es sich um Reporter-Gen-Assays, wobei die Firefly-Luciferase als Reporter-Gen verwendet wurde.

8.2.1.1 *In vitro* Translations-Assay

Wesentlicher Bestandteil des zellfreien *in vitro* Translations-Assays ist ein Plasmid-Konstrukt, das sich beginnend am 5'-Ende aus dem T7-Promotor für die RNA-Polymerase, den 341 Nukleotiden der nicht codierenden Region (NCR) und 66 Nukleotiden des sich anschließenden Core-Gens zusammensetzt. Die drei ersten Nukleotide des Core-Gens sind zugleich das Startcodon für die Proteinbiosynthese. Im Anschluß an die 66 Nukleotide des Core-Gens wurde die für die Luciferase codierende Sequenz ohne ihr eigenes Startcodon im Leseraster kloniert. Eine schematische Darstellung des Plasmids pT7NCRluc ist in Abbildung 8.2 gezeigt.

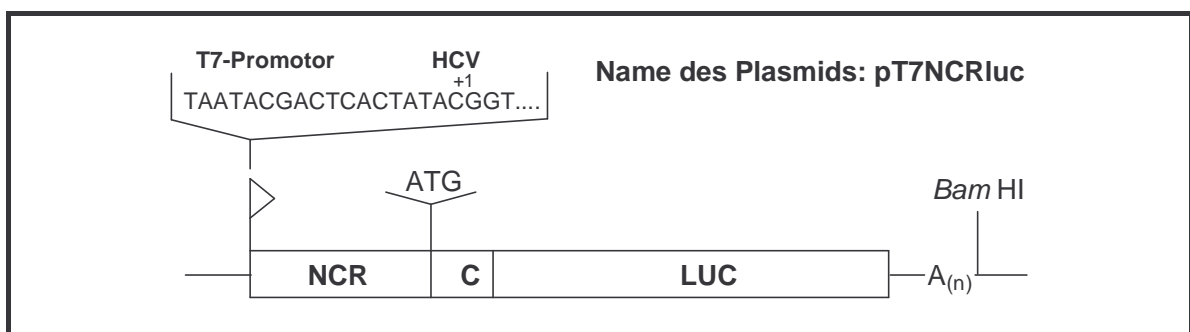


Abb. 8.2: Schematische Darstellung des HCV-Luciferase Reporter-Gen Konstrukts pT7NCRluc für den *in vitro* Translations Assay

Zur Durchführung des zellfreien *in vitro* Translations-Assays mußte zunächst eine *in vitro* Transkription des Plasmids pT7NCRluc durch die T7-RNA-Polymerase erfolgen. Der transkribierte RNA-Strang enthält die Zielsequenzen für die verkürzten Oligonukleotide und die später untersuchten Gallensäure gekuppelten Antisense Oligonukleotide. Die drei-

dimensionale Struktur der IRES sollte die Erkennung durch die Ribosomen ermöglichen und damit zur Synthese eines Proteins führen, daß über die coexprimierte Luciferase nachgewiesen werden kann. Zum spezifischen Verdau der DNA-Komponenten in der Mixtur wurden 200 units RNase freie DNase zugesetzt. Nach 15 Minuten wurde die RNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend in Gegenwart von Ammoniumacetat zweimal einer Ethanol-fällung unterworfen. Die Reinheit der transkribierten RNA wurde auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel überprüft.

Die *in vitro* Translations-Assays wurden bei 37 °C mit 50 ng der aufgereinigten RNA in käuflichem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat nach Anleitung durch den Hersteller Promega durchgeführt. Die Antisense Oligonukleotide wurden vor der Zugabe zum Translationsmix mit der RNA vorhybridisiert. Zu diesem Zweck wurden die Sequenzen für 10 min in einer Lösung aus 100 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl bei pH = 7,5 und 75 °C inkubiert und innerhalb einer Stunde auf RT abgekühlt. Zur Messung der Luciferase Aktivität wurde ein Aliquot des Translationsmix entnommen und die relative Lichtausbeute nach Zugabe eines Reagenzes für 30 s mit einem Luminometer bestimmt. Bei den *in vitro* Translations-Assays mit den verkürzten 23meren wurden die Antisense Oligonukleotide in Konzentrationen von 0,1 µM, 0,2 µM, 0,5 µM, 1,0 µM, 2,0 µM und 5,0 µM eingesetzt. Die relativen Lichtausbeuten wurden gemessen und mit einem Experiment verglichen, in dem kein inhibierendes Antisense Oligonukleotid zugesetzt wurde. Die bei diesem Experiment erhaltene Lichtausbeute wurde als 100 % festgelegt (Alt, 1995; Alt, 1999).

8.2.1.2 Zellkultur Translations-Assay

Das Plasmid-Konstrukt für den Zellkultur Translations-Assay ähnelt vom Aufbau her dem Plasmid, das im *in vitro* Translations-Assay eingesetzt wurde. Vor den T7-Promotor ist zusätzlich der CMV-Promotor für höhere Zellen inkloniert. Außerdem ist am 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal angebracht. Zur Bestimmung der Antisense Effekte der verkürzten Oligonukleotide in Zellkultur wurden Leberzelllinien wie HepG2-Zellen oder CCL13-Zellen stabil mit dem Plasmid pCMVNCRLuc transfiziert. Bei den in der Arbeit von Michael Alt durchgeführten Zellkultur Translations-Assays wurden die HepG2-Zellen noch transient mit dem entsprechenden Plasmid-Konstrukt transfiziert. Bei der Untersuchung der Zellaufnahme von Gallensäure gelabelten Oligonukleotiden wurde zudem auf die Gabe von Lipofektin (siehe Kapitel 3.2) verzichtet. Das Plasmid-Konstrukt für den Zellkultur Translations-Assay zeigt Abbildung 8.3.

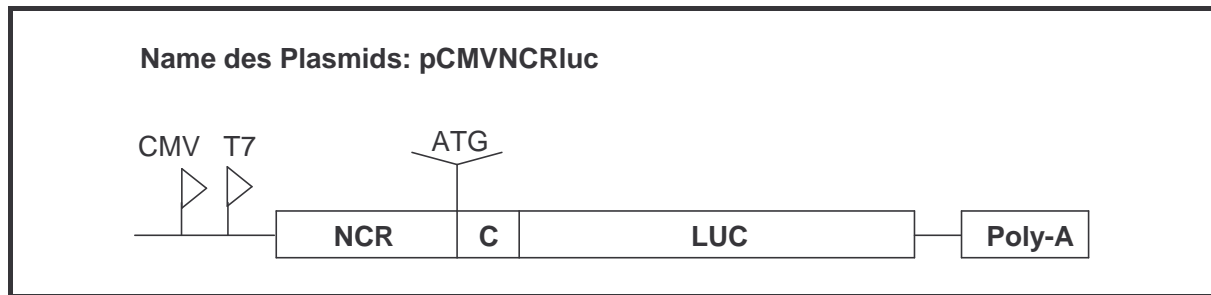


Abb. 8.3: Schematische Darstellung des HCV-Luciferase Reporter-Gen Konstrukts pCMVNCRLuc für den Zellkultur Translations Assay

Um das Inhibitionspotential der verkürzten Antisense Oligonukleotide in Zellkultur zu testen, wurden 1×10^5 HepG2 (ATCC HB 8065) Zellen pro Well auf 24 Well-Platten in Dulbecco's modified Eagle medium, das 10 % fötales Kälberserum, 30 $\mu\text{g/ml}$ Penicillin und 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin enthielt, ausgesät. Nach 18 h wurden die stabil transfizierten Zellen mit dem entsprechenden Antisense Oligonukleotid in einer Konzentration von 0,5 μM , 2,0 μM oder 4,0 μM nach der Lipofektin-Methode überschichtet. Die Inkubationszeit für die Mischung aus Lipofektin, Zelle und Oligonukleotid betrug 5 bis 12 h. Danach wurde das Medium gewechselt. Für die Studien zur Zellaufnahme der mit Gallensäure gelabelten Antisense Oligonukleotide wurden ebenfalls stabil transfizierte Leberzelllinien verwendet. Um die Zellaufnahme effektiv zu untersuchen, wurde auf die Verwendung von „Uptake-Enhancern“ verzichtet. Stattdessen können die Zellen zwei verschiedene Transport-Carrier (OATP und NTCP) für Gallensäuren überexprimieren.

Die Luciferase Aktivität wurde nach weiteren 24 h bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Für den eigentlichen Luciferase-Assay wurde ein Aliquot der Zellen mit 25 mM Tris- H_3PO_4 , 2 mM CDTA, 2 mM DTT, 10 % Glycerol und 1 % Titon X-100 bei $\text{pH} = 7,8$ lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert und die Proteinkonzentration mit einem Protein-Assay bestimmt. 10 μg - 50 μg der Proteinlösung wurden mit 100 μl Luciferase Reagenz (Promega) versetzt und die relative Lichtausbeute mit einem Luminometer für eine Zeitdauer von 30 s bestimmt. Auch in Zellkultur wurde der 100 % Wert durch eine Messung ohne Zugabe eines Antisense Oligonukleotids ermittelt.

8.2.1.3 Kontroll-Plasmide

Zum Nachweis, daß die 5'-nicht codierende Region (NCR) tatsächlich als „internal ribosomal entry site“ (IRES) fungiert, wurden zwei Kontrollplasmide kloniert. Im ersten Konstrukt wurde direkt vor das 5'-Ende des NCR eine virusfremde Sequenz aus dem Hepatitis

B Virus kloniert. Am Ende dieser Sequenz, also direkt vor dem ersten Nukleotid des NCR, wird die Translation durch ein Stop-Codon abgebrochen. Die funktionsfähige NCR sollte trotzdem als IRES fungieren und neben dem Hepatitis B-Oberflächen-Antigen (HBsAG) auch das Luciferase Reporter-Gen translatieren. Die Konzentration an HBsAG kann in einem Zellkultur Translations-Assay parallel zur Luciferase Aktivität bestimmt werden. Das hierfür verwendete Plasmid wird mit pCMVXNCRluc bezeichnet.

Im zweiten Kontrollplasmid pCMV Δ NCRluc wurden die Nukleotide 1-249 des NCR deletiert, so daß nur die Nukleotide 250-341 übrig blieben. Dieses Fragment kann die Funktion als IRES nicht mehr erfüllen, so daß lediglich HBsAG bis zu dessen Stopcodon translatiert wird, nicht jedoch das Reporter-Gen. Die beiden Kontrollplasmide sind schematisch in Abbildung 8.4 dargestellt (Alt, 1995; Alt, 1999).

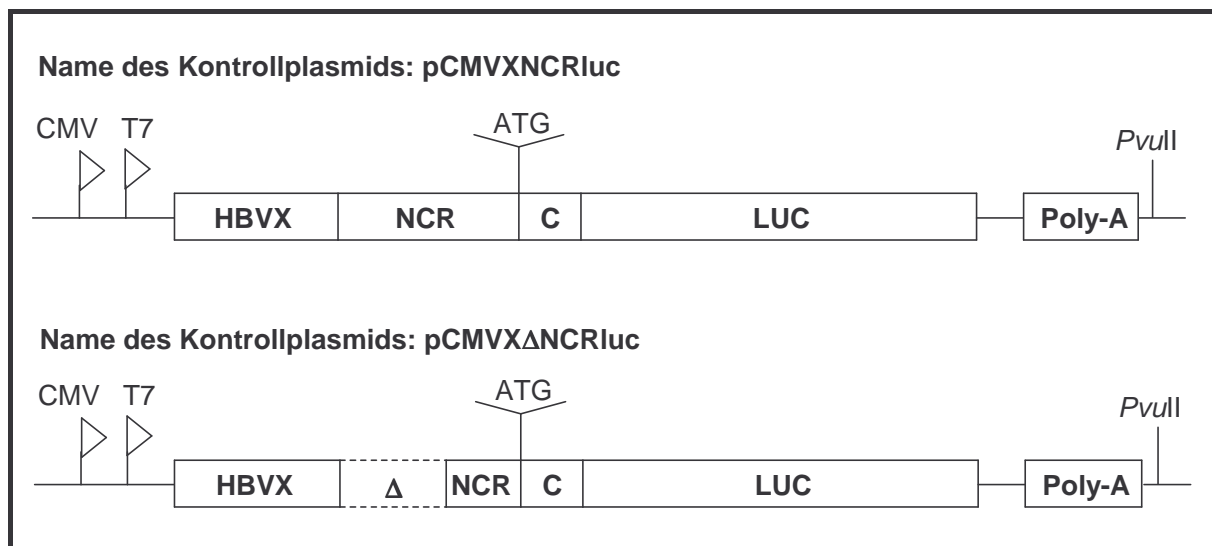


Abb. 8.4: Schematische Darstellung der Kontrollplasmide pCMVXNCRluc und pCMV Δ NCRluc für den Zellkultur Translations Assay

8.2.2 Ergebnisse der HCV-Inhibierung durch verkürzte Sequenzen

Die in Tabelle 8.1 dargestellten, terminal modifizierten Phosphorothioate wurden durch sukzessive Verkürzung des bereits gut untersuchten 23mer Antisense Oligonukleotids **tS-10** erhalten. Die Verkürzung dient dem Zweck, bei der später durchgeführten Kupplung von Gallensäuren den Gallensäurecharakter dieser Antisense Oligonukleotide zu erhöhen und eine mögliche Zellaufnahme durch aktiven Carriertransport zu erleichtern. Da ein geeignetes Replikationssystem für das Hepatitis C Virus bislang nicht etabliert ist (Lohmann, 1999), bietet sich das zuvor erläuterte *in vitro* Translations-Assay für das Screening einer

großen Zahl von Oligonukleotiden an. Mit diesem Testsystem kann der Mechanismus der Inhibierung, vor allem aber der Grad des inhibitorischen Potentials verschiedener Antisense Oligonukleotide direkt miteinander verglichen werden.

8.2.2.1 Ergebnisse der *in vitro* Translations-Assays

Zuerst wurde das Inhibitionspotential synthetisierter 20mere und 17mere mit dem ursprünglichen 23mer **tS-10** verglichen. Die Ergebnisse der durchgeführten *in vitro* Translations-Assays sind in Abbildung 8.5 graphisch dargestellt. Für die getesteten Oligonukleotide **tS-10**, **tS-11**, **tS-13** und **tS-20** wurde eine dosisabhängige, im Vergleich zur Mismatch-Kontrolle **tS-10K** hochspezifische Inhibierung der Genexpression gefunden.

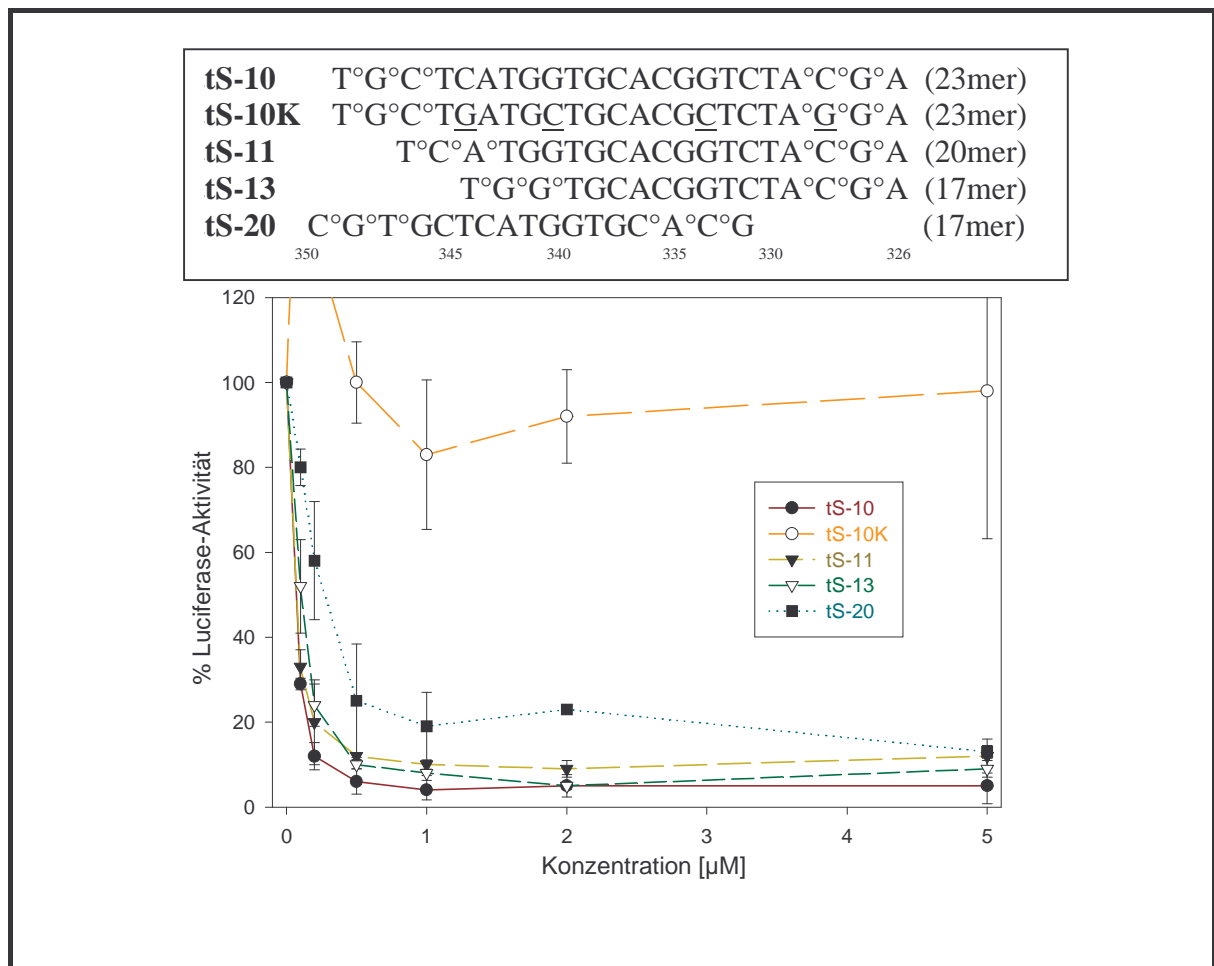


Abb. 8.5: Graphische Darstellung der Inhibierung der HCV-Genexpression durch 20mer- und 17mer-Antisense Oligonukleotide

Bereits bei sehr niedrigen Oligonukleotid Konzentrationen $<1 \mu\text{M}$ konnte für die Antisense Oligonukleotide **tS-10**, **tS-11** und **tS-13** ein exzellentes *in vitro* Inhibitionspotential gefun-

den werden. Die IC_{50} -Werte wurden für das 23mer **tS-10** zu 75 nM, für das 20mer **tS-11** zu 155 nM, und für das 17mer **tS-13** zu 100 nM bestimmt. Die maximale Inhibierung von 96 % wurde gleichermaßen für **tS-10** und **tS-13** bei einer Konzentration von 2,0 μ M gefunden, während die Sequenz **tS-11** bei dieser Konzentration eine 92 %ige Inhibierung der Genexpression ergab. Das Antisense Oligonukleotid **tS-20** ergab lediglich einen IC_{50} -Wert von 330 nM und eine maximale Inhibierung von 78 % bei einer Konzentration von 2,0 μ M. Dieses Ergebnis beruht möglicherweise auf der durch die Ausbildung einer Hairpinstruktur enthalpisch ungünstigeren Voraussetzungen zur Heteroduplexbildung von **tS-20**, da diese Sequenz komplementär zu der Hairpinstruktur der Zielsequenz ist. Wird die Länge der Oligonukleotide weiter reduziert, so verringert sich das Inhibitionspotential mit abnehmender Länge der Oligonukleotide. Beim 8mer **tS-32** kann man nicht mehr von einer spezifischen Bindung sprechen. Die Verbindungen **tS-26** (14mer) und **tS-27** (11mer) zeigen zwar noch eine dosisabhängige Inhibierung. Diese ist jedoch besonders bei niedrigen Konzentrationen deutlich schwächer als die für 17mere, 20mere und 23mere.

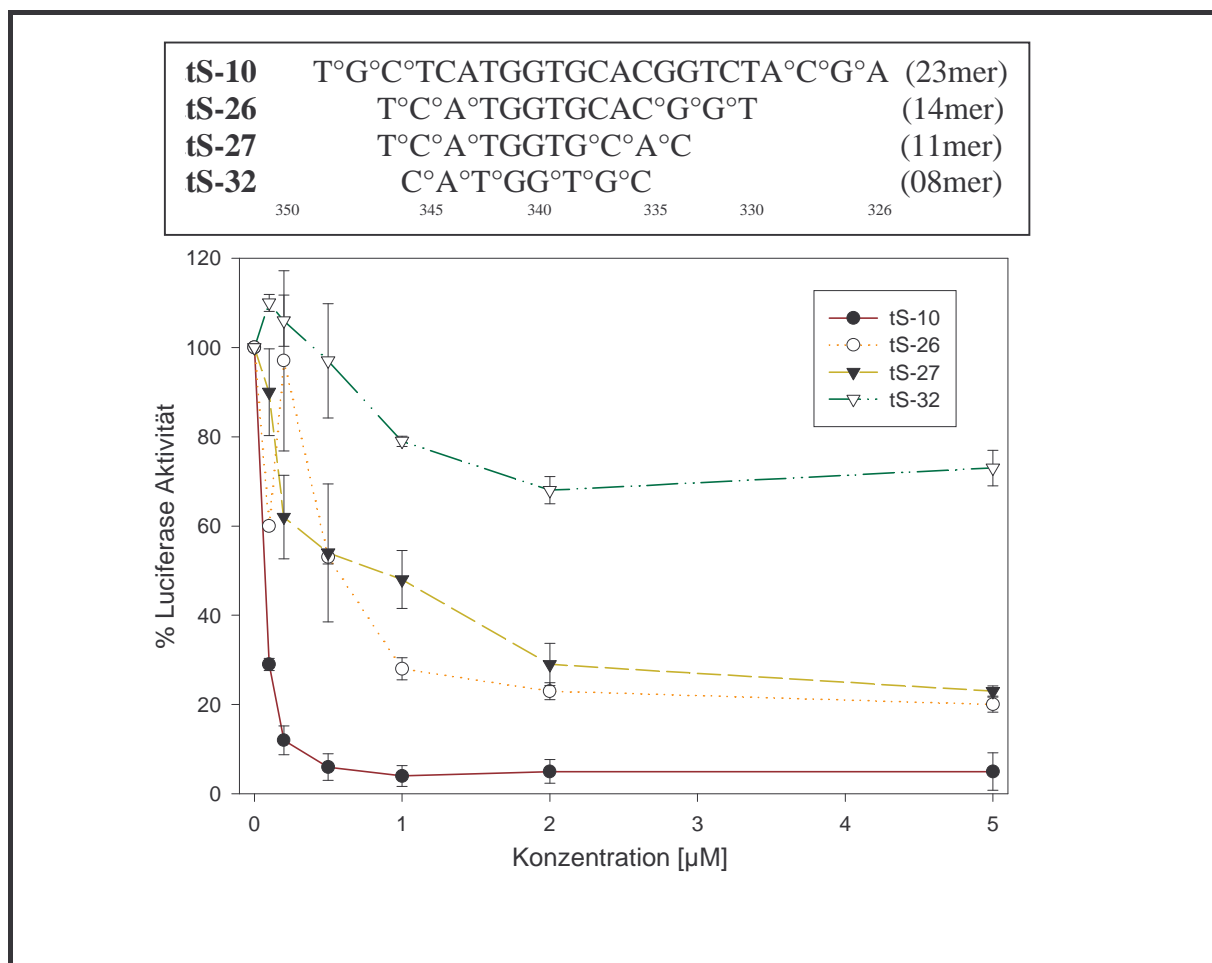


Abb. 8.6: Graphische Darstellung der Inhibierung der HCV-Genexpression durch 14mer-, 11mer- und 8mer-Antisense Oligonukleotide

Während bei einer Konzentration von 2,0 μM für die Antisense Oligonukleotide **tS-10** (23mer), **tS-11** (20mer) und **tS-13** (17mer) eine maximale Inhibierung der HCV-Genexpression von über 90 % gefunden wurde, inhibierte bei gleicher Konzentration das 14mer **tS-26** nur zu 77 % und das 11mer **tS-27** nur zu 71 %. Auch die IC_{50} -Werte der Verbindungen **tS-26** und **tS-27** erhöhten sich auf Kosten der Länge auf 570 nM bzw. 860 nM.

Aus den bisherigen Ergebnissen der *in vitro* Translations-Assays geht hervor, daß 14mere im Gegensatz zu den 17meren keine ausreichende Inhibierung der HCV-Genexpression gewährleisten. Betrachtet man die Längen der sich zur Zeit in klinischer Prüfung befindenden Antisense Oligonukleotide, so liegt man mit einem 17mer bereits an der unteren Grenze (Uhlmann, 1998a). Trotzdem wurde die Sequenz **tS-13** vom 3'-Ende her nochmals um ein bzw. zwei Nukleotide verkürzt. Wie in Abbildung 8.7 gezeigt, können die Oligonukleotide **tS-23** und **tS-24** die Genexpression deutlich weniger effizient inhibieren als das 17mer **tS-13**, aus dem sie durch Verkürzung hervorgingen. Bei diesem 17mer Antisense Oligonukleotid gegen die HCV-RNA ist damit das Verhältnis von minimaler Länge zu maximaler Antisense Wirkung optimal.

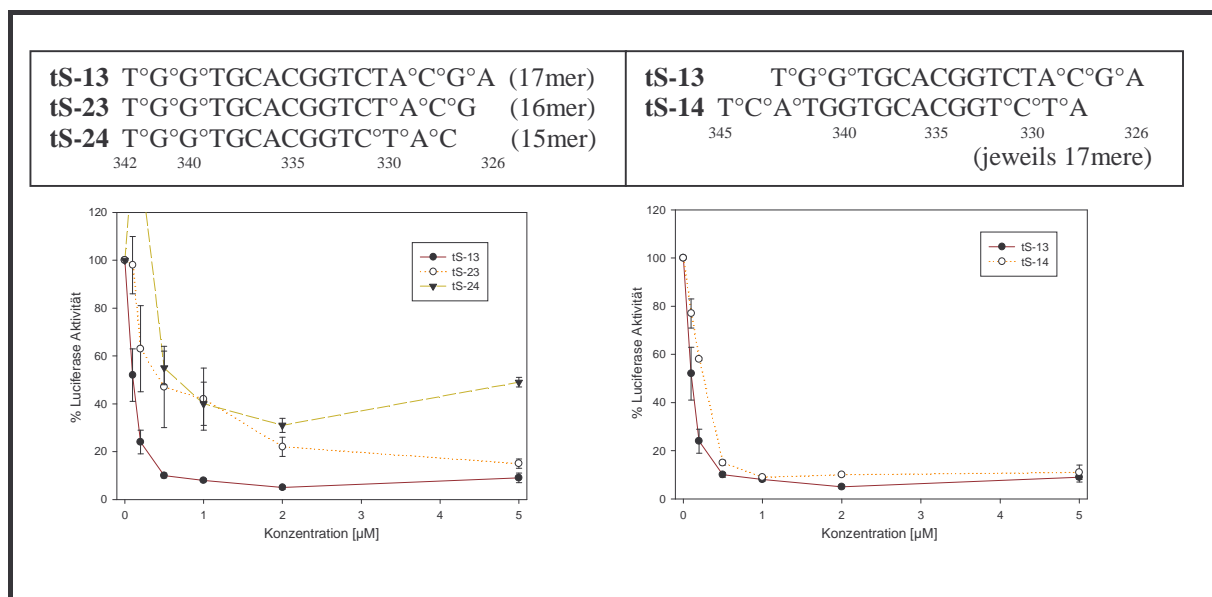


Abb. 8.7: Graphische Darstellung der Inhibierung der HCV-Genexpression durch 17mer-, 16mer- und 15mer-Antisense Oligonukleotide

Die Wahl der bestmöglichen Zielsequenz für ein 17mer erfolgte wiederum durch *in vitro* Inhibitionsexperimente. Es konnte bereits in Abb. 8.5 gezeigt werden, daß vorgefaltete Antisense Oligonukleotide eine deutlich schlechtere Antisense Wirkung aufwiesen. Für das 17mer **tS-20** wurde UV-spektroskopisch ein Schmelzpunkt von etwa 61 °C gefunden. Da

die Schmelztemperatur unabhängig von der Oligonukleotidkonzentration war, handelte es sich um einen unimolekularen Übergang, wie er beim Aufschmelzen eines Hairpins gefunden wird. Für die Verbindung **tS-12**, die im Stamm des Hairpins nur noch drei intakte Basenpaare bilden kann, wurde ein ebenfalls konzentrationsunabhängiger Schmelzpunkt von 30 °C ermittelt. Alle anderen Oligonukleotide außer **tS-15** wiesen keinen Schmelzübergang auf. 17mere, die das ursprüngliche, zu Sekundärstrukturen neigende 5'-Ende trugen, wurden aufgrund ihrer niedrigeren Antisense-Wirkung nicht berücksichtigt. Eine ausführliche thermodynamische Untersuchung dieser Hairpinregion erfolgt in Kapitel 9.2.3.

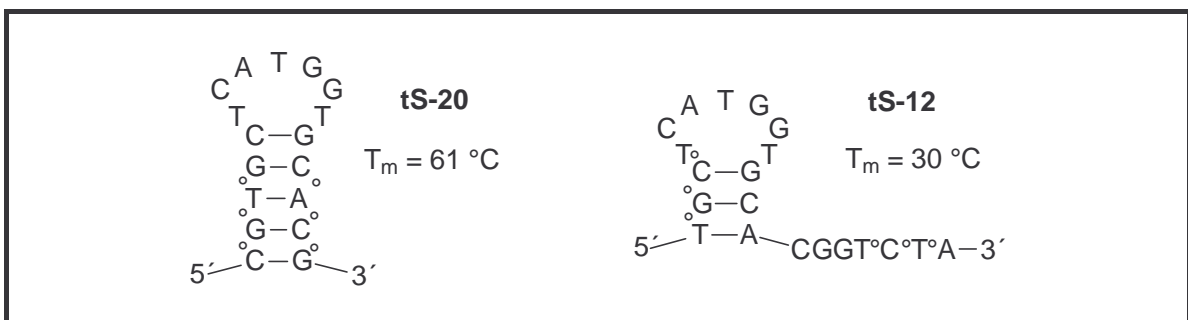


Abb. 8.8: Antisense Oligonukleotide mit Neigung zur Ausbildung von Sekundärstrukturen

Wie in Abbildung 8.7 gezeigt, zeigt das 17mer **tS-13** über den gesamten Konzentrationsbereich des *in vitro* Translations-Assays eine bessere Inhibierung der Genexpression als das um drei Nukleotide im Leseraster stromabwärts gelegene 17mer **tS-14**. Ein weiterer entscheidender Vorteil der Sequenz **tS-13** ist deren ungekürztes 3'-Ende, das nach Hybridisierung mit dem RNA-Target-Strang nahezu den gesamten Pseudoknot auflöst. Dieser RNA-Pseudoknot ist ein essentielles Strukturelement bei der Erkennung der IRES durch die Ribosomen. Allein die physische Blockade dieser Region sollte zu einer effektiven Unterdrückung der Translation führen. Das 5'-Ende von **tS-13** hybridisiert idealerweise mit der einzelsträngigen Region des Heptaloops und blockiert das erste Nukleotid des Startcodons AUG. Dieses mit den Nukleotiden 326-342 des HCV-Genoms hybridisierende Antisense Oligonukleotid wurde fortan für die Kupplung mit Gallensäuren zur Verbesserung des Drug Targeting und der hepatozellulären Aufnahme verwendet.

8.2.2.2 Ergebnisse des Zellkultur Translations-Assays

Die Zellkultur Translations-Assays wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine spezifische Inhibierung der viralen Translation auch in lebenden Zellen gefunden werden kann.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene, stabil mit dem Plasmid pCMVNCRLuc transfizierte Leberzelllinien mit dem Antisense Oligonukleotid unter Verwendung von Lipofektin inkubiert. Die Inkubationszeit für die Mischung aus Lipofektin, Zelle und Oligonukleotid betrug 5 - 12 h. Danach wurde das Medium gewechselt. Die Luciferase Aktivität wurde nach weiteren 12 - 24 h bestimmt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit einem Protein-Assay wurde die relative Lichtausbeute mit einem Luminometer für eine Zeitdauer von 30 s gemessen. Der 100 % Wert wurde durch eine Messung ohne Zugabe eines Antisense Oligonukleotids ermittelt.

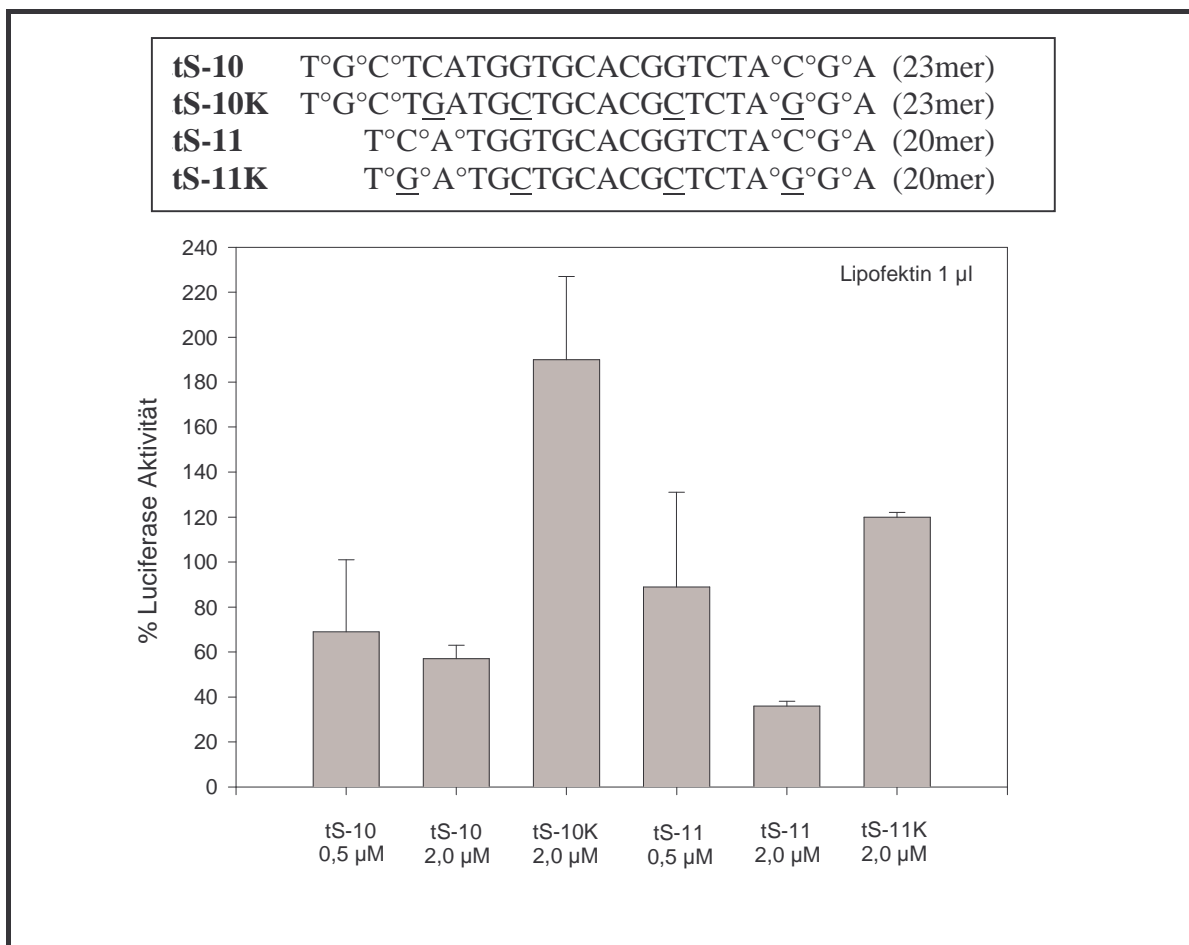


Abb. 8.9: Graphische Darstellung der Inhibierung des HCV-Luciferase Fusionsgens im Zellkultur Translations-Assay

Sowohl für das ursprüngliche 23mer **tS-10** als auch für das 20mer **tS-11** konnte bei einer Wirkstoffkonzentration von 2 µM eine im Vergleich zu den Mismatch-Kontrollen **tS-10K** und **tS-11K** spezifische Inhibierung des HCV-Luciferase Fusionsgens gefunden werden. Die Absolutwerte der gemessenen Luciferase Aktivität liegen jedoch bei gleichen Konzentrationen mit einer maximalen Inhibierung von 57 % für **tS-10** und 36 % für **tS-11** er-

heblich über denen aus den *in vitro* Translations-Assays. Möglicherweise liegt die Wirkstoffkonzentration trotz der Verwendung von Lipofektin als „Uptake-Enhancer“ im intrazellulären Raum unter der extrazellulär eingesetzten Konzentration von 2 μM .

Die für die Gallensäure-Modifikation vorgesehenen 17mere **tS-13** und **tB-13** wurden ebenfalls im Zellkultur Translations-Assay untersucht. Dabei wurde sogar noch eine bessere Inhibierung der HCV-Genexpression als für das 23mer **tS-10** und das 20mer **tS-11** beobachtet. Die maximale Inhibierung wurde jeweils bei einer Konzentration von 4 μM gefunden. Sie betrug für **tS-13** 81 % und für **tB-13** 71 % und war im Vergleich zu den Mismatch-Kontrollen hochspezifisch. Damit konnte gezeigt werden, daß die durch *in vitro* Translations-Assays für die Kupplung an Gallensäuren ausgewählten Sequenzen **tS-13** und **tB-13** auch in Zellkultur spezifisch und effizient wirken.

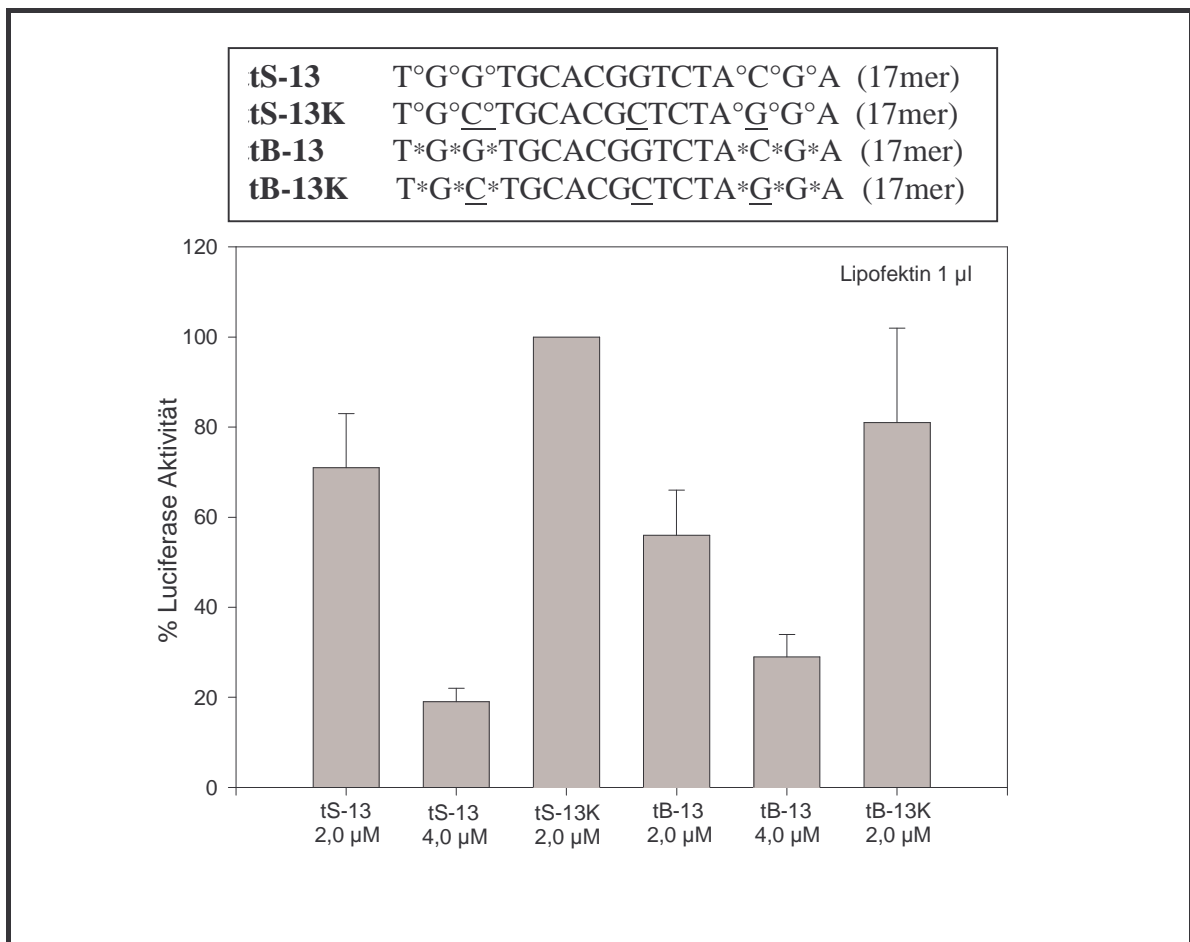


Abb. 8.10: Graphische Darstellung der Inhibierung des HCV-Luciferase Fusionsgens im Zellkultur Translations-Assay

8.3 Gallensäure- und Cholesterol-gekuppelte Oligonukleotide gegen HCV

Die kürzeste Sequenz mit den bestmöglichen Inhibitionseigenschaften ist das Antisense Oligonukleotid **tS-13**. Diese Verbindung wurde durch Verkürzung des ursprünglichen 23mers **tS-10** durch Entfernen von sechs Nukleotiden an dessen 5'-Ende erhalten. Während die ursprüngliche Sequenz gegen die Nukleotide 326-348 des HCV-Genoms gerichtet war, ist der verkürzte Wirkstoff zu den Nukleotiden 326-342 komplementär. Neben der reduzierten Länge bietet **tS-13** gegenüber **tS-10** den Vorteil, daß dieses Antisense Oligonukleotid keine Neigung zur Bildung von Sekundärstrukturen aufweist und sein 5'-Ende gegen eine einzelsträngige Loopregion auf der Zielsequenz gerichtet ist, was die Bildung eines Heteroduplex erleichtern kann.

Das 17mer wurde wie in Kapitel 7.3 erläutert terminal mit Phosphorthioaten (**tS**) oder Benzylphosphonaten (**tB**) am Phosphatrückgrat modifiziert. Darüber hinaus wurde das 5'-Ende mit Cholesterol (**X**), Cholsäure (**Y**) oder Taurocholsäure (**Z**) derivatisiert. Zur Überprüfung des Drug Targeting und der hepatozellulären Aufnahme wurde zusätzlich am 3'-Ende der Fluoreszenz-Farbstoff Fluoreszein (**F**) angekuppelt. Für eine mögliche radioaktive Markierung (**R**) am 3'-Ende wurde an dieser Position das letzte Nukleotid deletiert, das nun postsynthetisch durch ein radiogelabeltes Nukleotid ersetzt werden kann. Die Extinktionskoeffizienten wurden unabhängig von der Modifizierung für die Derivate von **tS-13** zu 167,24 und für die Mismatch-Kontrollen **tS-13K** zu 162,92 bestimmt. Eine vollständige Übersicht über die erwähnten Antisense Oligonukleotide ist in Tab. 8.2 gegeben.

Name	Derivate des Antisense Oligonukleotids tS-13 Sequenz in 5' → 3'-Richtung	Ber. Masse [Da]	Gef. Masse [Da] ESI [M-H] ⁻
	342 326		
tS-13	T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	5322,8	5322,0
tS-13K	T°G°C°TGCACGCTCTA°G°G°A	5282,8	5282,3
tB-13	T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	5671,2	5669,7
tB-13K	T*G*C*TGCACGCTCTA*G*G*A	5631,2	5630,4
tS-13X	X - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	5814,5	5814,4
tS-13KX	X - T°G°C°TGCACGCTCTA°G°G°A	5774,5	5774,3
tB-13X	X - T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	6162,9	6163,4
tB-13KX	X - T*G*C*TGCACGCTCTA*G*G*A	6122,9	6122,9

tS-13Y	Y - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	5836,4	5836,8
tS-13KY	Y - T°G° <u>C</u> °TGCACGCTCTA°G°G°A	5796,4	5795,9
tB-13Y	Y - T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	6184,8	6185,4
tB-13KY	Y - T*G* <u>C</u> *TGCACGCTCTA*G*G*A	6144,8	6145,3
tS-13Z	Z - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	5943,6	5944,8
tS-13KZ	Z - T°G° <u>C</u> °TGCACGCTCTA°G°G°A	5903,5	5904,0
tB-13Z	Z - T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	6291,9	6292,3
tB-13KZ	Z - T*G* <u>C</u> *TGCACGCTCTA*G*G*A	6251,9	6252,3
tS-13F	T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A - F	5921,4	5920,8
tS-13FX	X - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A - F	6413,1	6415,6
tS-13FY	Y - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A - F	6435,0	6436,8
tS-13FZ	Z - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A - F	6542,1	6544,9
tS-13R	T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G	4993,6	4993,4
tS-13RX	X - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G	5486,2	5485,6
tS-13RY	Y - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G	5507,2	5506,9
tS-13RZ	Z - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G	5614,3	5614,1

Tab. 8.2: Phosphatrückgrat- sowie 3'- und/oder 5'-modifizierte Derivate der Sequenz **tS-13**. Abkürzungen: ° = Phosphorothioat, * = Benzylphosphonat, _ = Mismatch, **K** = Mismatch-Kontrolle, **X** = Cholesterol, **Y** = Cholsäure, **Z** = Taurocholsäure, **F** = Fluoreszein, **R** = um ein Nukleotid am 3'-Ende verkürztes 16mer für die radioaktive Markierung.

8.3.1 Analytik und Eigenschaften der Antisense Oligonukleotide gegen HCV

Die Synthese der unterschiedlich modifizierten Oligonukleotide wurde ausführlich in den Kapiteln 7.3 und 12.3 beschrieben. Die Analytik dieser Verbindungen beispielsweise mit Hilfe der RP-HPLC vermittelt einen Eindruck der Auswirkungen der verschiedenen Modifikationen auf die Lipophilie der Antisense Oligonukleotide. Mit Hilfe der analytischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird die Reinheit der hergestellten Wirkstoffe überprüft. Die UV-spektroskopische Untersuchung des Hybridisierungsverhaltens dieser neuen Klasse von Oligonukleotiden zu DNA- und RNA-Zielsequenzen erlaubt Rückschlüsse, ob die am 3'- oder 5'-Ende kovalent gebundenen Biomoleküle einen positiven oder negativen Einfluß auf den Schmelzpunkt der Duplices ausüben. Dabei können ungünstige sterische Wechselwirkungen eine Erniedrigung des T_m -Wertes zu Folge haben, während hydrophobe Wechselwirkungen des Steroidgerüsts eine Erhöhung bewirken können.

8.3.1.1 RP-HPLC und Lipophilie der Antisense Oligonukleotide

Die am DNA-Synthesizer hergestellten und durch RP-HPLC aufgereinigten Antisense Oligonukleotide wurden anschließend unter einheitlichen Bedingungen der Analytik durch RP-HPLC zugeführt. Zu diesem Zweck wurden 0,1 bis 0,2 OD₂₆₀-Einheiten des Oligonukleotids in 20 µl Wasser gelöst und auf eine analytische Säule der Fa. Merck mit endgecaptem Purospher STAR RP 18 Material (3 µm) aufgespritzt. Die Chromatographie wurde mit einer Flußrate von 1,0 ml/min und einem linearen Gradienten von 0 % bis 60 % Acetonitril in 0,1 M TEAA-Puffer (pH = 7,0) innerhalb von 20 Minuten durchgeführt. Die Erhöhung des Acetonitril Gehalts auf 60 % erfolgte in den im folgenden abgebildeten HPLC-Diagrammen innerhalb der Minuten 8 bis 28. Die UV-Detektion erfolgte bei 260 nm. Die Fluoreszein markierten Oligonukleotide wurden zusätzlich am Fluoreszenzdetektor bei 494 nm analysiert (siehe auch Kap. 12.4.4).

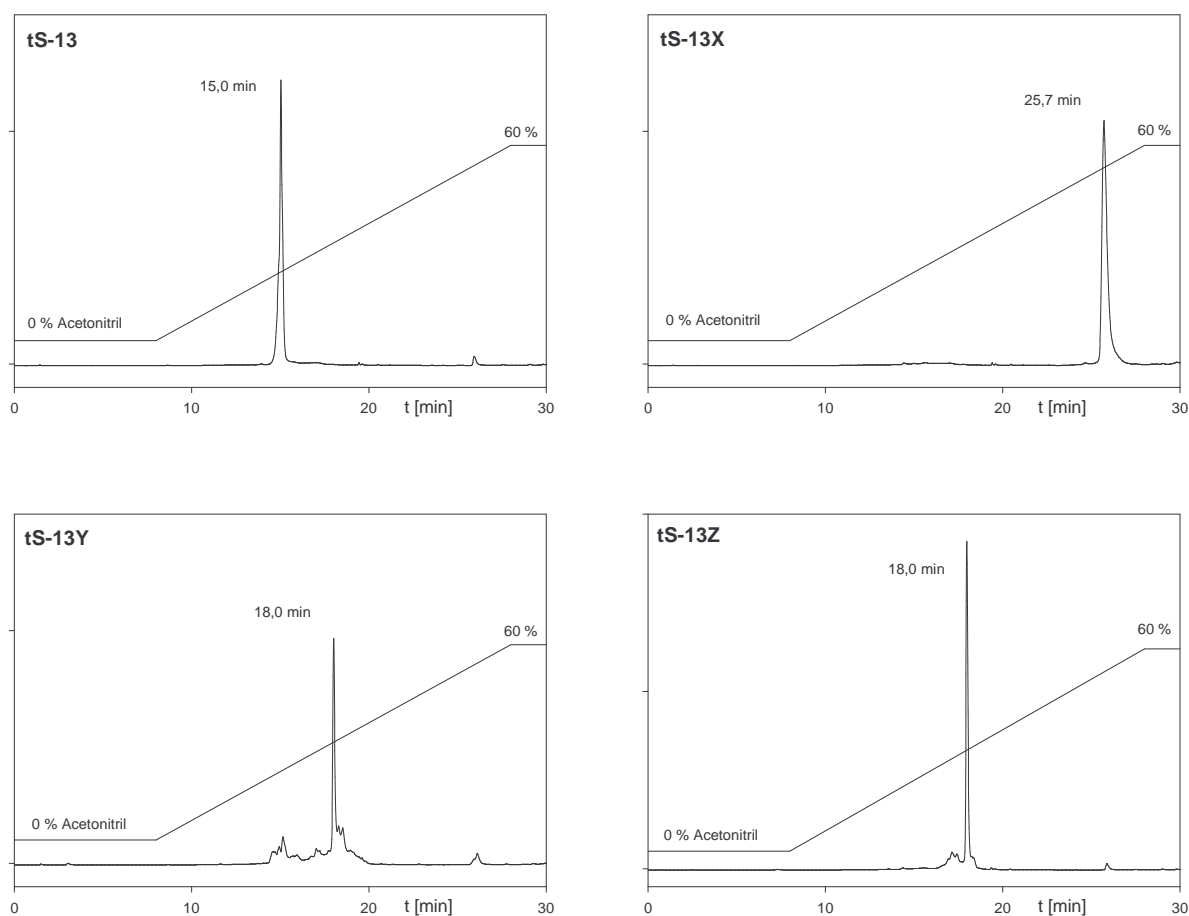


Abb. 8.11: Analytische RP-HPLC Diagramme 5'-unterschiedlich modifizierter Phosphorothioate (**X** = Cholesterol, **Y** = Cholsäure, **Z** = Taurocholsäure)

In Abb. 8.11 sind die analytischen RP-HPLC Diagramme der Antisense Oligonukleotide **tS-13**, **tS-13X**, **tS-13Y** und **tS-13Z** gezeigt. Durch die Kupplung der Gallensäuren Cholsäure und Taurocholsäure verlängern sich die Retentionszeiten, so daß eine chromatographische Trennung 5'-modifizierter und 5'-unmodifizierter Oligonukleotide möglich ist. Im Vergleich zum Cholesterol-Konjugat erhöht sich die Lipophilie der Gallensäure-Konjugate erwartungsgemäß nur geringfügig. Die folgenden HPLC Diagramme zeigen den Einfluß der analogen Benzylphosphonate auf die Retentionszeiten. Bei den Benzylphosphonaten werden jeweils die drei endständigen Phosphorothioate durch lipophile Benzylphosphonate ersetzt.

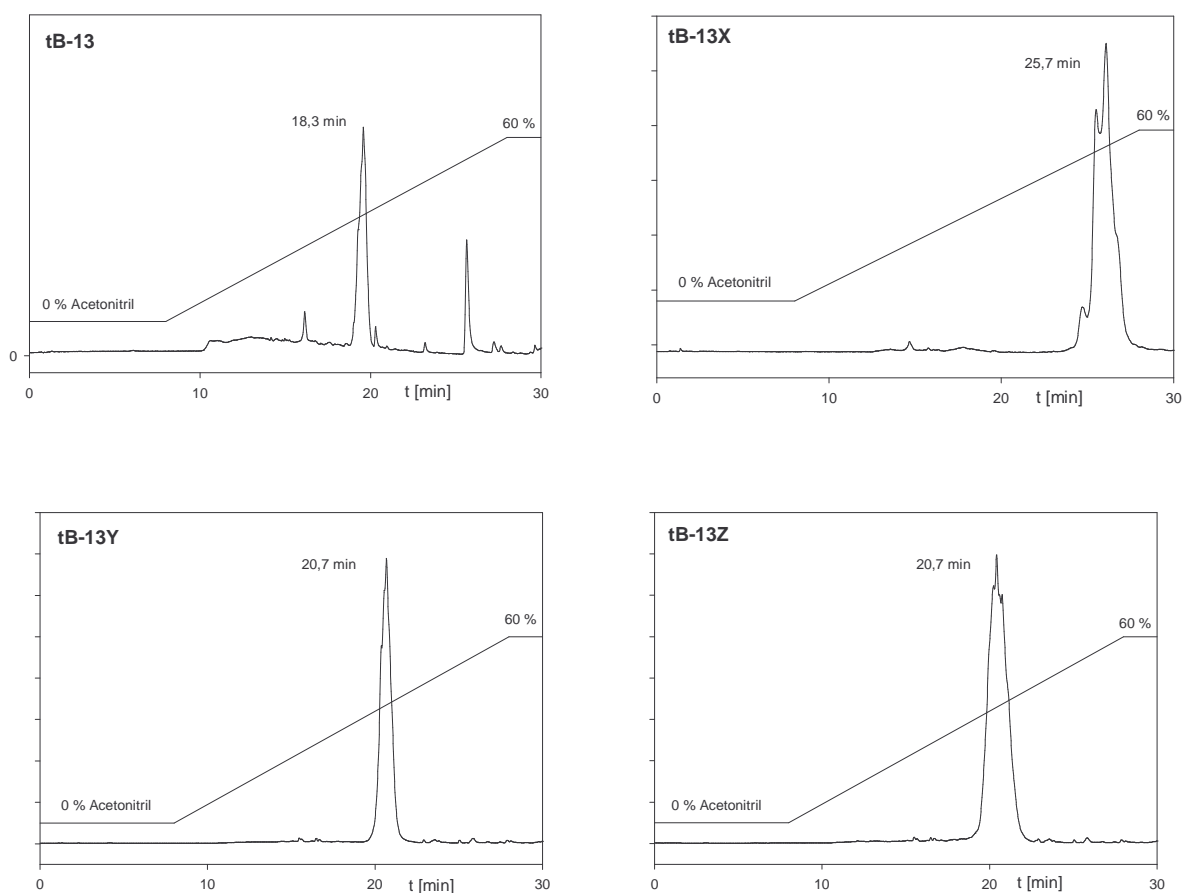
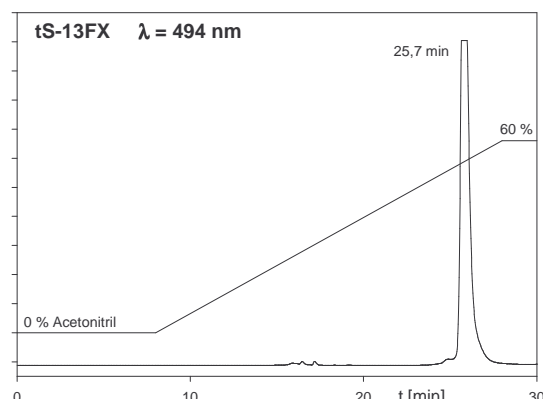
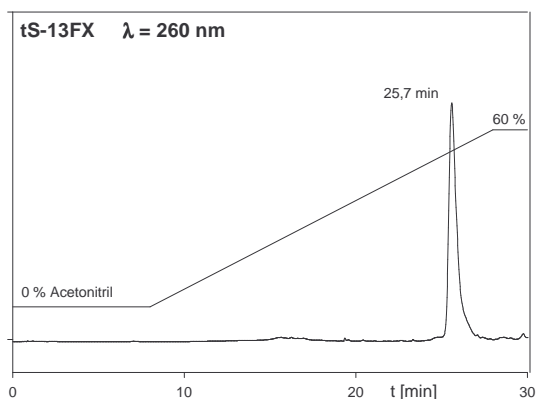
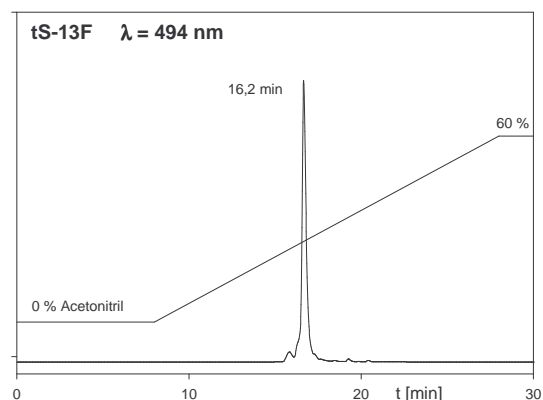
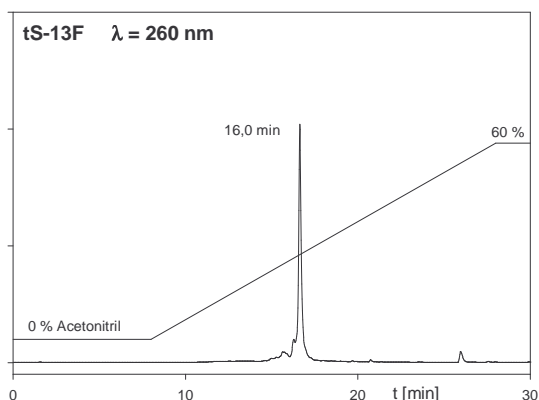


Abb. 8.12: Analytische RP-HPLC Diagramme 5'-unterschiedlich modifizierter Benzylphosphonate (*X* = Cholesterol, *Y* = Cholsäure, *Z* = Taurocholsäure)

Die sechs an den endständigen Internukleotidbindungen eingeführten Benzylgruppen führen zu einer Verlängerung der Retentionszeiten in gleichem Maße wie die Kupplung einer Gallensäure am 5'-Ende. Unter den gegebenen RP-HPLC Bedingungen addieren sich diese

Effekte. Antisense Oligonukleotide wie **tB-13Y** und **tB-13Z**, die mit sechs Benzylmodifikationen und einer Gallensäure modifiziert wurden, erfahren in etwa eine doppelt so lange Verzögerung wie die analogen Phosphorothioate **tS-13Y** und **tS-13Z**. Hingegen wird die Lipophilie der Cholesterol-Derivate **tB-13X** und **tS-13X** vollkommen durch die Cholesterol Verknüpfung bestimmt. Die Internalisierung der Benzylphosphonate hat keinen signifikanten Einfluß auf das Elutionsverhalten dieser Derivate. Bei einem Vergleich der HPLC Diagramme der Phosphorothioate (Abb. 8.11) mit den analogen Benzylphosphonaten (Abb. 8.12) fällt bei letzteren die starke Verbreiterung der Peaks auf. Der Peak des Cholesterol modifizierten Oligonukleotids **tB-13X** zeigt sogar mehrere Spitzen. Trotzdem handelt es sich bei **tB-13X** um ein einheitliches Produkt, wie durch Massenspektrometrie gezeigt werden konnte. Da die Kupplung des Cholesterols der letzte Schritt der Phosphoramiditsynthese ist und dadurch erst die starke Retardierung gegenüber Fehlsequenzen induziert wird, scheiden Abbruchsequenzen als Ursache für die ungewöhnliche Peakform aus, außer beim Entschützen treten Nebenreaktionen auf. Der Grund für die Peakverbreiterung beruht auf der Diastereoisomerie. Scheinbar weisen die $2^6 = 64$ diastereomeren Benzylphosphonate größere Abweichungen in ihrem Elutionsverhalten als die ebenfalls 64 diastereomeren Phosphorothioate auf. Dieses auffällige Verhalten der Benzylphosphonate wurde schon in früheren Arbeiten beobachtet (Eisenhardt, 1996; Samstag, 1996).



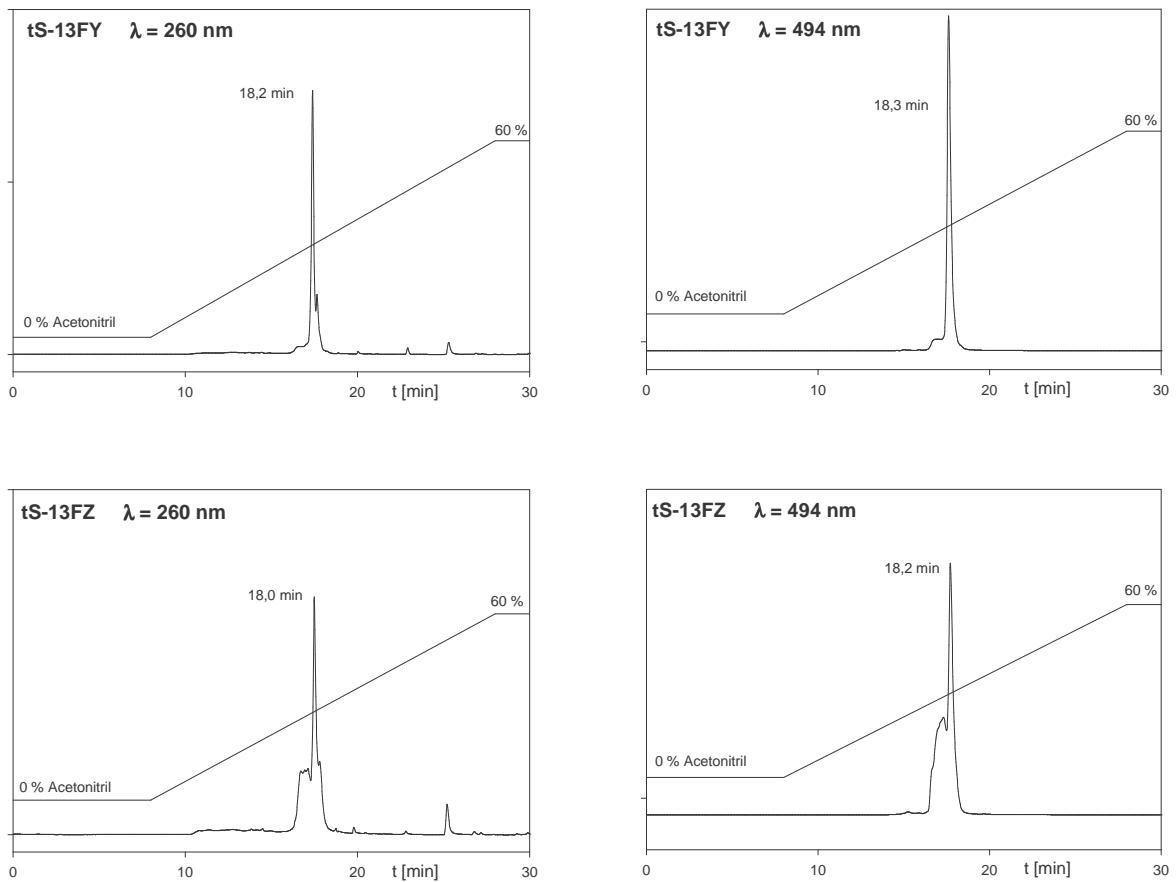


Abb. 8.13: Analytische RP-HPLC Diagramme 5'-unterschiedlich modifizierter Phosphorothioate ($X = \text{Cholesterol}$, $Y = \text{Cholsäure}$, $Z = \text{Taurocholsäure}$) mit 3'-Fluoreszein-Markierung (F) bei 260 nm (jeweils links) und 494 nm (jeweils rechts)

Zur Untersuchung des Drug Targeting und der Zellaufnahme der Antisense Oligonukleotide müssen diese mit geeigneten Markern versehen werden. Eine Möglichkeit ist die Kupplung mit einem Farbstoff. Da die 5'-Position der Oligonukleotide bereits der Derivatisierung durch Cholesterol oder Gallensäuren vorbehalten ist, muß der Farbstoff am 3'-Ende angehängt werden. Dies gelingt effektiv mit kommerziell erhältlichem Trägermaterial für die Festphasensynthese, das als ersten Baustein den Fluoreszenz-Farbstoff Fluoreszein trägt. Das vollständige Oligonukleotid wird standardmäßig in 3'-5'-Richtung an den Farbstoff synthetisiert.

In Abbildung 8.13 sind die HPLC Diagramme der Fluoreszein markierten Oligonukleotide dargestellt. Zusätzlich zur UV-Detektion bei 260 nm wurde mit einem Fluoreszenz Detektor bei 494 nm überprüft, daß die Substanzen **tS-13F**, **tS-13FX**, **tS-13FY** und **tS-13FZ** kein freies Fluoreszein enthielten, das die Untersuchung der Zellaufnahme beein-

flussen kann. Die Gallensäure und Fluoreszein gelabelten Oligonukleotide **tS-13FY** und **tS-13FZ** wurden zusätzlich durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgereinigt, um eine hohe Reinheit zu gewährleisten.

Wie die HPLC Diagramme zeigen, ist der Einfluß der Fluoreszein Markierung auf die HPLC-Retentionszeiten der Oligonukleotide sehr gering. Von seiner molekularen Masse jedoch ist der Fluoreszein-Farbstoff mit einer Gallensäure vergleichbar und kann sich möglicherweise ungünstig auf die zelluläre Aufnahme auswirken. Die kovalente Verknüpfung des eigentlichen Gallensäure-Oligonukleotid Konjugats mit einem Farbstoff stellt einen erheblichen Eingriff in die molekulare Struktur des Wirkstoffs dar. Deshalb wurde nach alternativen Möglichkeiten zur Markierung der Antisense Oligonukleotide gesucht.

Eine einfache Möglichkeit, eine radioaktive Markierung in eine Nukleinsäure einzubringen, ist die enzymatische Phosphorylierung der 5'-Hydroxylgruppe mit einer Kinasen. Dabei wird das $[\gamma^{32}\text{P}]$ -Phosphat von $[\gamma^{32}\text{P}]$ -ATP auf die 5'-Hydroxylgruppe übertragen, so daß ein 5'-Phosphat resultiert. Die 5'-Position kann aber bei vorliegender Gallensäure-Derivatisierung nicht phosphoryliert werden. Stattdessen läßt sich am 3'-Ende mit Hilfe einer terminalen Transferase und einem Didesoxynukleosidtriphosphat ein Didesoxynukleotid anknüpfen. Deshalb wurden alle 5'-modifizierten Sequenzen als 16mere, also am 3'-Ende um ein Nukleotid (Desoxyadenosin) verkürzt, synthetisiert. Der fehlende Baustein wird an die Oligonukleotide **tS-13R**, **tS-13RX**, **tS-13RY** und **tS-13RZ** durch die Reaktion mit $\text{dd}[\alpha^{35}\text{S}]\text{-ATP}$ in Gegenwart von terminaler Transferase kovalent angeknüpft. Die α -Phosphateinheit des Triphosphats trägt dabei den radioaktiven Label in Form von ^{35}S .

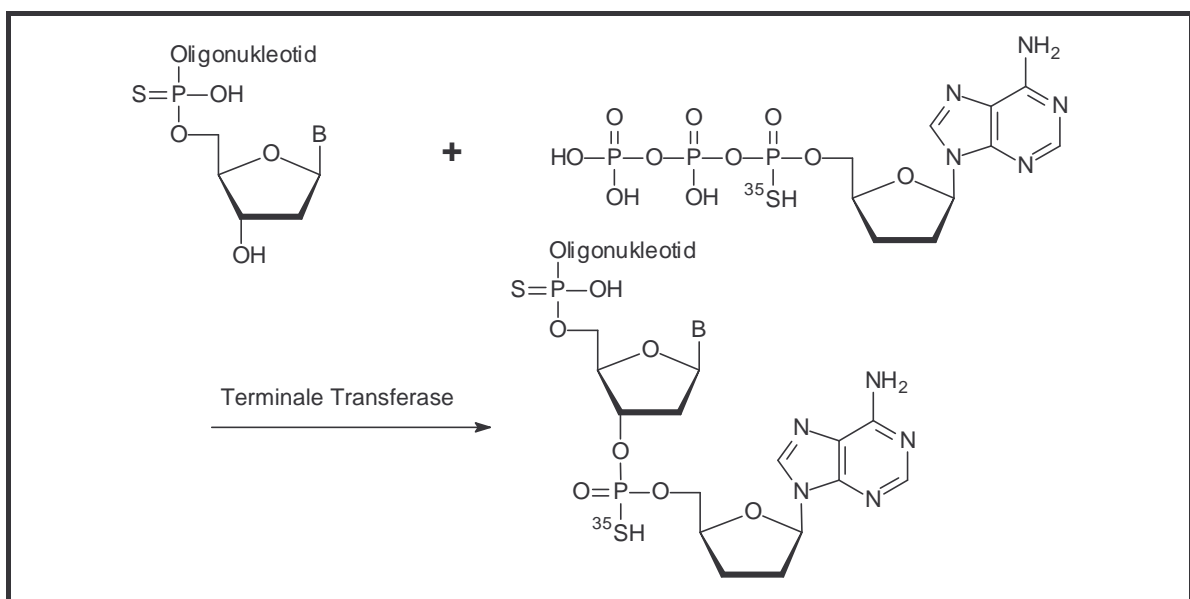


Abb. 8.14: Postsynthetische Radiomarkierung von Oligonukleotiden am 3'-Ende

Tabelle 8.3 gibt die Ergebnisse der analytischen RP-HPLC zusammengefaßt in tabellarischer Form wieder. Die wichtigsten Ergebnisse, die aus den HPLC-Elutionszeiten abgeleitet werden konnten, zeigten, daß der lipophile Charakter der Cholesterol modifizierten Oligonukleotide allein durch den aliphatischen Cholesterolrest bestimmt wird. Gallensäure modifizierte Oligonukleotide erfahren eine deutlich niedrigere Verzögerung ihrer Elutionszeit. Der Unterschied zu 5'-unmodifizierten Oligonukleotiden ermöglicht jedoch eine chromatographische Trennung. Die Einführung von Benzylgruppen in das Phosphatrückgrat führt bei Gallensäure Oligonukleotid Konjugaten zu einer additiven Verlängerung der Elutionszeiten. Der Einfluß einer zusätzlichen 3'-Fluoreszein Derivatisierung ist unerheblich unter den vorgegebenen Chromatographiebedingungen.

Name	Derivate des Antisense Oligonukleotids tS-13	Elutionszeit [min]	Acetonitril %
tS-13	T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	15,0	21
tB-13	T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	18,3	31
tS-13X	X - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	25,7	53
tB-13X	X - T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	25,7	53
tS-13Y	Y - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	18,0	30
tB-13Y	Y - T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	20,7	38
tS-13Z	Z - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	18,0	30
tB-13Z	Z - T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	20,8	38
tS-13F	T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A - F	16,0	24
tS-13FX	X - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A - F	25,7	53
tS-13FY	Y - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A - F	18,2	30
tS-13FZ	Z - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A - F	18,4	31

Tab. 8.3: RP-HPLC-Elutionszeiten der verschiedenen modifizierten Antisense Oligonukleotide gegen HCV-RNA, Gradient: 0 % - 60 % Acetonitril in 0,1 M TEAA bei pH = 7,0 von 8 bis 28 min; Säulenmaterial: Purospher STAR RP 18 Material (3 µm) von Merck

8.3.1.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Antisense Oligonukleotide

Zur weiteren Überprüfung der Reinheit der Antisense Oligonukleotide ist die analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) geeignet. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern Moleküle mit einer Nettoladung durch das Polyacrylamid-Gel. Die Trennung erfolgt durch die Wirkung des Gels als Molekularsieb: Moleküle, die im Verhältnis zu den

Gelporen klein sind bewegen sich rasch vorwärts. Solche, die viel größer sind als die Gelporen, sind nahezu unbeweglich. Für die modifizierten und unmodifizierten 17mer Antisense Oligonukleotide hat sich die durch ein 16 %iges Polyacrylamid-Gel gebildete Vernetzung als optimal herausgestellt. Im Gegensatz zu den hier verwendeten HPLC-Methoden können in einem Polyacrylamid-Gel Oligonukleotide, die sich nur um ein Nukleotid in ihrer Länge unterscheiden, getrennt werden. Dieses Potential wird beispielsweise bei der Maxam-Gilbert Sequenzierung ausgeschöpft. Die Durchführung einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist in Kapitel 12.4.5 beschrieben.

Das auf dem Gelfoto abgebildete durch Silberfärbung entwickelte Polyacrylamid-Gel zeigt auf den sechs Bahnen von links nach rechts das unmodifizierte DNA-17mer **sense DNA 17**, das unmodifizierte DNA-23mer **sense DNA 23** sowie die Antisense Oligonukleotide **tS-13R**, **tS-13RX**, **tS-13RY** und **tS-13RZ**. Das als Kontrolle eingesetzte 17mer auf Bahn 1 ist erwartungsgemäß deutlich tiefer gewandert als das 23mer auf Bahn 2. Das unmodifizierte 16mer **tS-13R** auf Bahn 3 ist vergleichsweise hoch gelaufen, während die Laufhöhe der 5'-modifizierten 16mer Oligonukleotide **tS-13RX**, **tS-13RY** und **tS-13RZ** auf den Bahnen 4 bis 6 wiederum erwartungsgemäß zwischen denen der Kontrollen liegt. Die schwachen, deutlich oberhalb der gewünschten Produkte liegenden Signale stammen möglicherweise von einer Dimerisierung der Oligonukleotide.

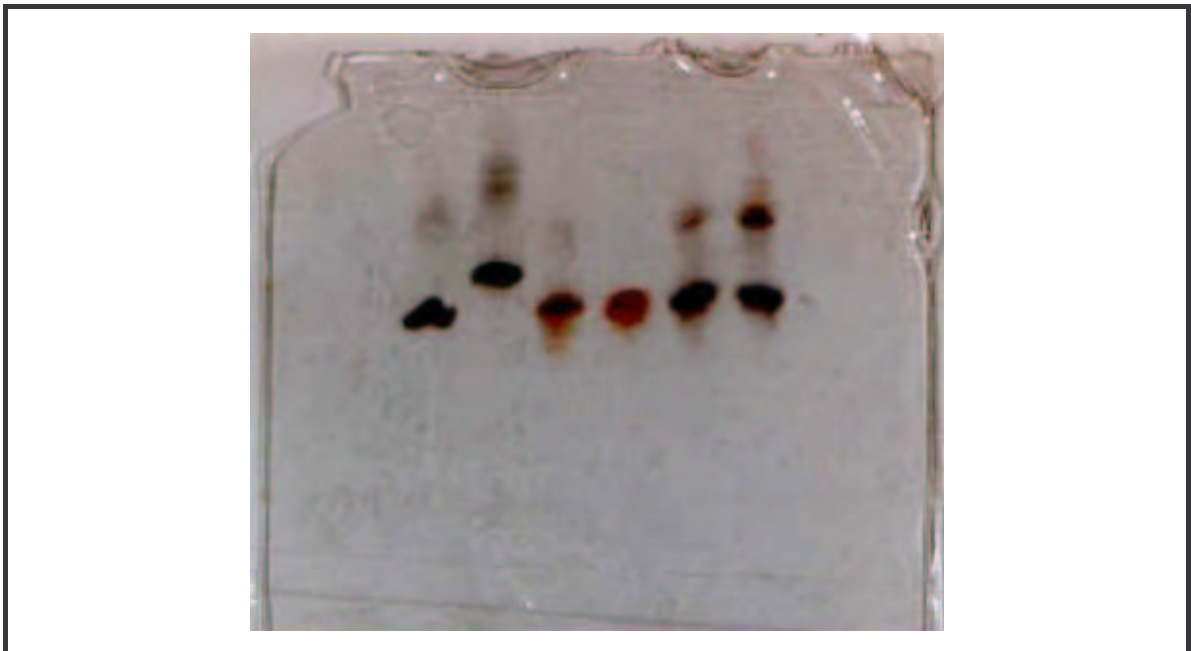


Abb. 8.15: Analytisches Polyacrylamidgel (16 % PAA) nach Silberfärbung. Bahn 1: DNA 17mer **sense DNA 17**, Bahn 2: DNA 23mer **sense DNA 23**, Bahn 3: **tS-13R**, Bahn 4: **tS-13RX**, Bahn 5: **tS-13RY**, Bahn 6: **tS-13RZ**

Ein ähnliches Ergebnis erhält man für die Fluoreszein gelabelten Antisense Oligonukleotide **tS-13F**, **tS-13FX**, **tS-13FY** und **tS-13FZ**. Das analytische Polyacrylamid-Gel wurde vor der präparativen PAGE angefertigt und zeigt die bereits hohe Reinheit der Verbindungen. Die 3'-Fluoreszein und 5'-Cholesterol oder 5'-Gallensäure modifizierte 17mer Antisense Oligonukleotide besitzen molekulare Massen, die erheblich näher am DNA 23mer (Bahn 2) als am DNA 17mer (Bahn 1) liegen. Dies spiegelt sich auch deutlich in ihrem Laufverhalten wieder: Im Vergleich zu den modifizierten 16meren (Abb. 8.15), deren molekulare Massen und Laufhöhen näher am DNA 17mer liegen, findet man für die 3'- und 5'- modifizierte Oligonukleotide **tS-13FX**, **tS-13FY** und **tS-13FZ** Laufhöhen knapp unterhalb der des DNA 23mers (Bahn 2). Ein Gelphoto der präparativen Gelelektrophorese von Verbindung **tS-13FZ** ist in Abschnitt 12.3.2 abgebildet.

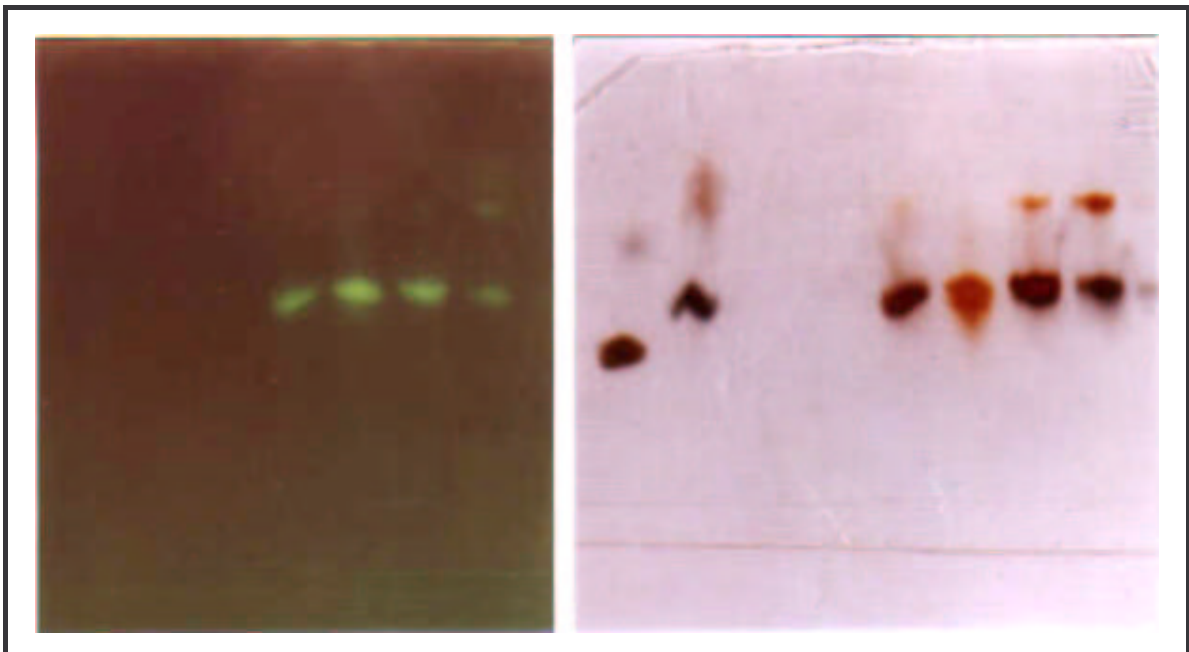


Abb. 8.16: Analytisches Polyacrylamidgel (16 % PAA) auf Kieselgelplatte bei 366 nm mit Gelbfilter (links) und nach Silberfärbung (rechts). Bahn 1: *sense* DNA 17, Bahn 2: *sense* DNA 23, Bahn 3: **tS-13F**, Bahn 4: **tS-13FX**, Bahn 5: **tS-13FY**, Bahn 6: **tS-13FZ**

8.3.1.3 UV-Schmelzkurven der Antisense Oligonukleotide

Mit Hilfe von temperaturabhängigen UV-Schmelzexperimenten lassen sich die T_m -Werte der Hybride aus modifizierten Antisense Oligonukleotiden und verschiedenen DNA- und RNA Zielsequenzen ermitteln. Basis dieser Messungen ist die Hypochromizität. Darunter versteht man die Tatsache, daß Basenstapelungswechselwirkungen eine Abnahme des Ex-

tinktionskoeffizienten ϵ des Oligonukleotids bewirken, verglichen mit der Summe aller seiner Nukleotidbausteine. Die Hypochromizität ist eine Folge der Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, die von der dreidimensionalen Struktur eines Oligonukleotids abhängen.

Bei der Durchführung eines temperaturabhängigen UV-Schmelzexperiments wird die Extinktion als Funktion der Temperatur mit einem UV-Spektrometer gemessen. Beim Erwärmen geht die geordnete Struktur einer Doppelhelix mit den gestapelten Heterozyklen in eine ungeordnete Knäuel-Struktur über. Beim Prozeß des Aufschmelzens der Helix erhöht sich die Extinktion und man spricht von der Hyperchromizität. Der Mittelpunkt dieses Übergangs, bei dem genau die Hälfte aller Moleküle im ungeordneten Zustand vorliegt, ist die für einen Duplex charakteristische Schmelztemperatur. Der T_m -Wert ist abhängig von der Basenzusammensetzung, der Sequenz, der Kettenlänge und auch von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung.

Das Ausmaß der Hypochromizität ist wellenlängenabhängig. Für AT-Basenpaare liegt das Hypochromizitätsmaximum bei 260 nm, für GC-Basenpaare bei 276-280 nm. In Abhängigkeit von der Basensequenz der untersuchten Oligonukleotide liegt die für eine Messung optimale Wellenlänge zwischen diesen Werten. Aus diesem Grund werden UV-Schmelzkurven routinemäßig bei 260 nm und 274 nm zeitgleich aufgezeichnet.

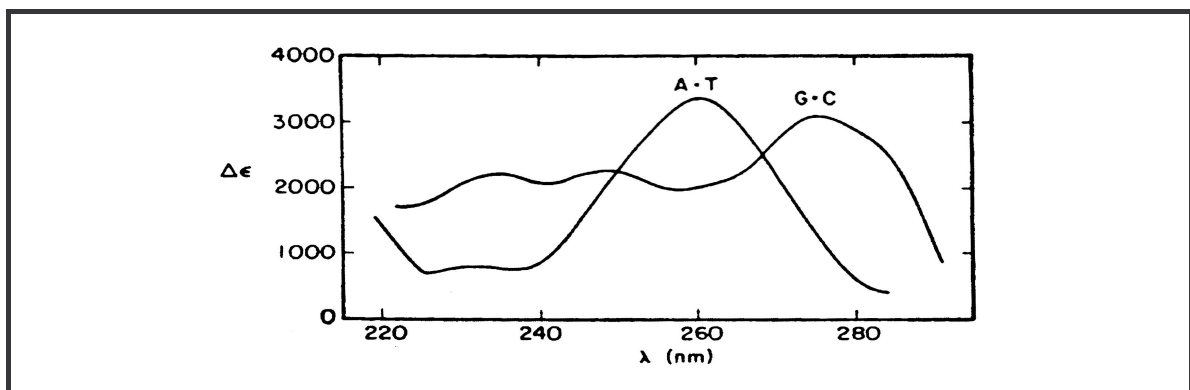


Abb. 8.17: Veränderung des Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon$ für das Schmelzen von GC- und AT-Basenpaaren in DNA als Funktion der Wellenlänge (Puglisi, 1989)

Welche Informationen können nach der Analyse einer temperaturabhängigen UV-Schmelzkurve bezüglich der untersuchten Antisense Oligonukleotide gewonnen werden? Die ermittelten Schmelzpunkte zeigen beispielsweise, ob ein bestimmtes Antisense Oligonukleotid in isotonischer Pufferlösung bei Körpertemperatur eines Säugers überhaupt einen stabilen Duplex bilden kann. Dies ist zwingende Voraussetzung für die Wirkung eines Antisense Oligonukleotids durch die physische Blockade einer Sequenz oder für die Aktivie-

zung der RNase H. Außerdem wird durch die Schmelzpunkte transparent, welchen Einfluß die eingeführten Phosphatrückgrat-Modifikationen auf die Stabilität der Duplices haben. Besonders interessante Effekte auf das Hybridisierungsverhalten können auch die endständigen 3'- und 5'-Modifikationen ausüben. Diese können zu einer Erniedrigung des führen, falls diese Biomoleküle die Bildung einer Doppelhelix beeinträchtigen. Auf der anderen Seite ist auch ein positiver Einfluß auf den Schmelzpunkt durch hydrophobe Wechselwirkungen des Steroidgerüsts denkbar. Allgemein gilt, je höher der Schmelzpunkt, desto stabiler ist die untersuchte Struktur.

Zur Untersuchung der Hybridisierungseigenschaften wurden deshalb vier Zielsequenzen synthetisiert. Die DNA- und RNA-Zielsequenzen hatten entweder die gleiche Anzahl an Nukleotiden wie die Antisense Oligonukleotide oder hatten am 3'- wie am 5'-Ende jeweils einen Überlapp von drei Nukleotiden, um eine Wechselwirkung des Cholesterols, der Gallensäuren oder des Fluoreszeins zu ermöglichen:

sense DNA 17: 5'- TCGTAGACCGTCCACCA -3' (17mer)

sense DNA 23: 5'- GTCTCGTAGACCGTGCACCATGA -3' (23mer)

sense RNA 17: 5'- UCGUAGACCGUGCACCA -3' (17mer)

sense RNA 23: 5'- GUCUCGUAGACCGUGCACCAUGA -3' (23mer)

Die Aufnahme der UV-Schmelzkurven erfolgte an einem Zweistrahl UV/VIS-Spektralphotometer Cary 1 der Firma Varian mit Peltier gesteuertem, thermostatisierbarem Küvettenhalter. Die Messungen wurden in Quarzküvetten in Phosphatpuffer (140 mM Natriumchlorid, 10 mM Phosphat, pH = 7,0) unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Die eingesetzte Konzentration betrug 2 µM pro Strang. Details zur Durchführung und Auswertung der UV-Schmelzexperimente finden sich in Kapitel 12.5.

Abbildung 8.18 zeigt die normierten UV-Schmelzkurven verschiedener Derivate des terminalen Phosphorothioats **tS-13** bei 260 nm. Als Target diente die 23mer DNA-Sequenz **sense DNA 23**, die an beiden Enden der komplementären 17mer Zielsequenz jeweils einen Überlapp von drei Nukleotiden besaß, um hydrophobe Wechselwirkungen der endständigen Gallensäuren oder des Fluoreszenzfarbstoffs untersuchen zu können. Für das Antisense Oligonukleotid **tS-13** wurde in Phosphatpuffer ein Schmelzpunkt von 64,6 °C gemessen. Die 5'-Verknüpfung mit den Gallensäuren führte jeweils zu einer leichten Erhöhung des T_m -Wertes: Für **tS-13Y** wurde ein Schmelzpunkt von 65,2 °C und für **tS-13Z** ein Schmelzpunkt von 66,2 °C gefunden. Das nicht in der Grafik gezeigte 5'-Cholesterol

Derivat **tS-13X** ergab mit 66,4 °C den höchsten T_m -Wert. Interessanterweise wurden diese Effekte gleichermaßen bei der Hybridisierung der Antisense Oligonukleotide mit komplementären 17meren, die keinen Überlapp an ihren Enden besaßen, beobachtet. Im Gegensatz hierzu führte die Kupplung des Fluoreszenzfarbstoffs am 3'-Ende zu einer leichten Depression des Schmelzpunkts von **tS-13F** auf 64,1 °C gegenüber dem von **tS-13**.

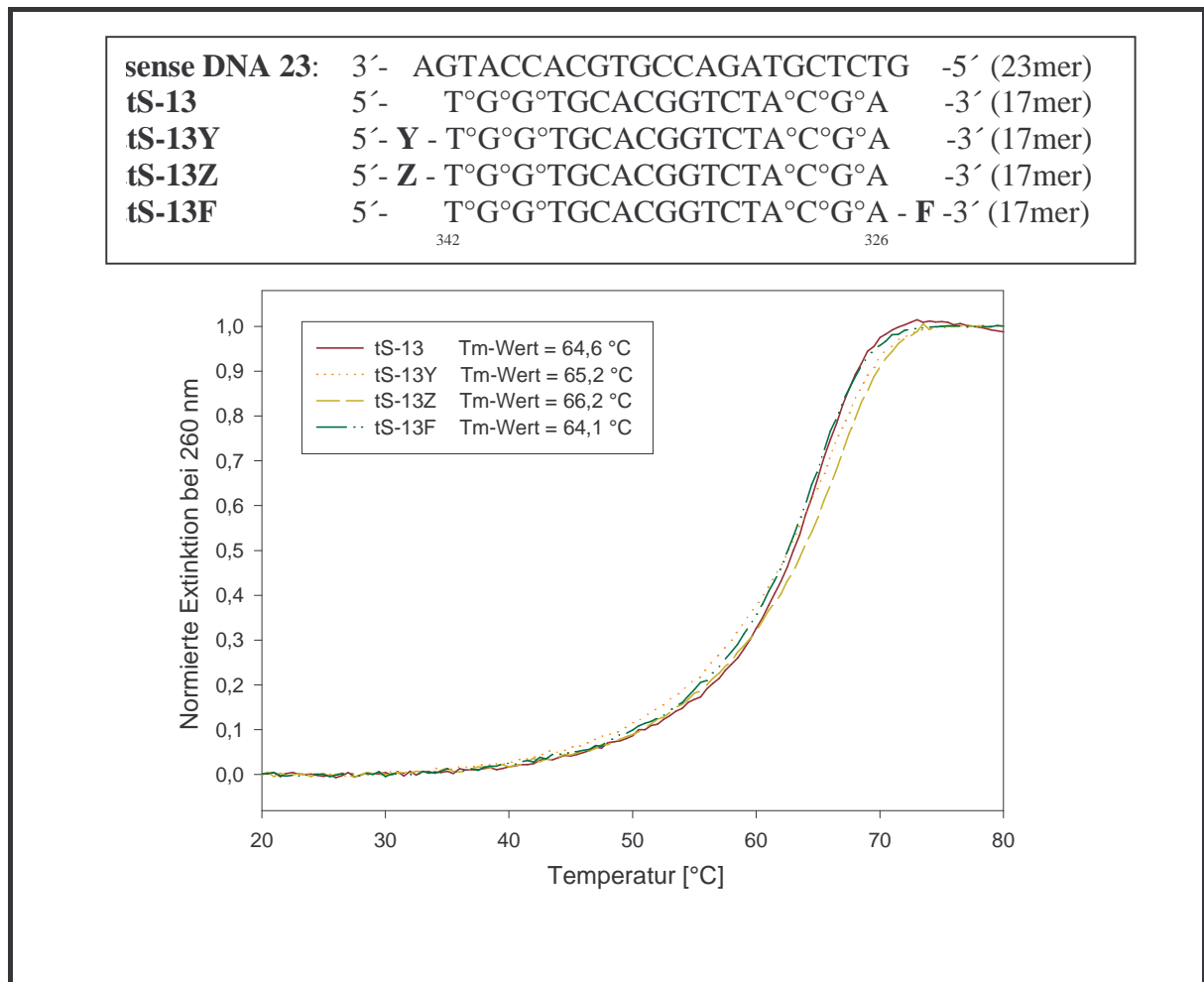


Abb. 8.18: Normierte UV-Schmelzkurven der Antisense Oligonukleotide **tS-13**, **tS-13Y**, **tS-13Z** und **tS-13F** hybridisiert mit einer um je drei Nukleotide überlappenden Zielsequenz

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit literaturbekannten Studien. Für 16mer Vollthioate, die an ihrem 5'-Ende mit Cholsäure allerdings nicht über dessen 3 α -Hydroxylgruppe, sondern über die Säurefunktion gekuppelt wurden, wurde durchschnittlich eine Erhöhung des T_m -Wertes von 1 °C beobachtet (Manoharan, 1994). Gleiches gilt für die Derivatisierung mit Cholesterol. Hier wurde ebenfalls eine leichte Erhöhung der Duplexstabilität gefunden (Letsinger, 1989; Reed, 1991). Stabilisierende Wechselwirkungen endständiger, lipophiler Alkylgruppen wurden ebenfalls beobachtet (Jager, 1988).

Der Austausch von sechs Phosphorothioaten gegen sechs Benzylphosphonate als Phosphatrückgrat Modifikationen führt hingegen zu einer leichten Verringerung der Duplexstabilität. Der Schmelzpunkt reduziert sich dabei um etwa 0,3 °C je ersetzter Phosphorothioateinheit. Vergleichbare Stabilitätseinbußen wurden beispielsweise bei den Phenylphosphonaten gefunden (Mag, 1997). Bei Hybridisierung der Antisense Oligonukleotide mit dem 17mer **sense DNA 17** vergrößert sich der Stabilitätsverlust je Benzylphosphonat. In Übereinstimmung mit den zuvor besprochenen, analogen Phosphorothioaten erfahren die 5'-Gallensäuremodifikationen wiederum eine Stabilisierung um etwa 1 °C. Dagegen sinkt der T_m -Wert nach Kupplung mit 5'-Cholesterol oder 3'-Fluoreszein überraschend stark um jeweils etwa 5 °C ab. Die erhebliche Stabilitätsabnahme von **tB-13F** kann gut aus der normierten Schmelzkurve in Abb. 8.19 ersehen werden.

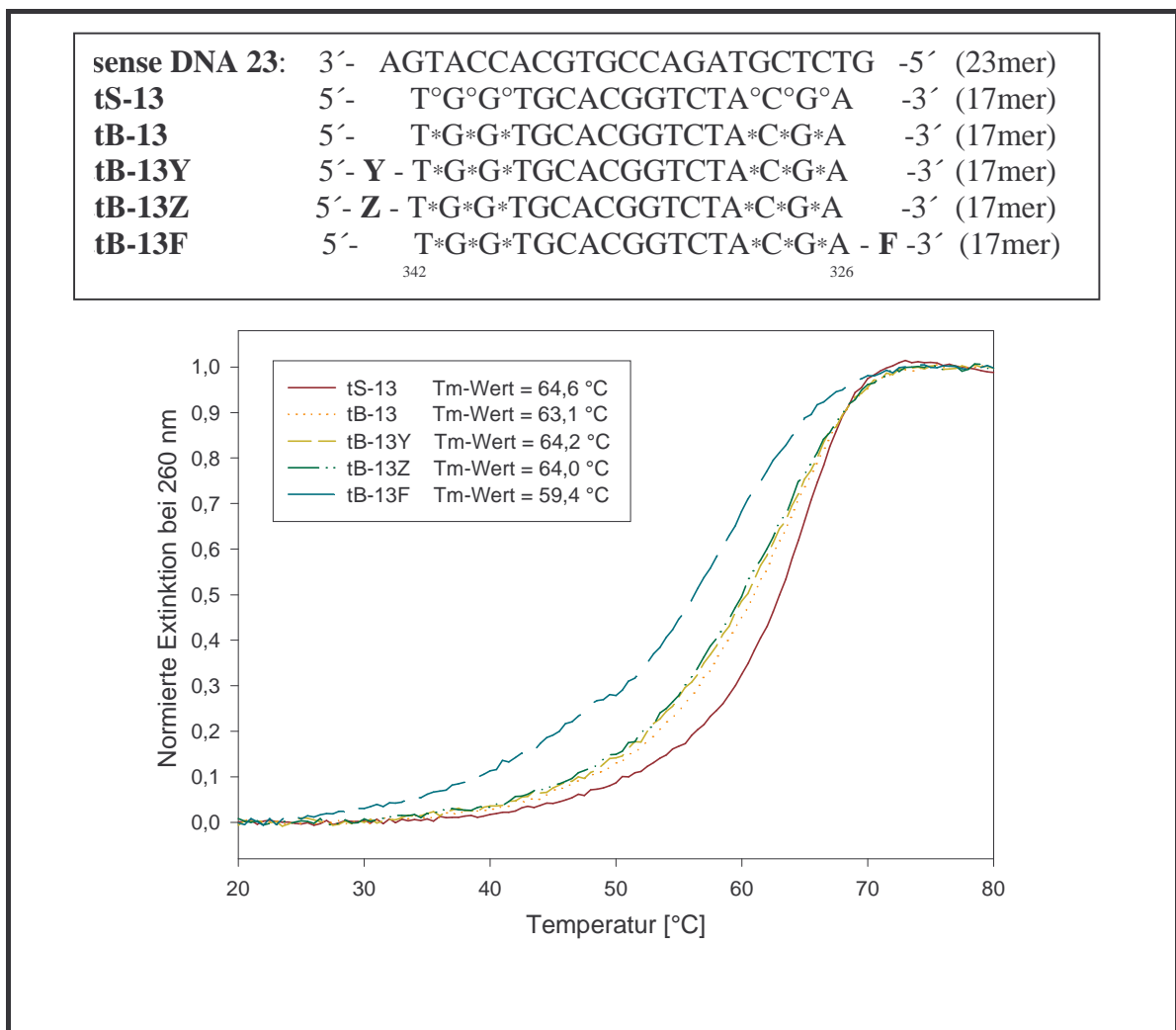


Abb. 8.19: Normierte UV-Schmelzkurven der Antisense Oligonukleotide **tS-13**, **tB-13**, **tB-13Y**, **tB-13Z** und **tB-13F** hybridisiert mit der um je drei Nukleotide überlappenden Zielsequenz **sense DNA 23**

Weitere Ergebnisse können Tabelle 8.4 entnommen werden. Die Schmelzexperimente mit RNA-Zielsequenzen ergaben zum Teil eine Erniedrigung der Heteroduplex Stabilität von bis zu 5 °C im Vergleich zu den analogen DNA Targets. Eine derartige Abnahme der Stabilität wurde bereits zuvor bei DNA/RNA-Heteroduplexen mit Benzylphosphonaten, Methylphosphonaten und zum Teil auch mit Phenylphosphonaten beschrieben (Eisenhardt, 1996; Samstag, 1996; Mag, 1997). Offenbar verursachen diese sperrigen Substituenten an den Internukleotidbindungen störende Wechselwirkungen innerhalb der A-DNA artigen Struktur der DNA/RNA-Heteroduplexen. Ihr Einfluß auf die Stabilität von B-DNA Doppelhelixstrukturen ist deutlich geringer.

Name	Derivate des Antisense Oligonukleotids tS-13	sense DNA 17 (sense RNA 17) T _m [°C]	sense DNA 23 (sense RNA 23) T _m [°C]
tS-13	T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	65,1 (65,1)	64,6 (63,7)
tB-13	T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	62,7 (n.g.)	63,1 (58,2)
tS-13X	X - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	65,3 (62,7)	66,4 (61,9)
tB-13X	X - T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	60,4 (n.g.)	62,7 (n.g.)
tS-13Y	Y - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	65,7 (n.g.)	65,2 (62,6)
tB-13Y	Y - T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	63,5 (n.g.)	64,2 (n.g.)
tS-13Z	Z - T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A	66,6 (64,9)	66,2 (61,6)
tB-13Z	Z - T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A	63,6 (n.g.)	64,0 (n.g.)
tS-13F	T°G°G°TGCACGGTCTA°C°G°A - F	65,2 (n.g.)	64,1 (64,3)
tB-13F	T*G*G*TGCACGGTCTA*C*G*A - F	59,5 (n.g.)	59,4 (n.g.)

Tab. 8.4: T_m-Werte der verschiedenen modifizierten Antisense Oligonukleotide hybridisiert mit DNA- und RNA-Zielsequenzen verschiedener Länge in Phosphatpuffer (140 mM NaCl, 10 mM Phosphat, pH = 7,0); n.g. = nicht gemessen

Zusammengefaßt zeigen die UV-Schmelzexperimente, daß die 5'-Kupplung der Gallensäuren Cholsäure und Taurocholsäure zu einer leichten Stabilisierung im Vergleich zu den Duplexen der 5'-unmodifizierten Oligonukleotide führt. Eine leichte Destabilisierung wird durch das Einführen der Benzylphosphonate induziert, die in DNA/RNA-Heteroduplexen stärker ausgeprägt ist. Die aus den UV-Schmelzkurven berechneten Schmelzpunkte der Antisense Oligonukleotide gegen HCV zeigen aber, daß alle Derivate der durch experimentelles Screening erhaltenen Sequenz **tS-13** eine ausreichende Stabilität für eine Antisense Anwendung am Tiermodell oder am Menschen aufweisen.

8.3.2 Ergebnisse der HCV-Inhibierung mit Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten

Wie in den Abschnitten zuvor gezeigt, besitzen die Gallensäure modifizierten Antisense Oligonukleotide Eigenschaften wie eine erhöhte Lipophilie oder eine ausreichende Duplexstabilität, die sie für einen Antisense Ansatz attraktiv machen. Ein hoher Schmelzpunkt allein macht aber noch keinen effizienten Wirkstoff aus. Zu komplex ist der auf den ersten Blick einfach erscheinende Wirkmechanismus der Antisense Oligonukleotide. Einige dieser komplexen Fragestellungen sollen durch die Verwendung Gallensäure verknüpfter Oligonukleotide transparenter gemacht werden. Wird durch Gallensäure Oligonukleotid Konjugate ein leberselektives Drug Targeting ermöglicht? Oder werden diese potentiellen Therapeutika durch Gallensäure spezifische Carriersysteme der Leberzellen besser internalisiert? Die Durchführung dieser Experimente erfolgt in den Laboratorien von Prof. W.H. Caselmann an der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität in Bonn. Die entsprechenden Untersuchungen an verschiedenen Leberzelllinien oder auch Versuchstieren sind jedoch noch nicht abgeschlossen, so daß diese Resultate im Rahmen dieser Arbeit nicht diskutiert werden können. Im folgenden wird das *in vitro* Inhibitionspotential der Derivate von **tS-13** besprochen. Außerdem wird ein erstes Ergebnis aus einem Zellaufnahmeexperiment vorgestellt.

8.3.2.1 Ergebnisse der *in vitro* Translations-Assays

Um den Nachweis zu erbringen, daß die Gallensäure gekuppelten Antisense Oligonukleotide im zellfreien Medium die Genexpression effizient inhibieren, wurden *in vitro* Transkriptions/Translations Assays mit dem Plasmid pT7NCRluc wie in Kapitel 8.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde für die Gallensäure gelabelten Phosphorothioate **tS-13Y** und **tS-13Z** eine schlechtere Inhibierung der Genexpression gefunden als für **tS-13**. Erfreulicherweise zeigte das Taurocholsäure Konjugat **tS-13Z** eine dosisabhängige Inhibierung, die ihr Maximum bei einer Konzentration von 5 µM mit 94 % aufweist und damit ähnlich effizient wirkt wie **tS-13**. Bei niedrigeren Konzentrationen wurde allerdings eine bis zu 13 % höhere Luciferase Aktivität für **tS-13Z** gemessen. Die Inhibierung der HCV-Genexpression durch das Cholsäure Konjugat **tS-13Y** erreicht ihr Maximum von etwa 80 % bei Konzentrationen zwischen 1 µM und 5 µM und weist damit ein zu **tS-13** und **tS-13Z** weiter sinkendes Inhibitionspotential *in vitro* auf. Die Diskussion dieser Kurve wird allerdings durch ihren zickzackförmigen Verlauf bei niedrigen Konzentrationen erschwert. Das

Cholesterol gekuppelte Oligonukleotid **tS-13X** zeigt den flachsten, dosisabhängigen Kurverlauf. Der IC_{50} -Wert für diese Substanz liegt bei 840 nM und das Inhibitionsmaximum wird mit 84 % bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 5 μ M gefunden. Bereinigt man die Inhibitionskurve von **tS-13Y** um den Ausreißer bei 0,5 μ M, so findet man für die Gallensäure gekoppelten Oligonukleotide **tS-13Y** und **tS-13Z** IC_{50} -Werte von etwa 200 nM und für **tS-13** von 80 nM. Wie aus Abbildung 8.20 hervorgeht, zeigen alle Antisense Oligonukleotide im Vergleich zur eingesetzten Mismatch Kontrolle **tS-13K** eine spezifische, dosisabhängige Inhibierung der HCV-Genexpression.

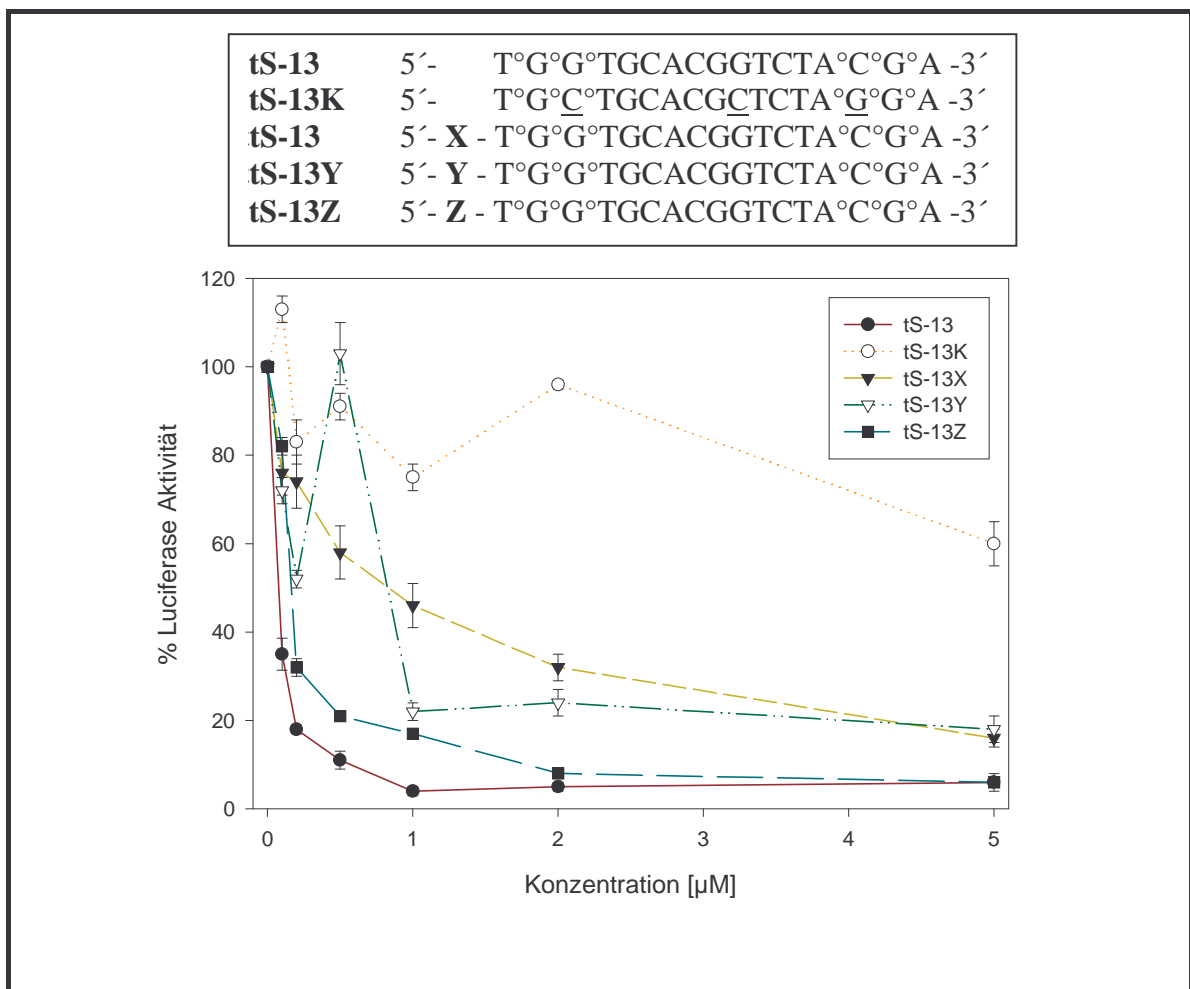


Abb. 8.20: Graphische Darstellung der Inhibierung der HCV-Genexpression durch 5'-modifizierte Derivate von Antisense Oligonukleotid **tS-13**

Die Inhibitionskurven einiger terminaler Benzylphosphonate sind in Abbildung 8.21 dargestellt. Aufgrund ihres durchweg ungleichmäßigen Verlaufs ist eine Interpretation schwierig. Es zeigt sich, daß die Antisense Oligonukleotide bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 5 μ M ihr Inhibitionsmaximum aufweisen. Für **tB-13** beträgt es 83 %, für **tB-13A** 78 %, für **tB-13B** 75 %, für **tB-13C** 70 %, für **tB-13D** 65 %, für **tB-13E** 60 %, für **tB-13F** 55 %, für **tB-13G** 50 %, für **tB-13H** 45 %, für **tB-13I** 40 %, für **tB-13J** 35 %, für **tB-13K** 30 %, für **tB-13L** 25 %, für **tB-13M** 20 %, für **tB-13N** 15 %, für **tB-13O** 10 %, für **tB-13P** 5 %, für **tB-13Q** 0 %.

für **tB-13Y** 90 % und für **tB-13F** 72 %. Die bei der Aufnahme der UV-Schmelzkurven gefundene Erniedrigung der Duplexstabilitäten bei Benzylphosphonaten korreliert mit einer insgesamt schwächeren Inhibierung der HCV-Genexpression gegenüber den analogen Phosphorothioaten. Trotz des ungleichmäßigen Kurvenverlaufs wird auch bei den Benzylphosphonaten eine spezifische und zum Teil dosisabhängige Inhibierung beobachtet.

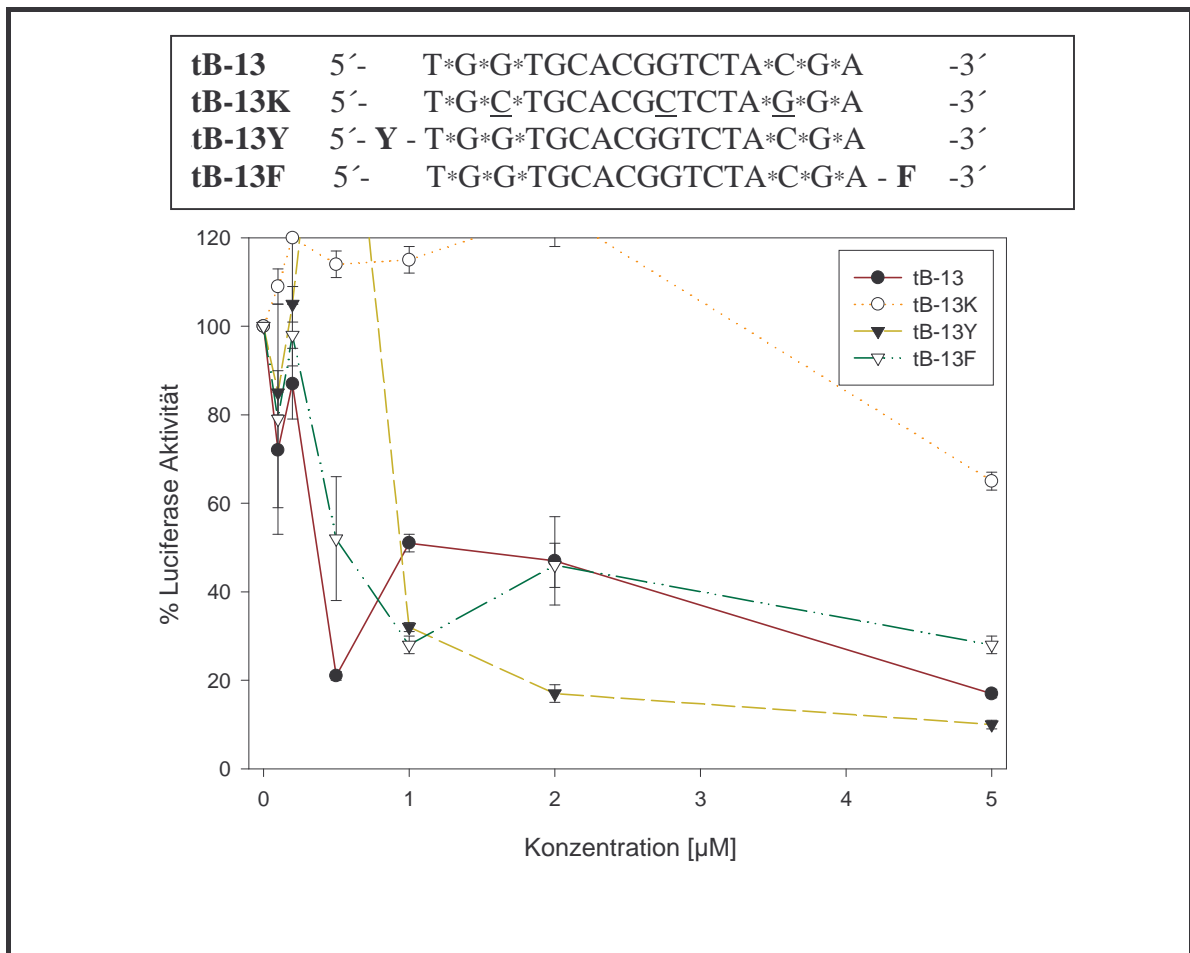


Abb. 8.21: Graphische Darstellung der Inhibierung der HCV-Genexpression durch 5'-modifizierte Derivate von Antisense Oligonukleotid **tB-13**

8.3.2.2 Ergebnisse des Zellkultur Translations-Assays

Zur Untersuchung des Inhibitionspotentials in Zellkultur wurde eine Leberzelllinie eingesetzt, die neben dem stabil transfizierten Plasmid pCMVNCRLuc das Natrium-abhängige Taurocholat cotransportierende Polypeptid (NTCP) und das organische Anionen transportierende Polypeptid (OATP) überexprimiert (siehe Kapitel 3.5.3). Gallensäure gelabelte Oligonukleotide könnten im günstigsten Fall bevorzugt über das NTCP durch die Plasmamembran transportiert werden. Das OATP hingegen ist weitaus weniger substratspezifisch.

Der Zellkultur Translations-Assay wurde wie in Kapitel 8.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Auf die Gabe von Lipofektin wurde verzichtet, um den Einfluß der Transportproteine auf die Zellaufnahme und damit in Konsequenz auf die Inhibierung zu untersuchen. Entsprechende Experimente mit Fluoreszeिन markierten Oligonukleotiden ergeben die internalisierte Menge direkt, sind bislang aber noch nicht durchgeführt worden.

Das Balkendiagramm zeigt einen zeitabhängigen Zellkultur Translations-Assay. Die Luciferase Aktivitäten der 100 % Kontrolle, der kein Wirkstoff zugesetzt wurde, und der Antisense Oligonukleotide **tS-13**, **tS-13Y** und **tS-13Z** wurden jeweils nach 40 und 60 Minuten bestimmt. Für die 5'-Gallensäure modifizierten Sequenzen **tS-13Y** und **tS-13Z** konnte eine deutlich stärkere Inhibierung der Genexpression gefunden als für **tS-13**. Dieser Effekt kann auf einer erhöhten zellulären Aufnahme von **tS-13Y** und **tS-13Z** beruhen.

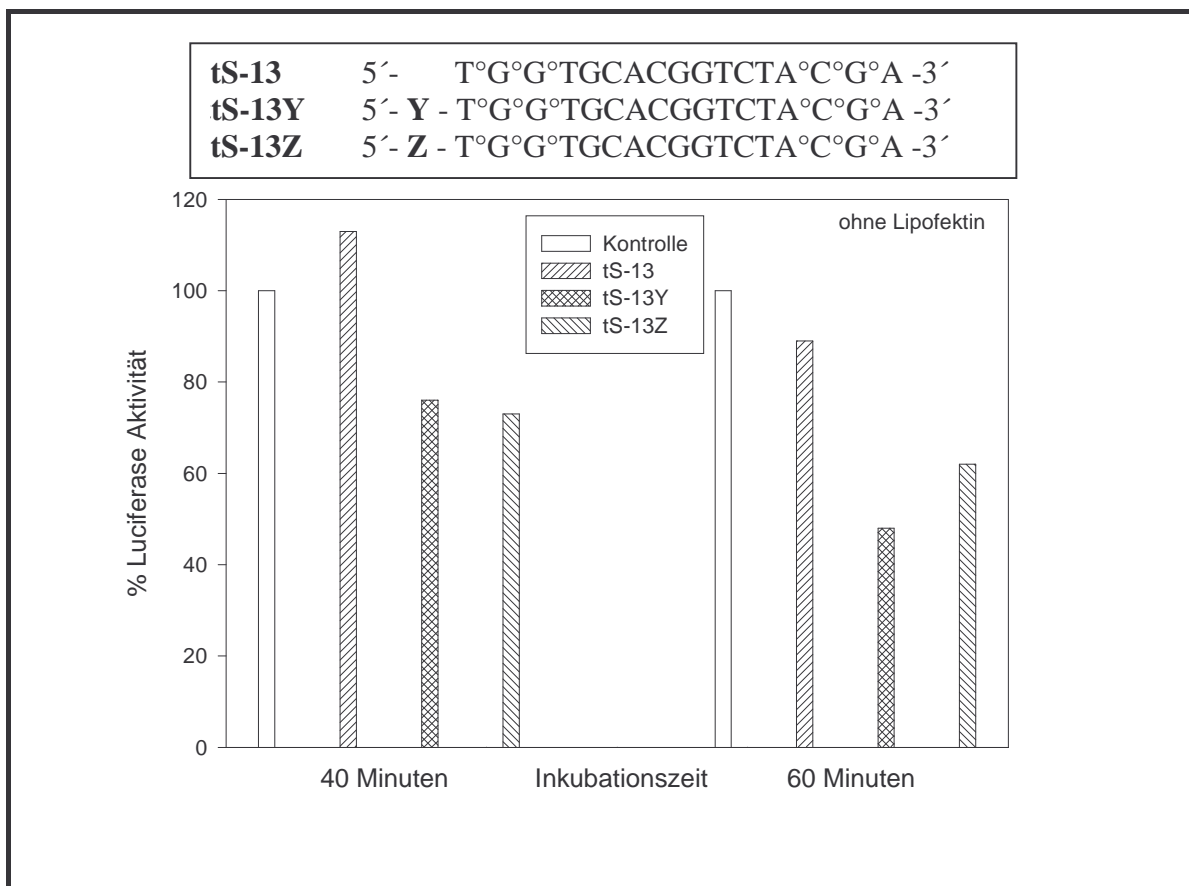


Abb. 8.22: Balkendiagramm zur Untersuchung der Zellaufnahme gemessen am Grad der Inhibierung der HCV-Genexpression durch 5'-modifizierte Antisense Oligonukleotide

Das Ergebnis dieses ersten Experiments zur Zellaufnahme darf jedoch nicht überinterpretiert werden, da es sich lediglich um eine bislang nicht reproduzierte Einzelmessung handelt. Aussagefähige Ergebnisse zur Zellaufnahme können erst die entsprechenden Fluores-

zein gelabelten Oligonukleotide liefern. Durch den Vergleich zweier Zelllinien, die einerseits die relevanten Transportproteine überexprimieren können und andererseits nicht, sollte nach Messung der Fluoreszenz der Nachweis eines Carrier vermittelten Transports möglich sein. Die Untersuchung des leberselektiven Drug Targetings von Gallensäure gekoppelten Oligonukleotiden wird an einer transgenen Maus nach intravenöser Applikation erfolgen.

9. Benzylphosphonate

Benzylphosphonate können als Derivate der Methylphosphonate gesehen werden, bei denen ein Proton der Methylgruppe durch einen Phenylrest substituiert wurde. Wie bei den Phosphorothioaten und Methylphosphonaten führt der Austausch eines nicht verbrückenden Sauerstoffatoms der Internukleotidbindung durch eine Benzylgruppe zur Diastereoisomerie am betreffenden Phosphoratom. Ein Oligonukleotid mit n Benzylphosphonaten ergibt also 2^n Diastereomere. Benzylphosphonate wurden erstmals in unserer Arbeitsgruppe von Wendelin Samstag synthetisiert (Samstag, 1992; Samstag, 1994; Samstag, 1996). Derart modifizierte Oligonukleotide zeichnen sich durch eine erhöhte Lipophilie gegenüber Phosphorothioaten und Methylphosphonaten aus und bilden mit komplementären Zielsequenzen stabile Doppelhelices (Samstag, 1996; siehe auch Kapitel 8.3.1.1 und 8.3.1.3 dieser Arbeit). Darüber hinaus wurde für Antisense Oligonukleotide mit Benzylphosphonatbindungen eine antivirale Wirkung sowohl gegen das „Duck“ Hepatitis B Virus (Samstag, 1996) als auch gegen das Hepatitis C Virus (Eisenhardt, 1996; Caselmann, 1997; Alt, 1999) gefunden. In den folgenden Abschnitten wird neben der Synthese der Benzylphosphonate auf Untersuchungen zur absoluten Konfiguration dieser chiralen Verbindungsklasse eingegangen sowie das Hybridisierungsverhalten der Benzylphosphonate am Beispiel einer HCV-Hairpinstruktur diskutiert.

9.1 Synthese der Benzylphosphonate

Die Synthese der Benzylphosphonate erfolgte in mehreren Stufen. Zunächst wurde ein reaktives, dreiwertiges Phosphitylierungsreagenz dargestellt. Dieses reagierte anschließend mit entsprechend geschützten Nukleosiden aller vier Nucleobasen zu kupplungsfähigen Phosphoramiditen. Die Phosphoramidite können zur Dimersynthese in Lösung oder zur Oligonukleotidsynthese an der festen Phase eingesetzt werden.

Zur Herstellung des Phosphitylierungsreagenzes (Benzyl-chloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **48a/b** wurde zunächst Benzylchlorid **44** einer Grignard-Reaktion unterworfen. Hierzu wurden Magnesiumspäne in trockenem Diethylether mit einem geringen Überschuß an Benzylchlorid **44** unter Rückfluß zu Benzylmagnesiumchlorid umgesetzt. Die Grignardlösung wurde direkt einer Ummetallierung zugeführt. Die weniger reaktive Benzylzinkchloridlösung **45** wurde durch Zutropfen einer 1 M etherischen Zinkchloridlö-

sung zu der Benzylmagnesiumchloridlösung bei 0 °C innerhalb von zwei Stunden erhalten. Die als Suspension vorliegende Benzylzinkchloridlösung **45** wurde in einen Tropftrichter überführt und zu einem Überschuß an siedendem Phosphortrichlorid **46**, gelöst in trockenem Diethylether, innerhalb von 75 Minuten zugetropft. Der hohe Überschuß an Phosphortrichlorid **46** wurde verwendet, um eine Mehrfachsubstitution zu unterdrücken. Nach weiteren 90 Minuten unter Rückfluß wurden alle festen Reaktionsprodukte rasch über einen Büchner-Trichter abgetrennt. Das Lösungsmittel und das überschüssige Phosphortrichlorid **46** wurden bei Normaldruck abdestilliert. Die Aufreinigung des sehr empfindlichen Zwischenprodukts (Benzyl-dichloro)-phosphin **47** erfolgte durch fraktionierte Vakuumdestillation. Die Ausbeute über alle Schritte dieser dreistufigen Reaktionsfolge betrug 41 %. Die Charakterisierung des resultierenden Öls erfolgte durch ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie.

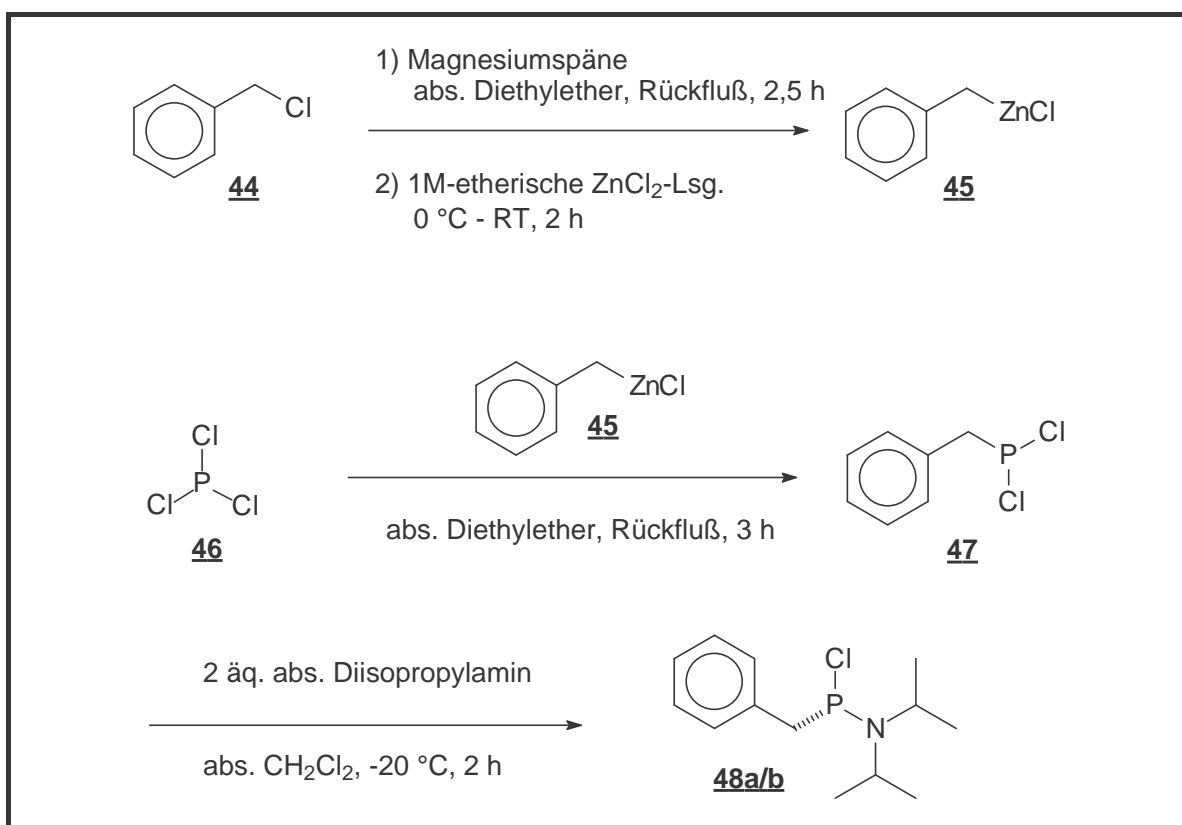


Abb. 9.1: Synthese des Phosphitylierungsreagenzes (Benzyl-chloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **48a/b**

Im nächsten Reaktionsschritt wurde (Benzyl-dichloro)-phosphin **47** in trockenem Dichlormethan gelöst und tropfenweise bei -20 °C mit zwei Äquivalenten *N,N*-Diisopropylamin versetzt. Ein Äquivalent der Base reagiert dabei zu dem gewünschten Phosphitylierungsreagenz (Benzyl-chloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **48a/b**, während das zweite

Äquivalent dem Abfangen der freigesetzten Säure dient und als Diisopropylammonium-Hydrochlorid ausfällt. Nach Abdestillieren des Dichlormethans bei Normaldruck wurde das Produkt **48a/b** nach fraktionierter Destillation im Hochvakuum zu 41 % erhalten. Die Charakterisierung des bei RT erstarrenden Öls gelang wiederum durch ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie (Samstag, 1992; Samstag, 1994).

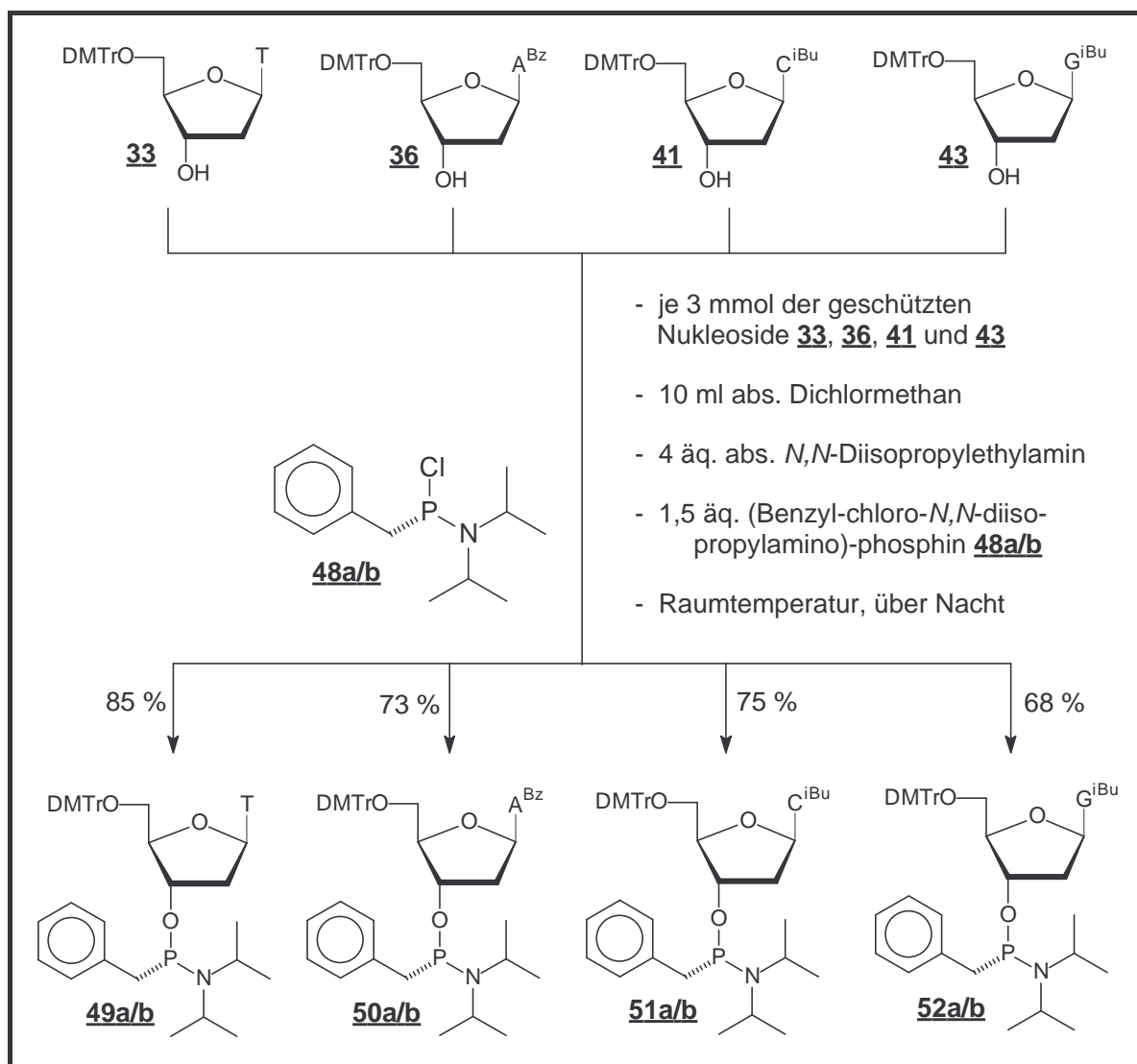


Abb. 9.2: Synthese der Benzylphosphoramidite **49a/b**, **50a/b**, **51a/b** und **52a/b**

Die Synthese kupplungsfähiger Benzylphosphoramidite ist in Abb. 9.2 schematisch dargestellt. Zur Darstellung der Phosphoramidite wurden die Nucleoside **33**, **36**, **41** und **43** verwendet. Sie sind alle an ihren 5'-Hydroxylgruppen mit der Dimethoxytritylschutzgruppe versehen. Die Funktionalitäten der Nucleobasen liegen ebenfalls geschützt vor. Besondere Beachtung gilt dem Desoxycytidin-Baustein **41**. Dieses häufig mit der Benzoylschutzgruppe versehene Molekül wurde hier aus gutem Grund mit der Isobutyrylgruppe geschützt.

Beim Entschützen basenlabiler Methyl- oder Benzylphosphonate mit Ethylendiamin (Hogrefe, 1993) wurde häufig eine Transaminierungsreaktion der Benzoyl-geschützten Aminofunktion von Desoxycytidin-Bausteinen beobachtet. Durch Ersatz von Benzoyl nach Isobutyryl oder Acetyl kann diese Nebenreaktion vermieden werden (Reddy, 1996). Auf die literaturbekannten Synthesen der geschützten Nucleoside wird hier nicht näher eingegangen. Die Synthesevorschriften können in Kapitel 12.2.2 nachvollzogen werden.

Zur Synthese der Benzylphosphoramidite wurden jeweils 3 mmol der gut getrockneten Nucleosidbausteine in trockenem Dichlormethan gelöst. Nacheinander wurden 4 Äquivalente Diisopropylethylamin und 1,5 Äquivalente des zuvor hergestellten Phosphitylierungsreagenzes (Benzyl-chloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **48a/b** zugetropft und das Reaktionsgemisch für 18 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Methanol abgebrochen und aufgearbeitet. Die Aufreinigung der Phosphoramidite erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel mit basischen Essigester/*n*-Hexan/TEA Gemischen (Samstag, 1994). Unter diesen Bedingungen wäre eine Trennung der diastereomeren Phosphoramidite **50a/b** und **51a/b** möglich gewesen. Die Ausbeuten der Phosphoramiditsynthesen lagen zwischen 68 % und 85 %. Eine ausführliche Charakterisierung der vier Bausteine erfolgte durch ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektroskopie sowie durch ESI-Massenspektrometrie. Die so erhaltenen Phosphoramidite wurden bei der Oligonucleotid-Festphasensynthese und der Dimersynthese in Lösung mit Erfolg eingesetzt.

Die Aktivierung der Phosphoramidite bei der Dimersynthese erfolgte nicht wie üblich mit hygroskopischem 1*H*-Tetrazol, sondern mit Benzimidazoliumtriflat **53** (Hayakawa, 1996). Dieses Salz löst sich wie 1*H*-Tetrazol hervorragend in Acetonitril, ist aber nicht feuchtigkeitsempfindlich und bei RT lagerfähig. Benzimidazoliumtriflat **53** ist ein extrem reaktiver Aktivator, der eine Dimerkupplung in Minuten ermöglicht. Außerdem ist er leicht durch Reaktion von Benzimidazol mit Trifluormethansulfonsäure synthetisch zugänglich. Die Säure wurde in Dichlormethan vorgelegt und das ebenfalls in Dichlormethan gelöste Benzimidazol langsam zugetropft. Der ausgefallene, feinkristalline Niederschlag wurde nach dem Abfiltrieren aus Essigester/Acetonitril = 4:1 umkristallisiert. Das in 82 %iger Ausbeute isolierte Salz **53** wurde durch ¹H-NMR-Spektroskopie, ESI-Massenspektrometrie und Elementaranalyse charakterisiert.

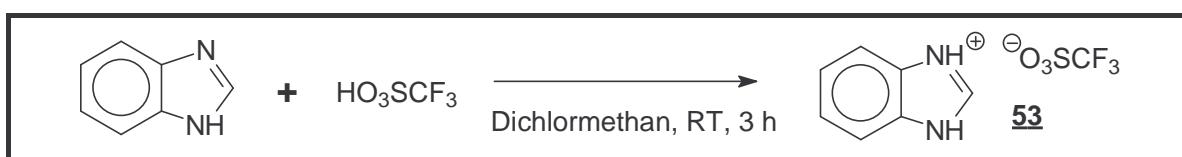


Abb. 9.3: Synthese des Aktivators Benzimidazoliumtriflat **53** (Hayakawa, 1996)

In dieser Arbeit wurden lediglich 2 der 16 theoretisch möglichen Dimere mit einer internukleotidischen Benzylphosphonatbindung dargestellt. Die Wahl fiel dabei auf die Sequenzen d(Tp_{Bn}T) **54a/b** und d(Cp_{Bn}G) **55a/b**, da die analogen Methylphosphonate d(Tp_{Me}T) **56a/b** und d(Cp_{Me}G) **57a/b** bereits intensiv untersucht wurden.

Zur Synthese der voll geschützten Dimere wurden jeweils 500 mmol der Benzylphosphoramidite **49a/b** oder **51a/b**, 1,5 Äquivalente des Aktivators Benzimidazoliumtriflat **53** sowie 0,9 Äquivalente der an ihrer 5'-Hydroxylgruppe ungeschützten Nucleoside **34** und **43** in einen Schlenckkolben eingewogen und getrocknet. Die Reaktion wurde unter Schutzgasatmosphäre durch Lösen der getrockneten Reaktionspartner in trockenem Acetonitril gestartet. Bereits nach 20 Minuten wurde mit TBHP oxidiert und aufgearbeitet (Hayakawa, 1996). Nach Aufnahme eines ³¹P-NMR-Spektrums des rohen Produkts wurde am Chromatotron aufgereinigt. Die Ausbeuten der Diastereomergemische betragen 90 % für d(Tp_{Bn}T) **54a/b** und 83 % für d(Cp_{Bn}G) **55a/b**. Die präparative Trennung der Diastereomerenpaare erfolgte mit Normalphasen-HPLC. Für **54a/b** wurde ein isokratischer Eluent aus n-Hexan/Isopropanol = 2:1 und für **55a/b** ebenfalls ein isokratischer Eluent aus Methylacetat/Dioxan = 10:1 verwendet. Die im ³¹P-NMR-Spektrum hochfeldigeren Isomere werden fortan als **54a** oder **55a** bezeichnet, die tieffeldigeren Isomere als **54b** und **55b**. Die Charakterisierung der diastereomerenreinen Dimere erfolgte mit Hilfe der ¹H- und ³¹P-NMR-Spektroskopie sowie durch ESI-Massenspektrometrie.

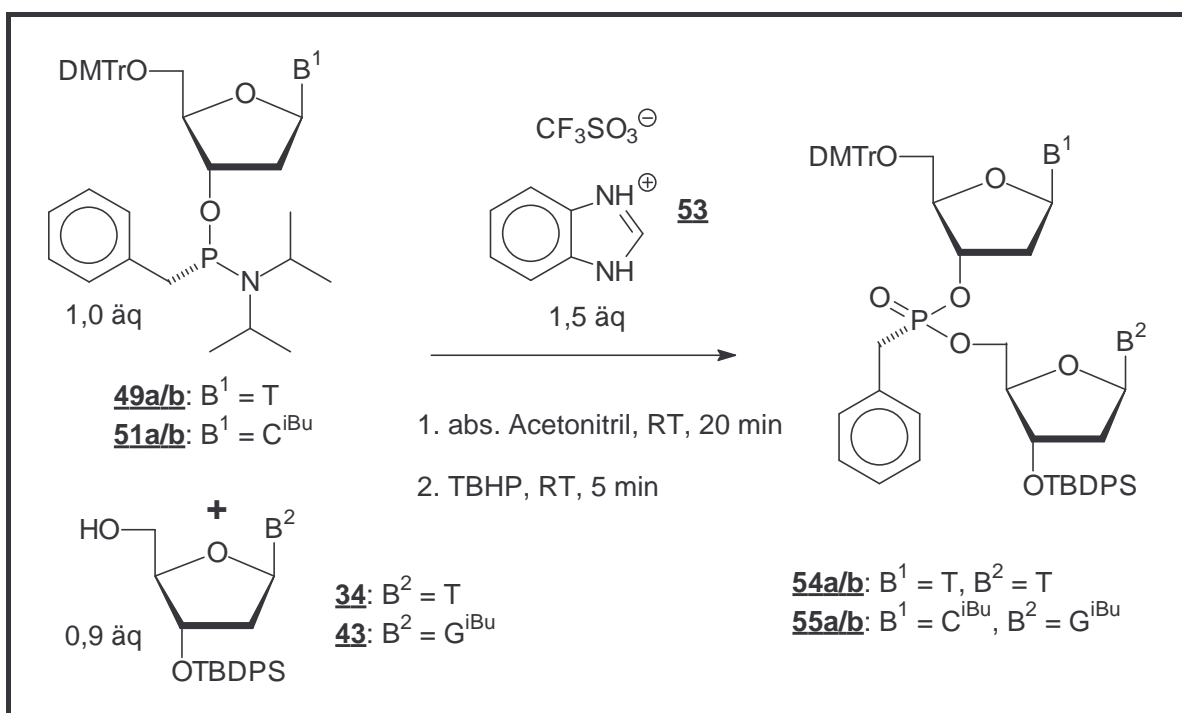


Abb. 9.4: Synthese der Benzylphosphonat-Dimere **54a/b** und **55a/b**

9.2 Eigenschaften der Benzylphosphonate

Einige wesentliche Eigenschaften der Benzylphosphonate wurden bereits in den vorherigen Kapiteln diskutiert. Es zeigte sich, daß der Austausch eines nichtverbrückenden Sauerstoffatoms am Phosphodiester durch eine Benzylgruppe zu einer Erhöhung des lipophilen Charakters eines Oligonukleotids beiträgt. Auch gegenüber anderen Phosphatrückgrat Modifikationen wie Phosphorothioaten oder ebenfalls ungeladenen Methylphosphonaten wird ein deutlicher Gewinn an Hydrophobizität erzielt. Diese Eigenschaft kann zu einer erhöhten Wechselwirkung mit der ebenfalls lipophilen Lipiddoppelschicht der Zellmembran führen und damit einen positiven Einfluß auf die Zellaufnahme bewirken. Ferner konnte bereits gezeigt werden, daß trotz der räumlich anspruchsvollen Benzylmodifikation stabile Duplices zu DNA- und RNA-Zielsequenzen gebildet werden, die eine Anwendung von Benzylphosphonaten in der Antisense Technologie ermöglichen.

In der Vergangenheit wurden die Eigenschaften und die Struktur der Methylphosphonate intensiv mit spektroskopischen Methoden untersucht. Aus diesem Grunde wurden völlig analoge Benzylphosphonate synthetisiert, die sich lediglich durch den Ersatz der Methyl- durch eine Benzylgruppe unterscheiden. Diese Benzylphosphonate wurden in Analogie zu den Methylphosphonaten NMR- und CD-spektroskopisch untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde das Hybridisierungsverhalten einer HCV-Hairpinstruktur analysiert, in deren Stamm sich räumlich anspruchsvolle Benzylphosphonat Einheiten direkt gegenüberlagern.

9.2.1 NMR-spektroskopische Studien isomerenreiner Benzylphosphonat Dimere

Die vollgeschützten, diastereomerenreinen Benzylphosphonat Dimere $d(\text{Tp}_{\text{Bn}}\text{T})$ **54a** und **54b** sowie $d(\text{Cp}_{\text{Bn}}\text{G})$ **55a** und **55b** wurden ausführlich mit Hilfe der NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die exakte Zuordnung der einzelnen Protonen gelang mit Hilfe von H,H-COSY Spektren. Die Zuordnung der Desoxyriboseprotonen zum entsprechenden 3'- oder 5'-Nukleosid gelang durch Aufnahme von 2D-NMR-ROESY Spektren. Dabei wurden entsprechende ROEs zwischen den *tert*-Butyl-Protonen der TBDPS Schutzgruppe und den α -ständigen Desoxyriboseprotonen des 3'-Nukleosids gefunden. Die chemischen Verschiebungen wichtiger Protonen der Benzylphosphonat Dimere $d(\text{Tp}_{\text{Bn}}\text{T})$ **54a** und **54b** sowie $d(\text{Cp}_{\text{Bn}}\text{G})$ **55a** und **55b** sind in Tabelle 9.1 wiedergegeben.

Protonen	d(Tp _{Bn} T) 54a	d(Tp _{Bn} T) 54b	Protonen	d(Cp _{Bn} G) 55a	d(Cp _{Bn} G) 55b
H-1' T5'	6.34	6.32	H-1' C5'	6.14	6.14
H-1' T3'	6.31	6.36	H-1' G3'	6.20	6.26
H-2' T5'	2.37	2.16	H-2' C5'	2.73	2.68
H-2'' T5'	2.26	2.16	H-2'' C5'	2.18	2.15
H-2' T3'	2.24	2.23	H-2' G3'	2.53	2.75
H-2'' T3'	1.66	1.61	H-2'' G3'	2.14	2.22
H-3' T5'	4.99	5.00	H-3' C5'	4.88	4.92
H-3' T3'	4.25	4.20	H-3' G3'	4.29	4.27
H-4' T5'	3.81	4.01	H-4' C5'	4.05	4.12
H-4' T3'	4.04	3.99	H-4' G3'	4.29	4.20
H-5' T5'	3.33	3.37	H-5' C5'	3.19	3.31
H-5'' T5'	2.98	3.27	H-5'' C5'	3.14	3.24
H-5' T3'	3.84	3.67	H-5' G3'	4.16	4.08
H-5'' T3'	3.54	3.58	H-5'' G3'	3.98	3.62
CH ₃ T5'	1.35	1.36			
CH ₃ T3'	1.85	1.85			
H6 T5'	7.47	7.43	H5 C5'	7.12	7.20
H6 T3'	7.29	7.07	H6 C5'	7.90	8.03
OCH ₃	3.77	3.78	OCH ₃	3.77	3.74
<i>tert</i> -Butyl	1.09	1.09	<i>tert</i> -Butyl	1.12	1.10
³¹ P-NMR	27.58	28.58	³¹ P-NMR	27.58	29.53
RP-HPLC	„slow“	„fast“	RP-HPLC	„slow“	„fast“
HPLC	„fast“	„slow“	HPLC	„slow“	„fast“

Tab. 9.1: Chemische Verschiebungen in ppm und Elutionsverhalten der diastereomerenreinen Benzylphosphonat Dimere **54a**, **54b**, **55a** und **55b**

Von besonderem Interesse ist die NMR-spektroskopische Untersuchung der Protonen der in diese Moleküle eingeführten Benzylgruppe. Aufgrund der großen Zahl weiterer, aromatischer Protonen sind die Protonen des Phenylrings stark überlagert. Die Methylengruppe von Isomer **54b** hingegen überlagert nicht mit anderen Protonen. Von Verbindung **54a** wurde ein Phosphor entkoppeltes ROESY-Spektrum aufgenommen, um eine Trennung von den sich tiefelfig anschließenden Signalen der H-5'' Protonen am 5'-Ende zu erreichen. Formal leitet sich die Benzylgruppe von der Methylgruppe durch den Ersatz eines Protons durch einen Phenylring ab. Die zuvor homotopen Protonen der Methylgruppe werden

durch diese Substitution zu diastereotopen Methylenprotonen. Für die geminale $^2J_{\text{H,H}}$ -Kopplung dieser Protonen wurden jeweils etwa 15 Hz gefunden. Die $^2J_{\text{P,H}}$ -Kopplung lag bei den vier untersuchten Isomeren jeweils bei etwa 21.5 Hz. Ausschnitte aus den Phosphor entkoppelten und Phosphor gekoppelten Protonenspektren der Verbindung **54b** sind in Abb. 9.5 gezeigt.

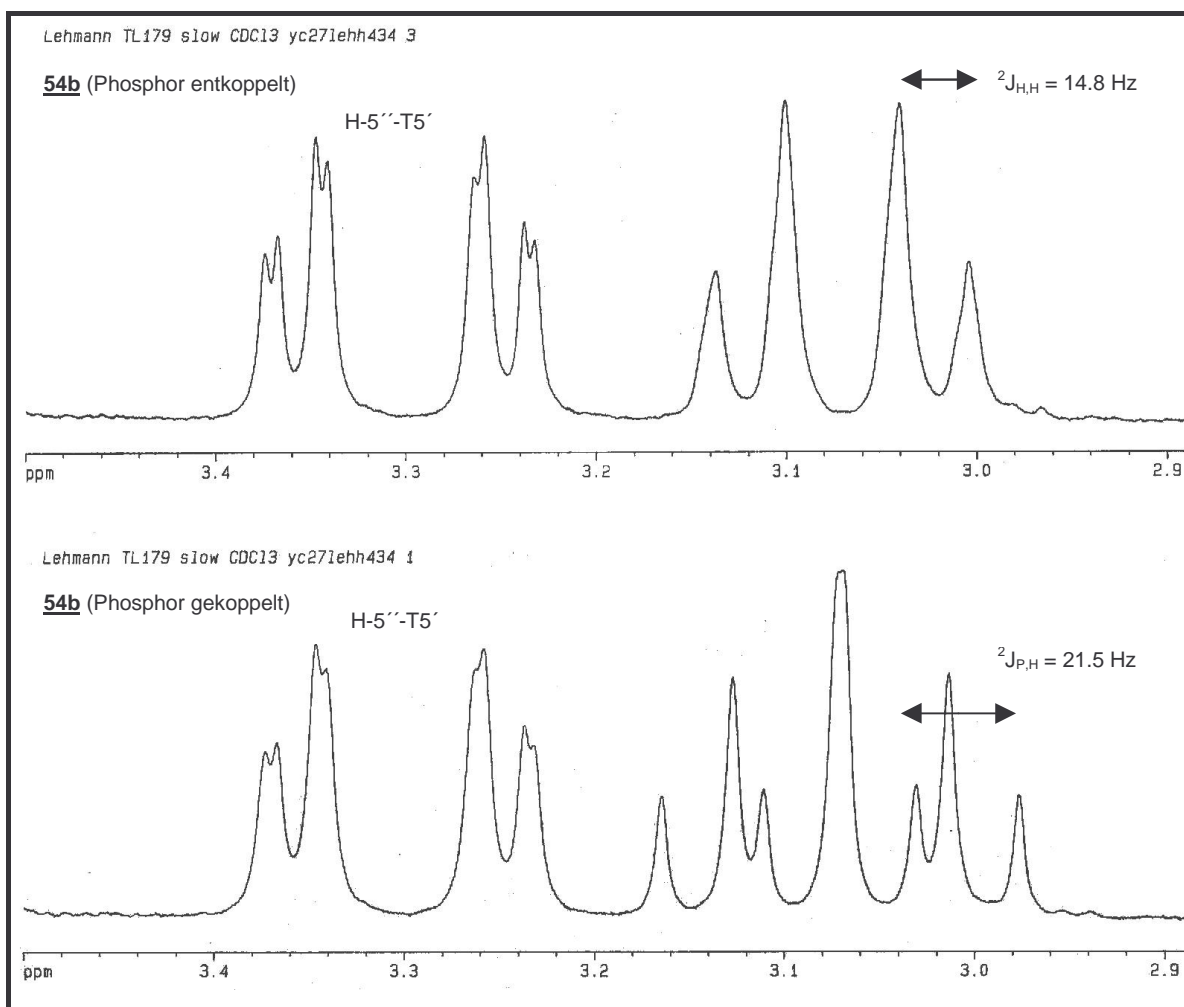


Abb. 9.5: Ausschnitt aus den Phosphor entkoppelten und Phosphor gekoppelten ^1H -NMR-Spektren des $d(\text{Tp}_{\text{Bn}}\text{T})$ Dimers **54b**

Für die analogen Methylphosphonate wurde die absolute Konfiguration am chiralen Phosphoratom für alle 16 Dimere zugeordnet (Löschner, 1990; Lebedev, 1993; Schell, 1998a; Schell, 1998b). Dabei wurden für die jeweiligen R_{p} ebenso wie für die S_{p} konfigurierten Isomere interessante Gemeinsamkeiten gefunden. Es zeigte sich beispielsweise, daß unabhängig von der stationären Phase einer chromatographischen Aufreinigungsmethode die schneller eluierenden Dimere stets die R_{p} -Konfiguration aufwiesen, während die langsamer eluierenden Dimere durchweg S_{p} konfiguriert waren. Mit Ausnahme des Dimers

d(Gp_{Me}A) besaßen alle Rp konfigurierten Oligonukleosid Methylphosphonat Dimere die hochfeldige chemische Verschiebung im ³¹P-NMR-Spektrum (Schweitzer, 1998).

Die Untersuchung zweier Oligonukleosid Benzylphosphonat Dimere zeigte jedoch schnell, daß diese Substanzklasse keine einfache Relation von HPLC-Elutionsverhalten und absoluter Konfiguration zuließ. Der Wechsel von einer Chromatographie an Kieselgel zu einer Umkehrphasen Chromatographie ging bei den Isomeren d(Tp_{Bn}T) **54a** und **54b** mit einem Wechsel des Elutionsverhaltens einher. Die Isomeren d(Cp_{Bn}G) **55a** und **55b** eluierten jetzt zwar wieder einheitlich unabhängig von der Wahl der stationären Phase. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den Methylphosphonaten eluierte das hochfeldige d(Cp_{Bn}G) Isomer **55a** aber stets langsamer als das tieffeldige Isomer **55b** (vgl. Tab. 9.1).

Der bei den isomerenreinen Oligonukleosid Methylphosphonat Dimeren gefundene Einfluß der absoluten Konfiguration auf die ³¹P-NMR chemischen Verschiebungen ist sicherlich kein Zufall. Die Regelmäßigkeit dieses Zusammenhangs kann jedoch nicht auf die Oligonukleosid Benzylphosphonate übertragen werden und nicht als allgemeiner Beweis für eine bestimmte absolute Konfiguration am chiralen Phosphor herangezogen werden. Auffällig ist jedoch, daß die Differenzen der ³¹P-NMR chemischen Verschiebungen bei den Methyl- und Benzyl-Isomerenpaaren identisch ist. Die Differenz für die T-T-Dimeren beträgt etwa je 1.0 ppm, während die Differenz für die C-G-Dimeren etwa doppelt so groß ist. Da aber nur zwei Diastereomerenpaare der Benzylphosphonate untersucht wurden, kann diese Beobachtung auf einer rein zufälligen Übereinstimmung beruhen.

	d(Tp _{Me} T) 56a	d(Tp _{Me} T) 56b		d(Cp _{Me} G) 57a	d(Cp _{Me} G) 57b
³¹ P-NMR	31.70	32.56	³¹ P-NMR	31.42	33.50
abs. Konf.	Rp	Sp	abs. Konf.	Rp	Sp
RP-HPLC	„fast“	„slow“	RP-HPLC	„fast“	„slow“
HPLC	„fast“	„slow“	HPLC	„fast“	„slow“

Tab. 9.2: Chemische Verschiebungen in ppm und Elutionsverhalten der diastereomerenreinen Methylphosphonat Dimere **56a**, **56b**, **57a** und **57b** (Schweitzer, 1998)

Bei den Methylphosphonaten gelang der Nachweis der absoluten Konfiguration der 32 isomerenreinen Dimere durch Auswertung ihrer 2D-NMR-ROESY Spektren (Löschner, 1990; Lebedev, 1993). In Abhängigkeit der absoluten Konfiguration am Phosphor konnten ROEs zwischen den homotopen Protonen der Methylgruppe und den Protonen der Desoxyriboseringe detektiert werden. Dabei wurden für die jeweils Rp konfigurierten Isomere

ROEs zwischen den homotopen Protonen der Methylgruppe und dem H-4'-T5' sowie H-3'-T5' gefunden. Bei den Sp konfigurierten Isomeren fehlt das H-4'-T5' Kreuzsignal, lediglich das H-3'-T5' Kreuzsignal wird beobachtet. Durch den Vergleich der ROESY Spektren der aufgetrennten Isomere gelang die Zuordnung der absoluten Konfiguration für alle 16 Diastereomerenpaare. Über eine Quantifizierung der Kreuzsignal Intensitäten konnten zusätzlich Abstände von Protonen bestimmt werden.

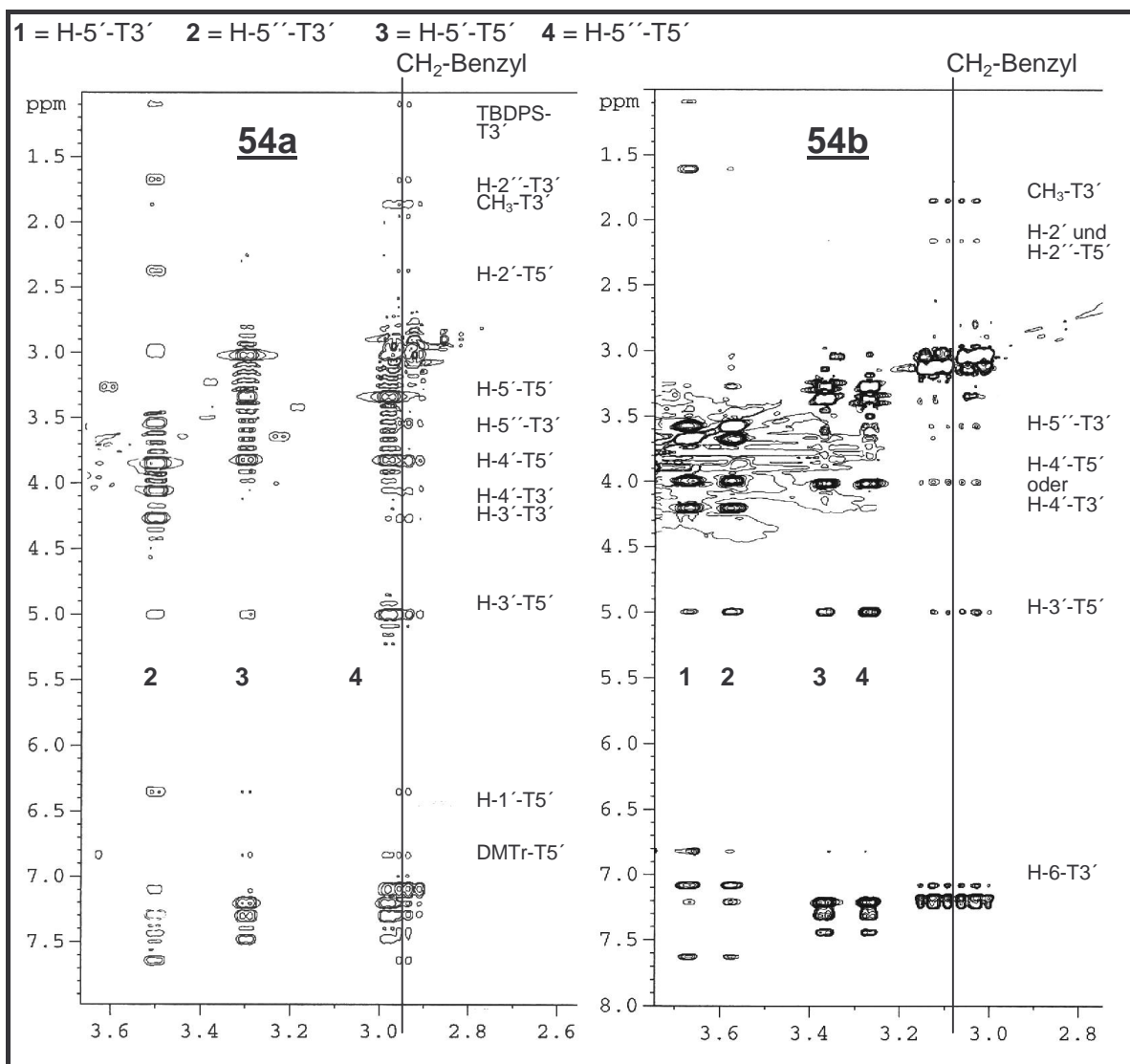


Abb. 9.6: Ausschnitte der 2D-ROESY-NMR Spektren der Dimere $d(Tp_{Bn}T)$ **54a** und **54b**. Das ROESY Spektrum von **54a** wurde Phosphor entkoppelt aufgenommen.

Eine Auswertung der ROESY Spektren der beiden voll geschützten Benzylphosphonat Dimere $d(Tp_{Bn}T)$ **54a** und **54b** führte zu keiner eindeutigen Zuordnung der absoluten Konfiguration der beiden Isomeren. Die diastereotopen Methylenprotonen der Benzylgruppe weisen voneinander leicht abweichende chemische Verschiebungen auf. Ihre Signale

überlagern nur geringfügig. Durch die freie Drehbarkeit der Benzylgruppe ist eine genaue Zuordnung dieser beiden Protonen sehr schwierig. Im ROESY Spektrum des Hochfeldisomers **54a** kann zwar ein sehr starker Kreuzpeak zu H-4'-T5' gefunden werden, der auf das Rp konfigurierte Isomer hindeutet. Leider überlagern im ROESY Spektrum des Tiefeldisomers **54b** die Kreuzsignale von H-4'-T5' und H-4'-T3', so daß nicht mit Sicherheit auf die absolute Konfiguration geschlossen werden kann (siehe hierzu auch Abb. 9.6). Auch die nach Quantifizierung der Kreuzsignale und Berechnung von Protonenabständen generierten Molekülmodelle führten zu keiner eindeutigen Zuordnung.

9.2.2 CD-spektroskopische Studien mit isomerenreinen d(CGCP_{Bn}GCG)-Hexameren

Modifizierte und unmodifizierte d(CGCGCG)-Hexamere haben sich als geeignete Modellverbindungen zur Untersuchung ihrer Duplexstabilitäten herausgestellt. Besonders interessant ist die Eigenschaft dieser selbstkomplementären CG-Copolymere, bei Wasserentzug oder hohen Salzkonzentrationen in eine Z-DNA-Konformation überzugehen (Gray, 1992; Johnston, 1992). 1986 haben Callahan und Mitarbeiter die Auswirkung von diastereomerenreinen Methylphosphonat Hexameren auf deren Stabilität und Konformation untersucht (Callahan, 1986). Dabei fanden sie sowohl für d(Cp_{Me}GCGCG) als auch für d(CGp_{Me}GCGCG), daß jeweils das Rp konfigurierte Methylphosphonat bei Hochsalzbedingungen nicht in eine Z-Form übergeht. Die beiden Sp-Isomere hingegen zeigten keine Unterschiede zum unmodifizierten d(CGCGCG)-Hexamer **58** und nahmen bei 4 M NaCl eine linksgängige Z-Helix ein.

Zusätzlich zu diesen beiden Hexameren wurde in unserer Arbeitsgruppe das d(CGCP_{Me}GCG)-Hexamer **59a/b** an fester Phase synthetisiert und die Diastereomeren chromatographisch getrennt (Schwarzer, 1997). Im Duplex befinden sich die Methylphosphonate an genau gegenüberliegenden Stellen, was einen besonders großen Einfluß auf die Duplexstabilität bewirken kann. Dem zuerst eluierenden Isomer **59a** wurde die Rp-Konfiguration zugeordnet (Lebedev, 1996). Die Methylphosphonat Hexamere **59a** und **59b** wurden eingehend CD-spektroskopisch untersucht. Bei 5 °C und einer „normalen“ Salzkonzentration des Phosphatpuffers von 140 mM Natriumchlorid wiesen alle Hexamere ein typisches B-DNA Spektrum mit einer positiven Bande bei 275 nm und einer ausgeprägten negativen Bande bei 254 nm auf. Zur Untersuchung des B→Z-Übergangs wurde die Salzkonzentration auf 4 M erhöht. Diese Bedingungen ermöglichen die Z-DNA Bildung, ohne

gleichzeitig stark denaturierend zu wirken. Unter Hochsalzbedingungen zeigte das Rp-Isomer **59a** keinen Übergang in die Z-Form. Dagegen gehen sowohl das unmodifizierte d(CGCGCG)-Hexamer **58** als auch das Sp-konfigurierte Hexamer **59b** in eine Z-Helix über, was an der Ausbildung der charakteristischen negativen Bande bei 295 nm und der gleichzeitigen Umkehr der negativen Bande bei 254 nm in eine positive Bande bei 265 nm zu erkennen ist. Die Intensität der Z-Bande von **59b** ist jedoch geringer als die des unmodifizierten Hexamers **58**, was auf eine andere Lage des B-Z-Gleichgewichts oder konformationelle Abweichungen innerhalb der Z-Form hindeutet (Schweitzer, 1998).

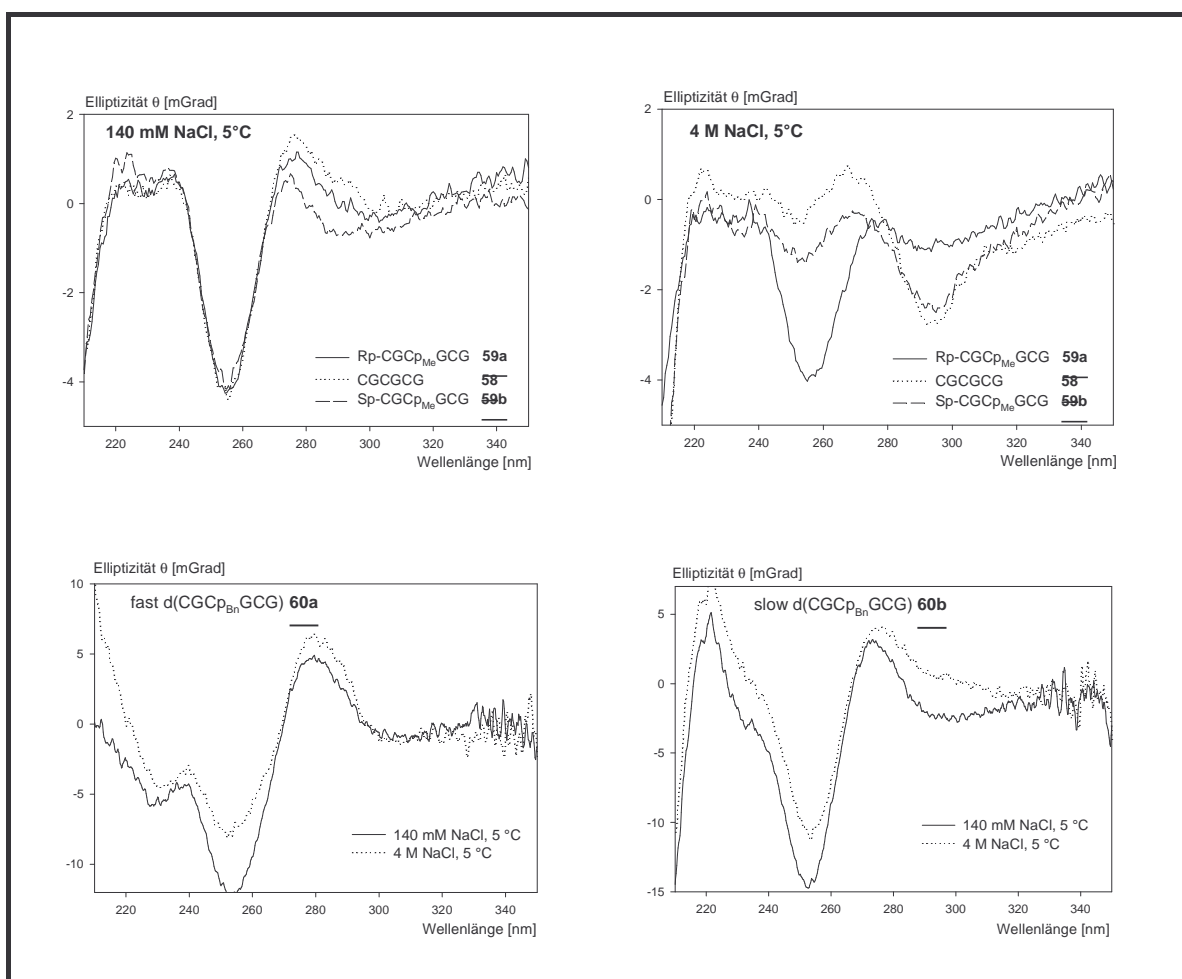


Abb. 9.7: CD-Spektren Methyl- und Benzyl-modifizierter d(CGCP_{Bn}GCG)-Hexamere bei 5 °C und einer Hexamerkonzentration von 10 μ M (Methyl, 4 M NaCl = 3 μ M)

Lassen sich bei den analogen Benzylphosphonaten fast-d(CGCP_{Bn}GCG) **60a** und slow-d(CGCP_{Bn}GCG) **60b** ähnliche Eigenschaften finden? Zu diesem Zweck wurde das Hexamer **60a/b** durch nicht stereokontrollierte Synthese an fester Phase synthetisiert und durch RP-HPLC in seine Diastereomeren aufgetrennt. Hierzu wurde das bereits detritylierte Hexamer an LiChrospher RP18 Material der Fa. Merck mit einem isokratischen Eluenten

von 13 % Acetonitril in 0,1 M TEAA chromatographiert (Kap. 7.3.4). Die beiden Diastereomeren **60a** und **60b** wurden unter gleichen Bedingungen wie zuvor die Methylphosphonate CD-spektroskopisch untersucht. Wie in Abbildung 9.7 gezeigt, ließ sich auch unter Hochsalzbedingungen keines der beiden Isomere in die Z-Form überführen, so daß auch mit dieser Methode kein Rückschluß auf die mögliche absolute Konfiguration eines der beiden Hexamere möglich war (Lehmann, 1999a).

Die Messung der Duplexstabilitäten der selbstkomplementären Hexamere führte zu einem überraschenden Ergebnis: Während für die Methylphosphonate eine Erniedrigung des Schmelzpunkts von 3,2 °C für **59a** und sogar von 7,7 °C für **59b** gefunden wurde, war bei gleicher Oligonukleotidkonzentration die Erniedrigung für das räumlich anspruchsvollere, analoge Benzylphosphonat **60a** mit nur 1,7 °C deutlich niedriger. Für **60b** wurde sogar eine Erhöhung des T_m -Werts gegenüber dem unmodifizierten CGCGCG-Hexamer von 0,8 °C gefunden. Während für die beiden schnell eluierenden Isomere **59a** und **60a** noch vergleichsweise ähnliche Schmelzpunkte gemessen wurden, ergab sich für die langsam eluierenden Isomere **59b** und **60b** eine enorme Differenz von 8,5 °C.

Oligonukleotid	T_m -Wert [°C]	ΔT_m [°C]	ΔH [kJ·mol ⁻¹]	ΔS [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]
5'-CGCGCG-3' 58	51,7		-207	-546
Rp-CGCP _{Me} GCG 59a	48,5	- 3,2	-231	-628
Sp-CGCP _{Me} GCG 59b	44,0	- 7,7	-233	-645
fast-CGCP _{Bn} GCG 60a	50,0	- 1,7	-209	-557
slow-CGCP _{Bn} GCG 60b	52,5	+ 0,8	-214	-566

Tab. 9.3: T_m -Werte und thermodynamische Parameter selbstkomplementärer CGCGCG-Hexamere bei einer Konzentration von 19 μ M in Phosphatpuffer

Eine mögliche Erklärung für dieses Resultat ist in Abbildung 9.8 gezeigt. Für den relativ hohen T_m -Wert des Benzylphosphonat Hexamers **60b** kann räumliche Abstoßung nicht die Ursache sein. Offensichtlich muß es eine zusätzliche attraktive Wechselwirkung zwischen der Benzylgruppe und dem Oligonukleotid geben. Abb. 9.8 zeigt einen Ausschnitt aus der Kristallstruktur des Dickerson Dodekamers d(CGCGAATTCGCG). Ohne eine erneute Minimierung der Struktur durchzuführen, wurde ein nicht verbrückendes Sauerstoffatom zwischen einer CG-Einheit derart durch eine Benzylgruppe substituiert, daß das Sp-konfigurierte Benzylphosphonat Sp-d(CGCP_{Bn}GAATTCGCG) resultierte. Die Struktur

zeigt, daß die Sp -konfigurierte Benzylgruppe in die Doppelhelix ragt und durch schwache π - π -Wechselwirkungen mit den Heterobasen im Gegensatz zur Methylgruppe zu einer Stabilisierung der Struktur beitragen kann. Dabei erscheint weder der Methylenlinker noch das aromatische π -System einer Benzylgruppe für eine derartige interkalatorische Wechselwirkung ideal. Es bleibt zu untersuchen, ob eine Verlängerung des Linkers und eine Optimierung des π -Systems zu einer weiteren Erhöhung der Stabilität führt. Eine Rp -konfigurierte Benzylgruppe in dieser Position ragt hingegen wie bei den Methylphosphonaten in die hydrophile Umgebung des Dodekamers und induziert destabilisierende Wechselwirkungen.

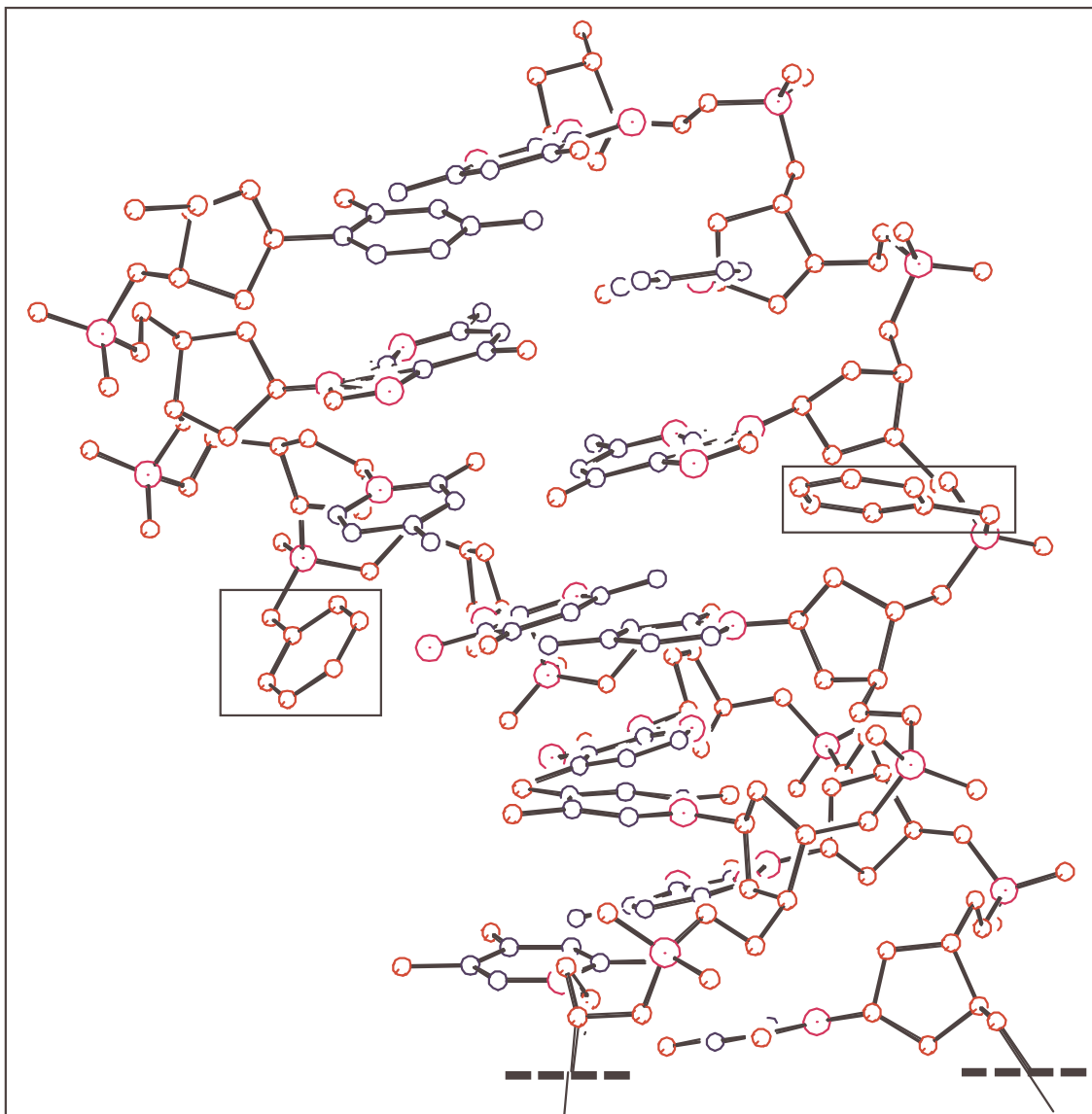


Abb. 9.8: Ausschnitt aus der B-DNA Kristallstruktur des Dickerson Dodekamers mit integrierten Sp -konfigurierten Benzylphosphonat Modifikationen (ohne Minimierung)

Die in Tabelle 9.3 angegebenen thermodynamischen Parameter der Duplex-Knäuel Übergänge lassen sich für die Hexamere aus der Konzentrationsabhängigkeit der gemessenen Schmelzpunkte bestimmen (Marky, 1987). Die Berechnung von Enthalpie und Entropie erfolgte nach der Geradengleichung [12-7]: $1 / T_m = (R / \Delta H) \cdot \ln c_t + (\Delta S / \Delta H)$. Die Durchführung der Schmelzpunktmessungen ist in Kapitel 12.5 ausführlich beschrieben. Die T_m -Werte der Hexamere wurden innerhalb eines Konzentrationsfensters von 335 μM bis 3 μM bestimmt. Die gewünschten Konzentrationen wurden durch Verdünnen der hochkonzentrierten Proben mit Phosphatpuffer eingestellt.

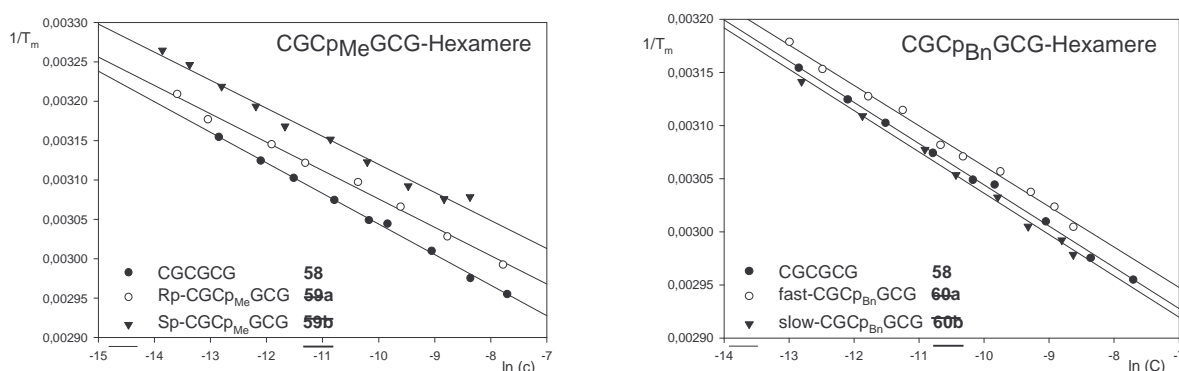


Abb. 9.9: Konzentrationsabhängigkeit der UV-photometrisch bestimmten Schmelzpunkte der selbstkomplementären Hexamere **58**, **59a**, **59b**, **60a** und **60b**

Aus den in Abb. 9.9 gezeigten Regressionsgraden wurden die thermodynamischen Parameter für Duplex-Knäuel Übergänge verschieden modifizierter, diastereomerenreiner CGCGCG-Hexamere erhalten (Tab. 9.3). Die Ergebnisse für die Methylphosphonate wurden freundlicherweise von Markus Schweitzer zur Verfügung gestellt (Schweitzer, 1998). Dabei zeigt sich, daß die Schmelzpunkte der Benzylphosphonate **60a** und **60b** sowie deren Enthalpie und Entropie des Übergangs sehr nahe an den Werten des unmodifizierten Hexamers **58** liegen. Durch die Einführung von Methylphosphonaten kommt es hingegen zu Veränderungen sowohl der Enthalpie als auch der Entropie des Übergangs. Als Ursache für eine solche Abnahme der Enthalpie kommen die Verringerung der elektrostatischen Abstoßung der Methylphosphonate oder auch stabilere Stapelwechselwirkungen in Frage. Der günstige Enthalpiebetrag wird letztlich durch die gleichzeitige Abnahme des Entropieterms überkompensiert, so daß eine niedrigere Duplexstabilität resultiert (Schweitzer, 1998). Im Vergleich zu den Benzylphosphonaten ist die Abnahme dieser thermodynamischen Kenngrößen gegenüber dem unmodifizierten CGCGCG-Hexamer **58** deutlich geringer. Die für die Methylphosphonate genannten Argumente für den günstigen Enthalpiebetrag können bei den Benzylphosphonaten durch die ungünstigen Wechselwirkungen der

hydrophoben Benzylgruppe mit der hydrophilen Umgebung des Hexamers oder räumliche Restriktionen kompensiert werden. Die für **60b** gefundene hohe Duplexstabilität kann wiederum durch eine Abschwächung störender räumlicher Wechselwirkungen durch schwache π - π -Kontakte ausgeglichen werden. Derartige, jedoch deutliche schwächere Wechselwirkungen können für das vermeintliche Rp-Isomer **60a** nur durch eine Verzerrung der Helixgeometrie erreicht werden, wodurch die niedrigere Helixstabilität resultiert. Die im Vergleich zu den Methylphosphonaten gefundenen, überraschend hohen Duplexstabilitäten der Benzylphosphonate können letztlich nur durch eine positive Wechselwirkung wie beispielsweise π - π -Kontakte möglich werden. Bei allen Duplex-Knäuel Übergängen von Hexameren wurde die Abnahme des Enthalpieterms von einer gleichzeitigen Abnahme des Entropieterms kompensiert (Searle, 1993).

9.2.3 Hybridisierungsverhalten am Beispiel einer HCV-Hairpinstruktur

Der Einfluß sich direkt gegenüberliegender Benzylphosphonat Modifikationen wurde außerdem an einer Hairpinstruktur untersucht. Die komplementäre RNA-Sequenz zu diesem Hairpin mit fünf Basenpaaren im Stamm und einem Heptaloop ist als Zielsequenz für Antisense Oligonukleotide gegen HCV bereits untersucht worden. Das direkt gegen diesen Hairpin gerichtete, terminal beschwefelte Antisense Oligonukleotid **tS-20** zeigte erwartungsgemäß einen hohen, konzentrationsunabhängigen Schmelzpunkt auf. Die vorgefalteten Sequenzen sowohl von Wirkstoff als auch der Zielsequenz sind möglicherweise Ursache für das deutlich schlechtere Inhibitionsverhalten gegenüber ungefalteten Sequenzen.

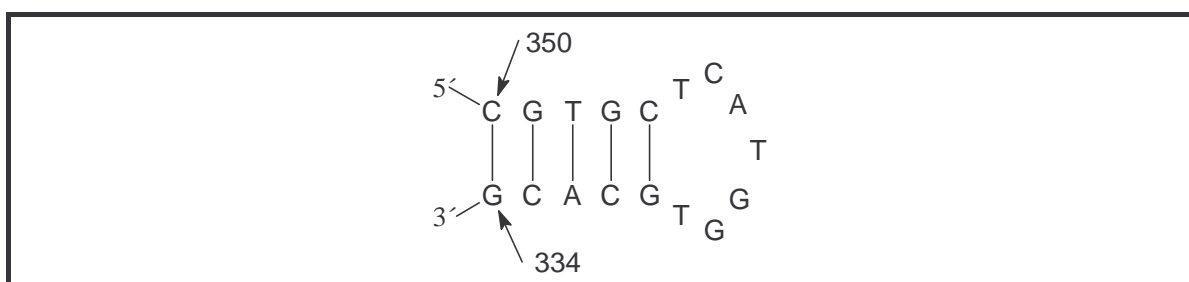


Abb. 9.10: Komplementäres Antisense Oligonukleotid zu einer Hairpinstruktur aus dem HCV-Genom

Für das unmodifizierte 17mer **61** wurde UV-spektroskopisch in Phosphatpuffer ein konzentrationsunabhängiger T_m -Wert von 69,3 °C gemessen. Das Einführen von jeweils drei Phosphorothioaten an den drei endständigen Phosphodiestern führte bei **tS-20** zu einer

starken Erniedrigung des Schmelzpunkts auf 60,6 °C. Für das analoge Benzylphosphonat **tB-20** konnte kein Schmelzübergang mehr beobachtet werden. Die Modifikationen sowohl bei den Phosphorothioaten als auch Benzylphosphonaten wurden nicht stereoregulär eingeführt, so daß die Verbindungen als Diastereomeregemische vorlagen. Ein möglicher Grund für die nicht mehr vorliegende Hairpinbildung bei **tB-20** kann die räumliche Überfüllung des doppelhelikalen Bereichs mit voluminösen, sich direkt gegenüberliegenden Benzylgruppen darstellen. Führt man die Phosphatrückgrat Modifikationen derart in den Stamm ein, daß sie sich nicht mehr direkt gegenüberliegen wie für die Oligonukleotide **tS-20a** und **tB-20a** geschehen, so läßt sich auch für **tB-20a** ein Schmelzübergang finden. Mehrfach hintereinander eingeführte, sich direkt gegenüberliegende, nicht stereoreguläre Benzylphosphonate erschweren die Duplexbildung erheblich (Lehmann, 1999b).

Sequenzen der Phosphorothioate (°) und Benzylphosphonate (*)				T _m -Wert	
350	345	340	335 (Nukleotide des HCV-Genoms)	[°C]	
5'-	<u>C G T G C</u> T C A T G G T	<u>G C A C G</u>	-3'	61	69,3
5'-	<u>C C T G C</u> T C A T G G T	<u>G G A C G</u>	-3'	62	33,6
5'-	<u>C° G° T° G C</u> T C A T G G T	<u>G C° A° C° G</u>	-3'	tS-20	60,6
5'-	<u>C° G T° G C</u> T C A T G G T	<u>G° C A° C G</u>	-3'	tS-20a	61,8
5'-	<u>G° T° G° C</u> T C A T G G T	<u>G° C° A° C</u>	-3'	tS-20b	47,0
5'-	<u>T° G° C° T</u> C A T G G T	<u>G° C° A</u>	-3'	tS-20c	28,8
5'-	<u>C*G*T*G C</u> T C A T G G T	<u>G C*A*C*G</u>	-3'	tB-20	---
5'-	<u>C*G T*G C</u> T C A T G G T	<u>G*C A*C G</u>	-3'	tB-20a	56,0
5'-	<u>G*T*G*C</u> T C A T G G T	<u>G*C*A*C</u>	-3'	tB-20b	---
5'-	<u>T*G*C*T</u> C A T G G T	<u>G*C*A</u>	-3'	tB-20c	---

Tab. 9.4: T_m-Werte einer HCV-Hairpinstruktur mit unterschiedlichen Modifikationen im Stamm. Komplementäre Sequenzen sind unterstrichen. Veränderte Nukleotide in Kontrollen sind **fett**. --- = kein Schmelzübergang (Lehmann, 1999b)

Trotzdem haben sich die Benzylphosphonate als geeignete Phosphatrückgrat Modifikationen in der Antisense Strategie herausgestellt (Samstag, 1996; Alt, 1999). Gegenüber unmodifizierten DNA- und RNA Zielsequenzen wurde nur ein geringer Stabilitätsverlust der Duplices beobachtet. Insbesondere die außergewöhnlich hohen Duplexstabilitäten stereoregulär eingeführter Benzylphosphonate in CGCGCG-Hexamere erfordern weitere Forschungsarbeiten.

10. Fluorphosphonate

Die Fluorphosphonate leiten sich von den natürlichen Phosphodiestern durch den Austausch eines nicht verbrückenden Sauerstoffatoms gegen Fluor aus. Auch in diesem Fall geht negative Ladung am Phosphatrückgrat verloren und der Phosphor wird chiral, so daß Dimere als Paare von Diastereomeren vorliegen. Aufgrund der höheren Priorität von Fluor gegenüber Alkylsubstituenten bei der Festlegung der Konfiguration führt die Substitution von Fluor durch ein Alkylderivat auch zu einem Wechsel der Konfiguration. Da mit dem Reinelement ^{19}F ein weiterer NMR-aktiver Kern in das Phosphatrückgrat eingebaut wird, ist eine starke P-F-Kopplung zu erwarten. Außerdem eröffnet sich die Möglichkeit, strukturaufklärende NMR-Experimente durchzuführen. Im Gegensatz zu den anderen Phosphor-Halogen Bindungen zeichnet sich die P-F-Bindung durch eine außergewöhnlich hohe Stabilität aus. Die P-F-Bindungsenergie liegt mit 496 kJ/mol noch über der einer P-O-Bindung, während die Bindungsenergien anderer Phosphor-Halogen Bindungen deutlich niedriger sind (Holleman, 1985). Besonders auffallend ist die hohe chemische und konfigurationelle Stabilität der dreiwertigen Fluorphosphinat Dimere (Dabkowski, 1995b). Auf einen Duplex destabilisierend wirkende räumliche Wechselwirkungen sind bei der Fluor-modifikation im Vergleich zu voluminösen Benzylphosphonaten nicht zu erwarten. Lediglich die Gefahr der basischen Hydrolyse der P-F-Bindung könnte die Anwendbarkeit solcher Derivate beeinträchtigen. Aus diesen Gründen wurden drei- und fünfwertige DNA-Dimerbausteine mit Fluormodifikation hergestellt und ihre Eigenschaften untersucht.

10.1 Synthese der Fluorphosphoramidite

Die im folgenden beschriebene Synthese der Fluorphosphonate wurde an der Polish Academy of Sciences in Lodz von Jan Michalski, Wojciech Dabkowski und Izabela Tworowska entwickelt (Helinski, 1993a; Helinski, 1993b; Dabkowski, 1994; Dabkowski, 1995a; Dabkowski, 1995b; Dabkowski, 1995c). Die Darstellung der entsprechenden Phosphoramidite erfolgte wiederum durch Umsetzung eines reaktiven, dreiwertigen Phosphitylierungsreagenzes mit entsprechend geschützten Nukleosiden. Bei der *1H*-Tetrazol aktivierten Dimerkupplung traten jedoch überraschend Nebenprodukte auf, die eingehend charakterisiert wurden (Lehmann, 1995; Lehmann, 1997). Während eines Forschungsaufenthalts in der Arbeitsgruppe von Prof. Jan Michalski an der Polish Academy of Sciences in Lodz

gelang die saubere Synthese entsprechender Dimere durch Verwendung von Trimethylsilylchlorid als Aktivator anstelle von 1*H*-Tetrazol. An dieser Stelle sei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Jan Michalski für die gute Zusammenarbeit und die mir entgegengebrachte Gastfreundschaft gedankt.

Als Phosphitylierungsreagenz zur Herstellung der Fluoramidite diene [*N,N*-Diisopropylamino-*di-O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin **65**. In Gegenwart von Basen kann nacheinander je eine 4-Nitrophenolatgruppe von **65** durch Nukleophile unter Gelbfärbung der Reaktionslösung substituiert werden. Zur Synthese von [*N,N*-Diisopropylamino-*di-O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin **65** wurde Phosphortrichlorid **46** in trockenem Petrolether mit zwei Äquivalenten *N,N*-Diisopropylamin umgesetzt, wobei lediglich ein Teil der Base mit Phosphortrichlorid **46** reagiert und der zweite Teil die entstehende Salzsäure neutralisiert. Nach 2 h Rühren bei RT wurde das ausgefallene *N,N*-Diisopropylammoniumhydrochlorid abgetrennt. Der Petrolether und überschüssiges Phosphortrichlorid **46** wurden bei Normaldruck abdestilliert. Das Zwischenprodukt (Dichloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **63** wurde durch fraktionierte Destillation im Hochvakuum aufgereinigt und in 70 %iger Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung des bei RT erstarrenden Öls erfolgte durch ¹H- und ³¹P-NMR-Spektroskopie (Caruthers, 1987).

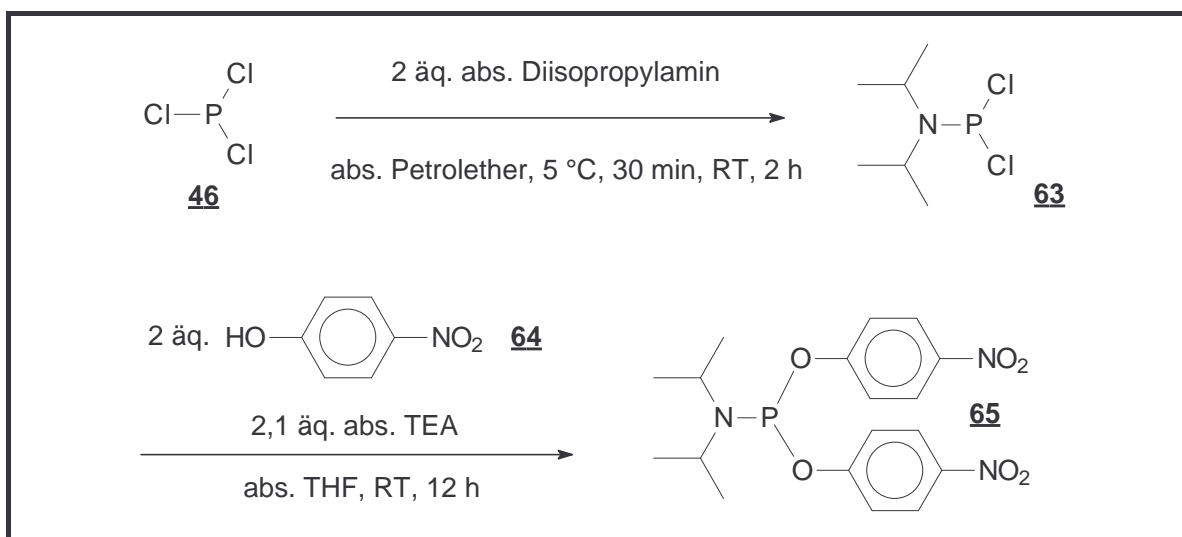


Abb. 10.1: Synthese des Phosphitylierungsreagenzes [*N,N*-Diisopropylamino-*di-O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin **65**

Im zweiten Reaktionsschritt wurde (Dichloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **63** mit zwei Äquivalenten 4-Nitrophenol in Gegenwart von Triethylamin in trockenem THF zur Reaktion gebracht. Nach 12 h Rühren bei RT wurde das ausgefallene Triethylammoniumhydrochlorid abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Das verbleibende rohe Produkt

wurde in siedendem Dichlormethan gelöst und anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ auskristallisiert. Das reine Produkt [*N,N*-Diisopropylamino-*di-O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin **65** wurde in 80 % Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung des blaßgelben Feststoffs erfolgte durch ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie sowie durch ESI-Massenspektrometrie (Helinski, 1991; Helinski, 1993a).

In den beiden folgenden Reaktionsschritten wurden die beiden 4-Nitrophenolatgruppen des Phosphitylierungsreagenzes **65** stufenweise substituiert. Zuerst erfolgte die Umsetzung von **65** mit 5'-dimethoxytritylierten und basengeschützten Nucleosiden. Unter Schutzgasatmosphäre wurden 1,1 Äquivalente [*N,N*-Diisopropylamino-*di-O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin **65** in trockenem THF gelöst. Eine Lösung aus einem Äquivalent des geschützten Nucleosids und 1,1 Äquivalenten DBU wurde langsam unter Gelbfärbung der Reaktionslösung zugetropft. Nach 2 h Rühren bei RT wurde aufgearbeitet und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an Kieselgel aufgereinigt. Die Ausbeuten für die jetzt chiralen Phosphoramidite betragen für **66a/b** 87 % und für **67a/b** 92 %. Die Charakterisierung dieser Verbindungen wurde mit Hilfe der ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie sowie mit ESI-Massenspektrometrie durchgeführt (Dabkowski, 1995a).

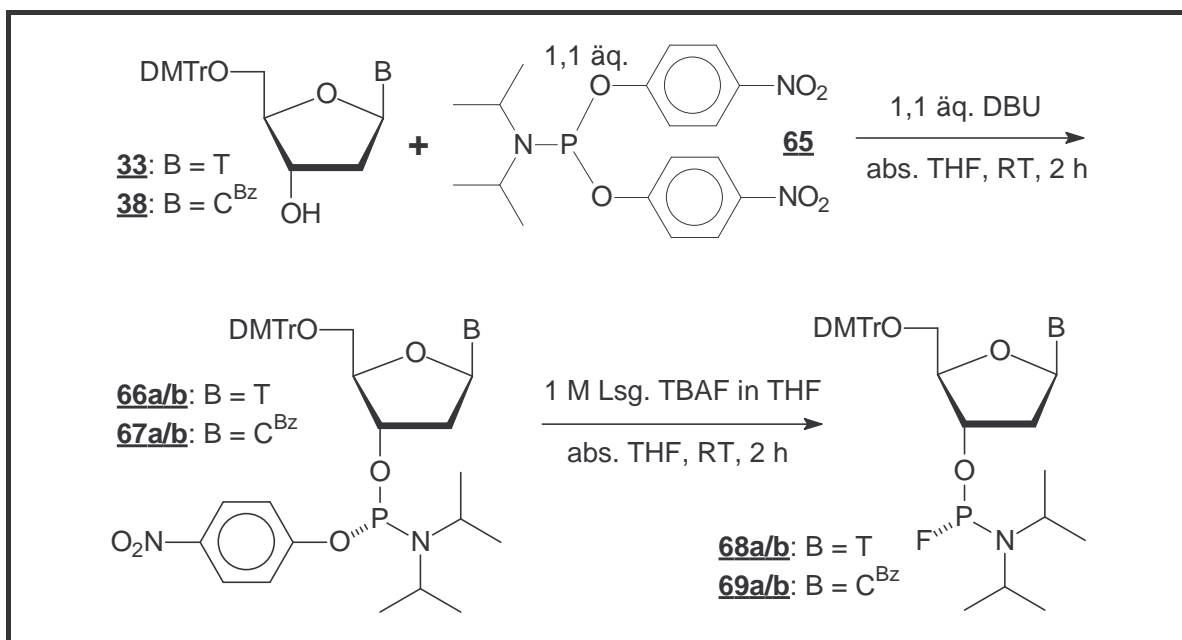


Abb. 10.2: Synthese der Fluorphosphoramidite **68a/b** und **69a/b**

Die an den Phosphoramiditen **66a/b** und **67a/b** verbliebenen 4-Nitrophenolatgruppen wurden in der folgenden Reaktion durch Fluorid substituiert. Den in THF gelösten Amiditen wurde ein leichter Überschuß einer 1 M Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid in THF

zugetropft. Nach 2 h Rühren bei RT wurde wiederum aufgearbeitet und an Kieselgel chromatographiert. Die Ausbeuten für die Fluorierungsreaktionen lagen mit 48 % für **68a/b** und 73 % für **69a/b** unter denen der ersten Substitution. Im ^{31}P -NMR-Spektrum und ^{19}F -NMR-Spektrum wurden für die beiden Diastereomerenpaare jeweils $^1J_{\text{P,F}}$ -Kopplungen zwischen 1110 Hz und 1120 Hz gemessen. Die weitere Charakterisierung erfolgte durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie ESI-Massenspektrometrie. Die auf diese Weise erhaltenen Fluorphosphoramidite **68a/b** und **69a/b** wurden anschließend in der Dimersynthese eingesetzt.

10.2 Dimerkupplungen mit Fluorphosphoramiditen

Die Synthese vollgeschützter DNA-Dimere mit Fluor als Phosphatrückgrat Modifikation wurde zunächst unter $1H$ -Tetrazol Aktivierung durchgeführt. Da die dreiwertigen Dimere $d(\text{Tp}_\text{F}\text{T})$ **70a/b** und $d(\text{Cp}_\text{F}\text{G})$ **71a/b** außerordentlich stabil waren, wurden diese auch ohne Oxidation aufgereinigt und charakterisiert.

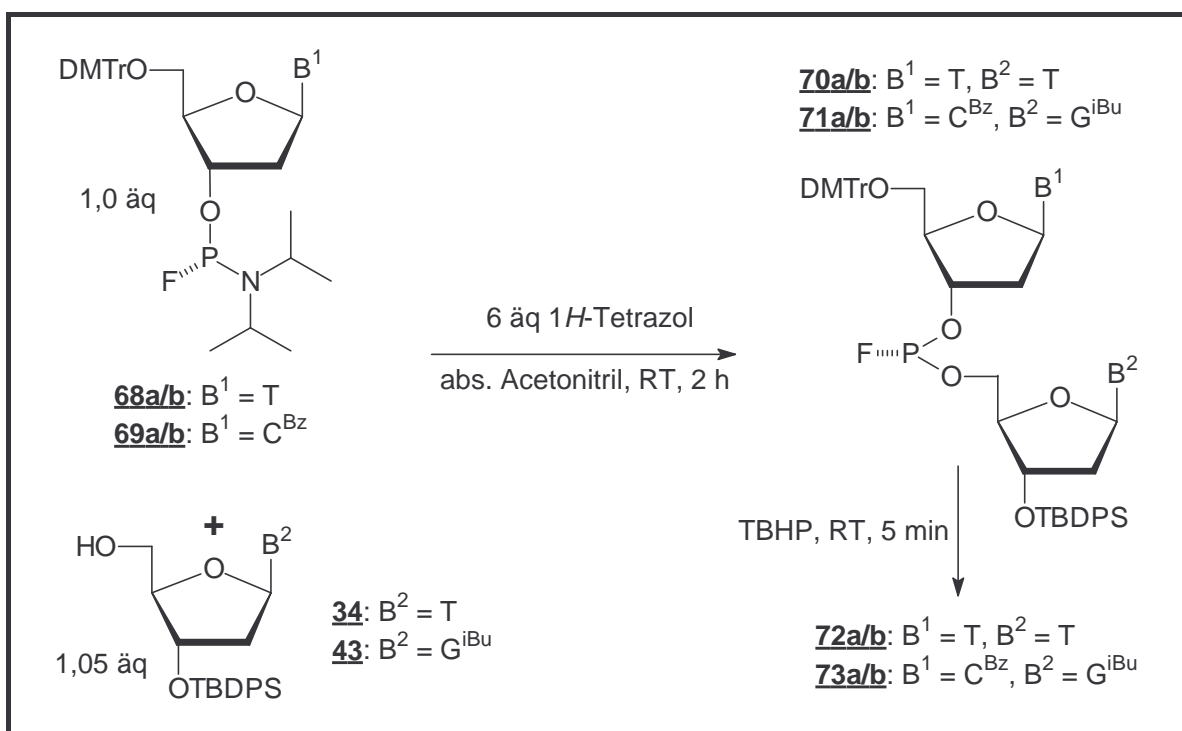


Abb. 10.3: Synthese der Fluorphosphinat- und Fluorphosphonat-Dimere

Zur Durchführung der Dimerkupplung wurde das Fluorphosphoramidit zusammen mit dem 5'-ungeschützten Nukleosid in einem Reaktionskolben getrocknet. Nach dem Lösen der Kupplungspartner in trockenem Acetonitril wurde dem Monomerenmischung der Aktivator

1H-Tetrazol gelöst in Acetonitril zugetropft. Nach zweistündigem Rühren wurde die Reaktionslösung aufgearbeitet und das Rohprodukt ^{31}P -NMR-spektroskopisch untersucht. Dabei konnte eine Reihe von Nebenprodukten gefunden werden, die sich bei der chromatographischen Aufreinigung nur schlecht entfernen ließen. Einige dieser Nebenprodukte konnten einwandfrei charakterisiert werden (Lehmann, 1995; Lehmann, 1997).

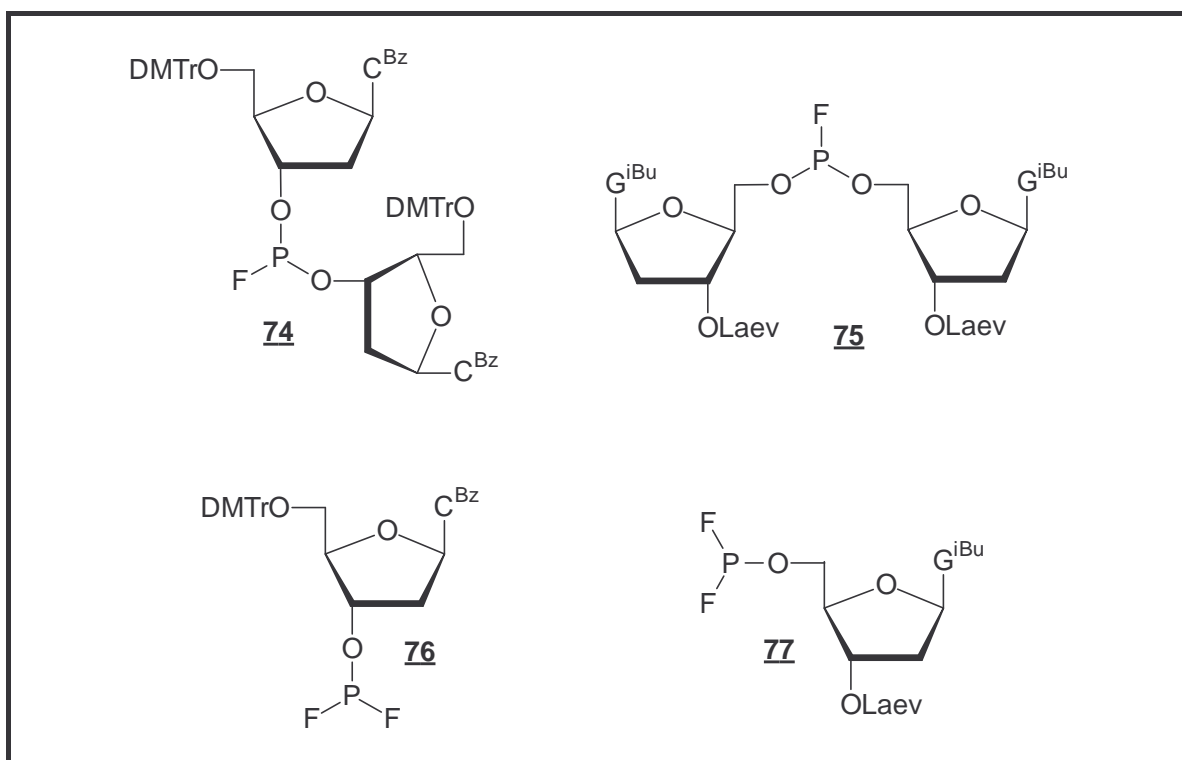


Abb. 10.4: Nebenprodukte bei der 1H-Tetrazol aktivierten Dimerkupplung

Zur Bildung der symmetrischen, nicht chiralen Dimere **74** und **75** müssen unter den Reaktionsbedingungen der Dimerkupplung Phosphodiesterbindungen gelöst und wieder neu gebildet werden. Die Entstehung der ebenfalls nicht chiralen Phosphodifluoridite **76** und **77** erfordert zudem freie Fluoridionen. Es ist bekannt, daß bereits katalytische Mengen von Fluoridionen die P-F-Alkoholyse induzieren (Corriu, 1981; Corriu, 1984; Corriu, 1989). Auf diese Weise läßt sich die Entstehung der symmetrischen Dimere **74** und **75** erklären. Wirkt Fluorid als Nukleophil, kann es außerdem die Hydrolyse der Phosphitester unter Bildung der Phosphodifluoridite **76** und **77** bewirken. Auf diese Weise könnten sich die vier Nebenprodukte unter den Reaktionsbedingungen der Dimerkupplung bilden (Lehmann, 1995). Wahrscheinlich reichen geringe Mengen an freigesetztem Fluorid aus, um den unerwünschten, autokatalytischen Kreislauf aus Alkoholyse und Hydrolyse einzuleiten. Aufgrund der Gefahr des Verlusts von 3'-Silylschutzgruppen in Gegenwart von Fluorid wur-

den die Dimersynthesen zunächst mit 3'-Laevulinyl geschützten Nucleosiden durchgeführt (siehe Abb. 10.4). Der Einsatz 3'-silylierter Nucleoside hatte - wie sich später zeigte - jedoch keinen Einfluß auf das Ergebnis der Dimerkupplungen, so daß auch diese Bausteine eingesetzt werden konnten.

Ein typisches ^{31}P -NMR-Rohspektrum des dreiwertigen Dimers $d(\text{Cp}_F\text{G})$ **71a/b** ist in Abb. 10.5 gezeigt. Deutlich sind die Signale der gewünschten, diastereomeren Verbindung **71a/b** als Hauptprodukt zu erkennen. Die $^1\text{J}_{\text{P,F}}$ -Kopplungen liegen für die dreiwertigen Dimere zwischen 1210 Hz und 1220 Hz. Die Kopplungen und die chemischen Verschiebungen im ^{31}P -NMR-Spektrum für die symmetrischen und daher nicht mehr chiralen Dimere **74** und **75** liegen erwartungsgemäß in der selben Größenordnung. Während die phosphorchemische Verschiebung des symmetrischen C-C-Dimers **74** leicht hochfeldverschoben und daher gut erkennbar ist, fällt die des symmetrischen G-G-Dimers **75** mit den Produktsignalen zusammen. Dies konnte durch separate Synthese der symmetrischen Dimere gezeigt werden (Lehmann, 1995; Lehmann, 1997).

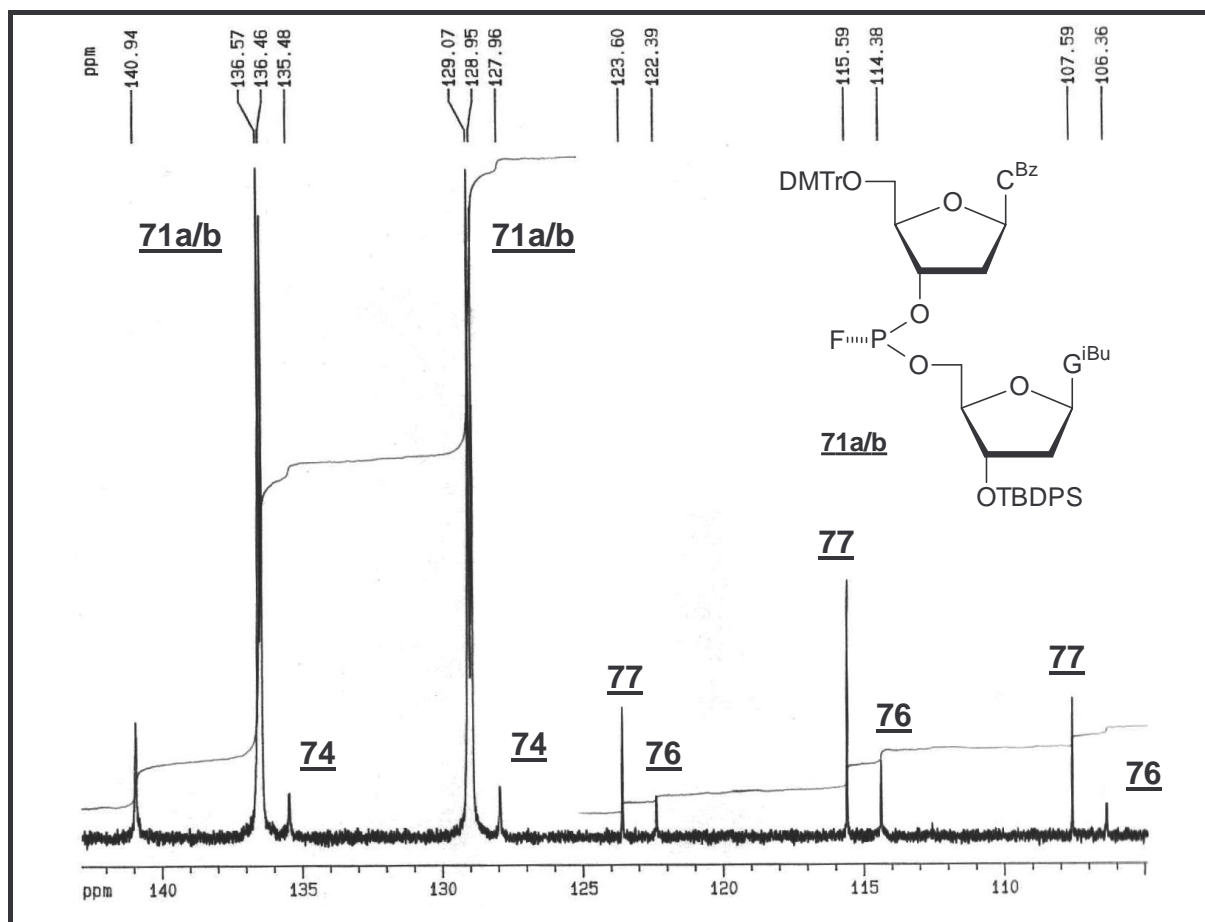


Abb. 10.5: Ausschnitt aus einem ^{31}P -NMR-Spektrum der Verbindung $d(\text{Cp}_F\text{G})$ **71a/b** mit den typischen Nebenprodukten bei der 1H-Tetrazol aktivierten Dimerkupplung

Werden die dreiwertigen Dimere mit TBHP zu Phosphofluoridaten oxidiert, verringert sich deren $^1J_{P,F}$ -Kopplung von gut 1200 Hz auf 980 Hz bis 990 Hz. Die Signale der ebenfalls nicht chiralen Phosphodifluoridite **76** und **77** sind leicht an ihrem durch die beiden Fluoratome hervorgerufenen Aufspaltungsmuster zu erkennen. Sie besitzen mit über 1300 Hz die größten $^1J_{P,F}$ -Kopplungen. Die phosphorchemischen Verschiebungen und $^1J_{P,F}$ -Kopplungen der in dieser Arbeit synthetisierten Substanzen mit Phosphor-Fluor Bindungen sind in Tab. 10.1 zusammengestellt.

	δ [ppm]	$^1J_{P,F}$ [Hz]		δ [ppm]	$^1J_{P,F}$ [Hz]		δ [ppm]	$^1J_{P,F}$ [Hz]		δ [ppm]	$^1J_{P,F}$ [Hz]
68a	155.7	1116.3	70a	132.1	1213.8	72a	- 10.6	989.5	74	131.7	1217.6
68b	155.9	1117.2	70b	133.3	1215.6	72b	- 10.2	982.5	75	132.6	1215.0
69a	155.7	1120.1	71a	132.1	1216.5	73a	- 9.9	978.0	76	114.4	1320.1
69b	155.9	1116.1	71b	132.8	1213.7	73b	- 9.8	988.5	77	115.6	1303.9

Tab. 10.1: Angabe der ^{31}P chemischen Verschiebungen und $^1J_{P,F}$ -Kopplungen von in dieser Arbeit synthetisierten Substanzen mit Phosphor-Fluor Bindung

10.3 Dimerkupplungen mit Trimethylsilylchlorid als Aktivator

Um die unerwünschten Nebenreaktionen zu beseitigen, wurden die Reaktionszeiten, vor allem aber die Aktivatoren variiert. Neben derivatisierten Tetrazolen wie 5-(4-Nitrophenyl)-1*H*-tetrazol oder 5-Thioethyl-1*H*-tetrazol wurden auch sterisch anspruchsvolle Aktivatoren wie 2,6-*di-tert*-Butyl-4-methylpyridinium-tetrafluoroborat oder 1,8-Dimethyl-aminonaphthalin-tetrafluoroborat eingesetzt, ohne jedoch das Ergebnis entscheidend zu verändern (Eisenhardt, 1996).

Interessanterweise erwies sich Trimethylchlorsilan als ein geeigneter Aktivator zur nebenreaktionsfreien Durchführung von Dimerkupplungen mit Fluorphosphoramiditen wie **68a/b** und **69a/b** (Dabkowski, 1997). In einer typischen Reaktionsführung wurden 100 μmol des Phosphoramidits und 105 μmol des 5'-ungeschützten Nukleosidbausteins nach Trocknung in 1 ml trockenem Acetonitril gelöst und mit 100 μmol (12,7 μl) Trimethylsilylchlorid versetzt. Nach 90minütigem Rühren bei RT wurden die Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt. Die Ausbeuten betragen für die als Diastereomerenmische vorliegenden, dreiwertigen Dimere d(Tp_FT) **70a/b** 65 % und für d(Cp_FG) **71a/b** 64 %. Die Charakterisierung dieser

Ein möglicher Reaktionsmechanismus für die durch Trimethylsilylchlorid aktivierte Dimerkuppelung ist in Abb. 10.7 gezeigt. Im ersten Reaktionsschritt reagiert TMSCl mit der Phosphoramiditgruppe unter Bildung einer salzähnlichen Spezies. Dabei kann die positive Ladung sowohl am Phosphoratom als auch am Stickstoff des Amidits lokalisiert sein. Dieses Gleichgewicht wird auch bei der *1H*-Tetrazol aktivierten Dimersynthese diskutiert. Formal übernimmt das Trimethylsilylkation die Rolle des sauren Protons des *1H*-Tetrazols, während das Chloridanion wie das Tetrazolid in einer raschen Reaktion durch einen 5'-ungeschützten Nukleosidbaustein substituiert wird. Die Aktivoren werden dabei regeneriert. Von einer Katalyse kann man jedoch nicht sprechen, da die Aktivoren substöchiometrisch eingesetzt nur zu einer unvollständigen Umsetzung führen. Ebenfalls denkbar erscheint die Reaktion von Trimethylsilylchlorid mit dem Alkohol unter Freisetzung von Salzsäure, die das dreiwertige Phosphoramidit aktiviert. TMSCl reagiert mit Alkoholen jedoch nur in Gegenwart eines Katalysators mit hoher Geschwindigkeit, so daß dieser Mechanismus unwahrscheinlich ist (Dabkowski, 1997).

10.4 Chemische Stabilität von Phosphor-Fluor-Bindungen

Während eines Forschungsaufenthalts an der Polish Academy of Sciences in Lodz konnte nicht nur die nebenproduktfreie Synthese der Dimere realisiert werden, sondern es wurde die chemische Stabilität der Fluorphosphoramidite und der dreiwertigen Dimere untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Experimente in NMR-Röhrchen durchgeführt. Löst man das Fluorphosphoramidit **68a/b** in THF und versetzt mit einem großen Überschuß an *1H*-Tetrazol, beobachtet man nach zwei Stunden im ^{31}P -NMR-Spektrum die Bildung von Phosphodifluoriditen. Gegenüber Fluoridionen ist das Fluorphosphoramidit **68a/b** jedoch völlig stabil. Dies ist auch zu erwarten, da diese Verbindung zuvor durch eine Substitutionsreaktion mit Fluorid dargestellt wurde und dabei keine Nebenreaktionen beobachtet wurden. Das an der Phosphodiesterbindung mit Fluorid substituierte Dimer $\text{d}(\text{Tp}_\text{F}\text{T})$ **70a/b** hingegen zeigt genau ein umgekehrtes Reaktionsverhalten. Setzt man einen großen Überschuß an *1H*-Tetrazol zu, kann nach zwei Stunden keine nennenswerte Zersetzung durch ^{31}P -NMR-spektroskopische Analytik gefunden werden. Hingegen reichen substöchiometrische Mengen von Fluoridionen, um innerhalb von zwei Stunden eine vollständige Hydrolyse von **70a/b** zu katalysieren. Die beschleunigte Hydrolyse von Fluorphosphaten durch Zugabe von Fluoridionen ist literaturbekannt (Corriu, 1989). Möglicherweise verläuft eine solche Hydrolyse über ein pentakoordiniertes Phosphoratom, das zwei P-F-

Bindungen ausbildet. Eine solche Spezies kann der Ausgangspunkt für die unerwünschte Bildung der Phosphodifluoridite und der symmetrischen Dinukleotide sein. Bei der 1*H*-Tetrazol aktivierten Dimerkupplung scheinen demzufolge zwei sich gegenseitig beeinflussende Nebenreaktionen abzulaufen: Zum einen wird aus dem Fluorphosphoramidit **68a/b** nach Zugabe von 1*H*-Tetrazol Fluorid freigesetzt. Bereits katalytische Mengen von Fluoridionen wiederum führen zur Hydrolyse des während der Reaktion gebildeten Produkts, dem d(Tp_FT)-Dimeren **70a/b**. Diese verhängnisvolle Wechselwirkung macht Tetrazole als Aktivatoren für die Kupplung von Fluor modifizierten Dimeren unbrauchbar.

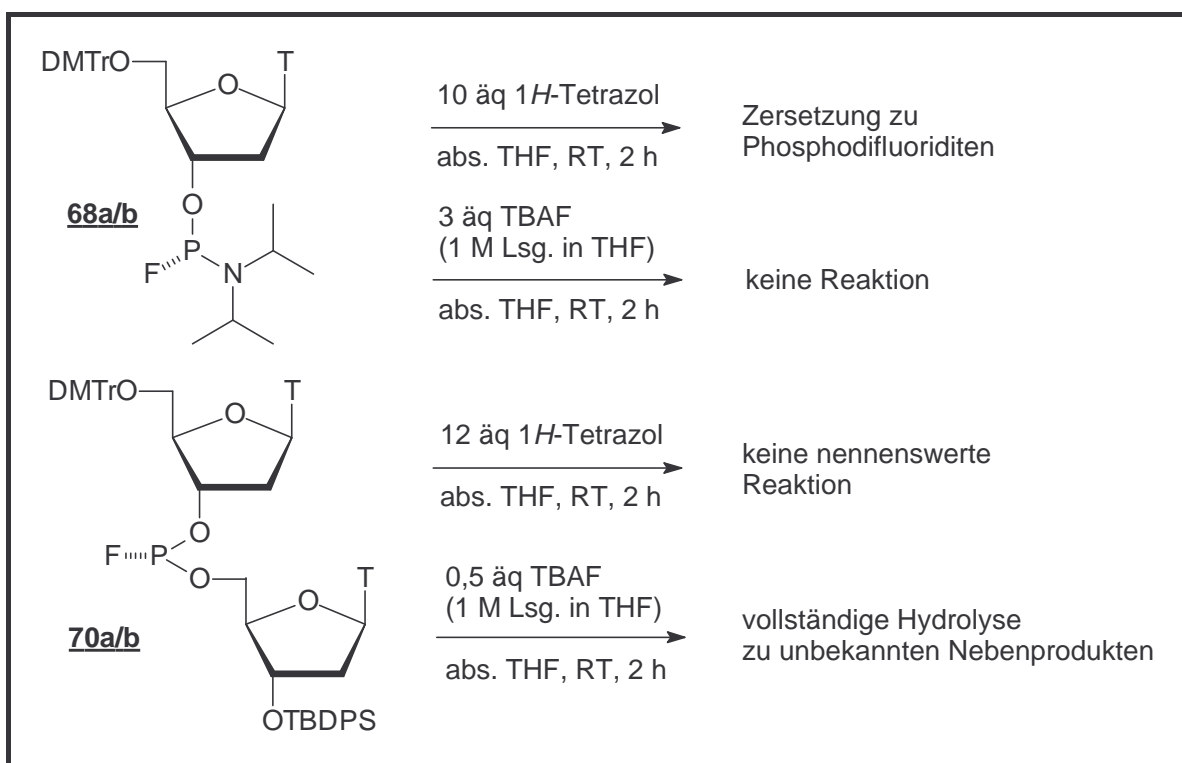


Abb. 10.8: Chemische Stabilität der Fluorphosphoramidite und Phosphodifluoridit-Dimere unter den Reaktionsbedingungen der 1*H*-Tetrazol aktivierten Dimerkupplung

Nicht nur Fluoridionen beschleunigen die Hydrolyse der Fluorphosphonate. Vor allem basische Bedingungen, wie sie standardmäßig beim Abspalten vom Trägermaterial und zum Entschützen bei der Festphasensynthese von Oligonukleotiden benötigt werden, führen zur raschen Hydrolyse der Fluorphosphonate. Vermeidet man wässrige Hydrolysebedingungen, lässt sich das Fluorid gegen beliebige Alkohole in Gegenwart von Basen unter Ausbildung von Phosphitriestern substituieren (Misiura, 1995). Die geringe chemische Stabilität gegenüber basischem Milieu ist der Hauptgrund, weshalb die Fluorphosphonate nicht erfolgreich in Oligonukleotide eingebaut werden konnten.

11. Zusammenfassung und Ausblick

In den vergangenen Jahren wurden in der Antisense-Technologie grundlegende Hürden genommen, die eine Arzneimittelentwicklung auf Nukleinsäurebasis ermöglichen. Hierzu zählt vor allem die Gewährleistung einer ausreichenden metabolischen Stabilität und die Synthese im technischen Maßstab. In zahlreichen klinischen Studien wurde der Wirksamkeitsnachweis am Menschen erbracht. Als sequenzspezifische Therapeutika zeichnen sich Antisense Oligonukleotide im Vergleich zu vielen anderen Wirkstoffen dadurch aus, daß sie spezifisch mit einer RNA-Zielsequenz hybridisieren, ohne dabei wichtige zelluläre Funktionen zu beeinträchtigen. Neben krankheitsauslösenden Genen können Antisense Oligonukleotide auch virale Gene blockieren und nach Aktivierung der Ribonuklease H hydrolysieren. Das erste Präparat auf Oligonukleotidbasis wurde 1998 zugelassen und hemmt erfolgreich die Vermehrung des Cytomegalievirus.

Hepatitis C ist eine Virusinfektion, die momentan nur unzureichend therapiert werden kann. Seit Mitte der neunziger Jahre wird nach geeigneten Antisense Oligonukleotiden und Ribozymen gesucht, um die Heilungschancen bei einer chronischen HCV-Infektion zu verbessern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch experimentelles Screening eine potente Zielsequenz (**tS-13**) im Bereich der internen ribosomalen Angriffsstelle (IRES) und des Startcodons für die Proteinbiosynthese des HCV gefunden (Nukleotide 326-342 des HCV-Genoms). Hierzu wurde die Sequenz eines bereits bekannten 23mer Antisense Oligonukleotids durch systematisches Verkürzen auf 17 Nukleotide reduziert, ohne *in vitro* an Inhibitionspotential einzubüßen. Erst weitere Verkürzungen führten zu einer deutlichen Abnahme der Antisense Wirkung.

Eine Schwierigkeit bei der therapeutischen Anwendung von polyanionischen Antisense Oligonukleotiden ist deren begrenzte zelluläre Aufnahme. Wie in Kapitel 3 dargestellt, wurden bislang zahlreiche Methoden zur Verbesserung der Membrangängigkeit dieser Wirkstoffklasse entwickelt. Zur Evaluierung eines leberselektiven Transports (engl.: drug targeting) und zur Steigerung der hepatozellulären Aufnahme (engl.: cell uptake) wurde das antiviral wirkende 17mer Antisense Oligonukleotid **tS-13** mit Biomolekülen wie den Gallensäuren, die im enterohepatischen Kreislauf das Zielorgan Leber passieren, kovalent verknüpft. Die Kupplung erfolgte dabei über die für die zelluläre Aufnahme nicht essentielle 3 α -Hydroxylgruppe der Cholsäure und Taurocholsäure. Die Gallensäuren wurden entsprechend geschützt, in die Phosphoramidite **22a/b** und **27a/b** überführt und im letzten Kupplungsschritt der Festphasensynthese an das 5'-Ende des Oligonukleotids gebunden

(Lehmann, 2001b). Das 3'-Ende wurde falls erforderlich mit einem Farbstoff oder einem Radiolabel markiert. Zur Erhöhung der enzymatischen Stabilität wurden zusätzlich terminale Phosphatrückgrat Modifikationen in die Oligonukleotide eingebaut.

Die neue Schutzgruppenstrategie ermöglichte erstmals die Derivatisierung eines Oligonukleotid-Gallensäure Konjugats mit basenlabilen Phosphatrückgrat Modifikationen wie den Alkylphosphonaten. Antisense Oligonukleotide mit Benzylphosphonat-Modifikationen hatten sich in der Vergangenheit als potente Inhibitoren der HCV-Expression *in vitro* und in Zellkultur erwiesen (Alt, 1999). Die Carbonsäurefunktion der Cholsäure wurde als Allylester geschützt, der an der festen Phase unter milden Bedingungen Palladium (0) katalysiert hydrolysiert wurde. Die 7 α - und 12 α -Hydroxylgruppen blieben aufgrund ihrer geringen Reaktivität ungeschützt. Oligonukleotid-Taurocholsäure Konjugate wurden bislang noch nicht synthetisiert. In der Zellmembran von Hepatozyten wurden jedoch gerade für die Taurocholsäure aktive Transportsysteme wie das Natrium-abhängige Taurocholat cotransportierende Polypeptid (NTCP) gefunden. Vor diesem Hintergrund erscheint die Untersuchung der zellulären Aufnahme von Taurocholsäure konjugierten Oligonukleotiden besonders attraktiv. Taurocholsäure wird durch Amidierung von Cholsäure mit Taurin erhalten. Unmittelbar vor der Phosphitylierungsreaktion zu kupplungsfähigen Phosphoramiditen ist es gelungen, zum einen ein und dasselbe Cholsäurederivat - die 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxycholsäure **20** - als Allylester zu schützen und zum anderen eine Amidierung zu einem als Ethylester geschützten Taurocholsäurederivat durchzuführen. Durch diese divergente Synthesestrategie entfällt eine unabhängige Synthese des Taurocholsäureamidits. Zudem konnte der Sulfonsäureethylester aufgrund der hohen Elektrophilie des α -C-Atoms des Ethylesters unter Standardbedingungen mit Ammoniak entschützt werden.

Das durch Verkürzung des 23mers gefundene, terminale Phosphorothioat **tS-13** wurde am 5'-Ende mit Cholsäure, Taurocholsäure und Cholesterol derivatisiert. In völliger Analogie wurden die entsprechenden Benzylphosphonate dargestellt, bei denen das Schwefelatom am Phosphodiester durch eine Benzylgruppe ausgetauscht ist. Bei der Untersuchung des Hybridisierungsverhaltens zeigte sich, daß die 5'-Derivatisierung keinen negativen Einfluß auf die Duplexstabilität hatte. Als Zielsequenzen wurden sowohl komplementäre DNA- wie RNA-Sequenzen verwendet. Im Vergleich zu den Phosphorothioaten ergab die Einführung von Benzylphosphonaten eine geringe Depression des Schmelzpunkts um etwa 0,3 °C je Modifikation. Wie durch RP-HPLC gezeigt werden konnte, erhöhte sich die Lipophilie durch die 5'-Derivatisierung mit Gallensäuren lediglich moderat im Vergleich

zur 5'-Cholesterol Derivatisierung. Die Abtrennung von 5'-unmodifizierten Abbruchsequenzen durch RP-HPLC gelingt jedoch leicht. Interessanterweise ergaben sechs Benzylphosphonat Modifikationen in einem 17mer den gleichen Lipophiliegewinn wie die Einführung einer Gallensäure am 5'-Ende. Wurden sowohl Benzylphosphonate als auch Gallensäuren in ein Oligonukleotid eingeführt, so verhält sich die Steigerung der Lipophilie additiv (Lehmann, 2001a; Lehmann, 2001b).

Alle modifizierten Oligonukleotide wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang H. Caselmann an der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität in Bonn in dort entwickelten *in vitro* und Zellkultur Translations-Assays auf ihre inhibitorische Wirkung getestet. Wesentlicher Bestandteil dieser Luciferase Reporter-Gen-Assays ist ein Plasmid Konstrukt, das sich aus der hochkonservierten, nicht codierenden Region des HCV-Genoms sowie 66 Nukleotiden des Core-Gens und dem Luciferase-Gen zusammensetzt. Für den Zellkultur Translations-Assay wurde dieses Konstrukt in verschiedene Leberzelllinien stabil transfiziert.

Im Vergleich zum unmodifizierten 17mer Phosphorothioat **tS-13** zeigten die 5'-derivatisierten Antisense Oligonukleotide *in vitro* durchweg ein niedrigeres Inhibitionspotential, wobei das des Taurocholsäurederivats **tS-13Z** nur geringfügig abweicht. Im Gegensatz zum Mismatch Kontrolloligonukleotid **tS-13K** wurde für alle Derivate von **tS-13** eine spezifische, dosisabhängige Inhibierung der HCV-Genexpression gefunden. Die analogen Benzylphosphonate zeigten *in vitro* einen weiteren Verlust an Antisense Wirkung im Vergleich zu den Phosphorothioaten. Ein mögliche Ursache für dieses Verhalten ergibt sich aus der erniedrigten Duplexstabilität der Benzylphosphonate. In Zellkultur wurde sowohl für das Phosphorothioat **tS-13** als auch für das Benzylphosphonat **tB-13** eine hochspezifische Inhibierung der HCV-Genexpression gefunden.

Zur Untersuchung der hepatozellulären Aufnahme von Oligonukleotiden wurden Zelllinien kloniert, die Transportproteine wie das NTCP oder das OATP überexprimieren können. Auf die zelluläre Aufnahme kann über die Luciferase-Aktivität geschlossen werden. Durch die Verwendung ebenfalls synthetisierter, 3'-Fluoreszein markierter Oligonukleotide kann die Internalisierung auch direkt gemessen werden. Bislang liegt nur ein Ergebnis aus einem Zellaufnahmeexperiment vor. Obwohl es sich nur um eine Einzelmessung handelt und das Ergebnis deshalb nicht überinterpretiert werden darf, konnte für die Gallensäure gelabelten Oligonukleotide **tS-13Y** und **tS-13Z** eine von der Zeit abhängige, effizientere Inhibierung als für das 5'-unmodifizierte Oligonukleotid **tS-13** und das Kontrolloligonukleotid **tS-13K** gefunden werden. Weitere Zellaufnahmeexperimente sind not-

wendig, um aussagefähige Ergebnisse zu erhalten. Die Untersuchung des leberselektiven Drug Targetings von Gallensäure gekuppelten Oligonukleotiden wird an einer transgenen Maus nach intravenöser Applikation erfolgen.

Neben den biologischen Assays wurden in dieser Arbeit gezielt die Charakteristika der Phosphatrückgrat Modifikationen untersucht. Für die Rp- und Sp-Diastereomere von Oligonukleosid-Methylphosphonat Dimeren wurden auffällige Gemeinsamkeiten gefunden: Unabhängig von der Polarität der stationären Phase wurden die Rp-Isomere bei chromatographischer Trennung stets schneller eluiert. Abgesehen von einer Ausnahme besaßen die Rp-Isomere im ^{31}P -NMR-Spektrum stets die hochfeldigere chemische Verschiebung (Schell, 1998a; Schell, 1998b). Die Zuordnung der absoluten Konfiguration gelang mit Hilfe von 2D-NMR-ROESY Experimenten durch Analyse der ROEs der homotopen Methylprotonen zu den Protonen der Desoxyriboseringe (Löschner, 1990). Die Untersuchung diastereomerenreiner Oligonukleosid-Benzylphosphonat Dimere zeigte schnell, daß die bei den Methylphosphonaten gefundenen Prinzipien nicht übertragen werden konnten. Vor allem die Zuordnung der absoluten Konfiguration durch Interpretation der ROESY-Spektren wurde durch die jetzt diastereotopen Methylenprotonen der Benzylgruppe und die Überlagerung relevanter Signale erschwert. Ebenfalls in Analogie zu Methylphosphonaten wurden isomerenreine d(CGC_{p_{Bn}}GCG)-Hexamere auf ihre Duplexstabilität untersucht. Für das langsamer eluierende Isomer **60b** wurde ein überraschend hoher Schmelzpunkt gefunden, der bei Sp-Konfiguration durch zusätzliche π - π -Wechselwirkungen mit den gepaarten Basen erklärt werden kann. Dieses Ergebnis unterstreicht den Vorteil einer Einführung von Benzylphosphonaten mit definierter Konfiguration in therapeutische Oligonukleotide. CD-spektroskopische Untersuchungen der Hexamere unter Hochsalzbedingungen überführten selektiv das Sp-Isomer der Methylphosphonate in die Z-Konformation. Unter identischen Bedingungen ließ sich jedoch keines der Benzylphosphonat-Hexamere in die Z-Form überführen, so daß sich die absolute Konfiguration der isomerenreinen Hexamere **60a** und **60b** nicht mit letzter Sicherheit bestimmen ließ (Lehmann, 1999a).

Als weitere Phosphatrückgrat Modifikation wurden die Fluorophosphonate genauer untersucht. Für diese Substanzklasse gelang in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jan Michalski an der Polish Academy of Sciences in Lodz mit Trimethylchlorsilan anstelle von 1*H*-Tetrazol als Aktivator die nebenproduktfreie Synthese dreiwertiger und fünfwertiger DNA-Dimere. Aufgrund ihrer Basenlabilität eignen sich die Fluorophosphonate jedoch nicht für den Einbau in Oligonukleotide. Vielmehr kann der Fluorid Ligand leicht unter basischen Bedingungen gegen andere Nukleophile substituiert werden.

12. Experimenteller Teil

12.1 Allgemeines

12.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Aceton; C_3H_6O [58,08]; Roth Nr. 9372.2, p.a., >99,5 %, Wasser <0,2 %, Sdp.: 56 °C, $d = 0,79$

Acetonitril; C_2H_3N [41,05]; Merck Nr. 13358, Prepsolv[®], für die präparative HPLC

Acetonitril; C_2H_3N [41,05]; Roth Nr. 7330.2, Roti[®] solv HPLC, >99,9 %, Wasser <0,03 %, Sdp.: 81-82 °C, $d = 0,78$

Acetonitril; C_2H_3N [41,05]; PerSeptive Biosystems Nr. GEN066870, Amidite Diluent

Acetylchlorid; C_2H_3OCl [78,50]; Fluka Nr. 00990, puriss. p.a., >99 %, Sdp.: 50-52 °C, $d = 1,105$

Acrylamid; C_3H_5NO [71,08]; Roth Nr. 7871, purum

Allylalkohol; C_3H_6O [58,08]; Aldrich Nr. A2,870-8, 99 %, Sdp.: 96-98 °C, $d = 0,854$

Ammoniak; H_3N [17,03]; Merck Nr. 105426, 32 % wässrige Lösung, reinst, $d = 0,88$

Ammoniumacetat; $C_2H_7NO_2$ [77,08]; Fluka Nr. 09690, p.a., >98 %

Anisaldehyd; $C_8H_8O_2$ [136,15]; Fluka Nr. 10440, purum, >98 %, Sdp.: 118-121 °C, $d = 1,123$

Argon; Westfalen Industriegase, Qualität 4.8, eingesetzt wie gekauft

Benzimidazol; $C_7H_6N_2$ [118,14]; Acros Nr. 18642, 98 %, Smp.: 172-174 °C

Benzol; C_6H_6 [78,12]; Fluka Nr. 12560, purum, >99 %, Sdp.: 80 °C, $d = 0,879$

Benzolsulfonsäure (BSA); $C_6H_6SO_3$ [158,18]; Aldrich Nr. 13,507-0, technisch, 90 %

Benzoylchlorid; C_7H_5ClO [140,57]; Janssen Nr. 10.575.02, 99 %, Sdp.: 198 °C, $d = 1,211$

Benzylchlorid; C_7H_7Cl [126,59]; Merck-Schuchardt Nr. 801809, zur Synthese, Sdp.: 179 °C, $d = 1,10$

Borsäure; H_3BO_3 [61,83]; Fluka Nr. 15660, puriss. p.a., >99,5 %

tert-Butyldiphenylchlorsilan (TBDPS); $C_{16}H_{19}ClSi$ [274,87]; Fluka Nr. 19938, purum, >97 %, Sdp._{0,01}: 90 °C, $d = 1,074$

tert-Butylhydroperoxid (TBHP); $C_4H_{10}O_2$ [90,12]; Fluka Nr. 19998, purum, ~3M Lösung in Isooctan, wasserfrei über Molekularsieb 4Å, $d = 0,756$

Calciumchlorid; $CaCl_2$ [110,99]; Merck Nr. 102389, gekörnt, wasserfrei, Trocknungsmittel, ca. 2-10 mm, >95 %

Calciumhydrid; CaH_2 [42,10]; Janssen Nr. 19.679.85, 0-10 mm Korngröße, mit 5-10 % Pulver, ca. 93 %

Celite[®] 512 Nr. 0050

Chlorameisensäureethylester; C_3H_5ClO [108,52]; Aldrich Nr. 18,589-2, 97 %, Sdp.: 93 °C, $d = 1,135$

Cholesterin aus Lanolin; $C_{27}H_{46}O_5$ [386,67]; Fluka Nr. 26732, >99 %, Smp.: 148-150 °C

Cholsäure; $C_{24}H_{40}O_5$ [408,58]; Fluka Nr. 27010, >99 %, Smp.: 197-199 °C

2'-Desoxyadenosin; $C_{10}H_{13}N_5O_4$ [251,25]; Pharma Waldhof Nr. 60013, 99,1 %

2'-Desoxycytidin-HCl; $C_9H_{13}N_3O_4 \cdot HCl$ [263,68]; Pharma Waldhof Nr. 6102340, 99,7 %

2'-Desoxyguanosin; $C_{10}H_{13}N_5O_4$ [267,25]; Pharma Waldhof Nr. 6201340, 99,4 %

1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en (DBU); Fluka Nr. 33482, puriss., >99 %, Sdp.₁₁: 115 °C, $d = 1,019$

- Dichlormethan;** CH_2Cl_2 [84,93]; technische Qualität, Sdp.: 40 °C, wird über Calciumchlorid destilliert
- Dichlormethan;** CH_2Cl_2 [84,93]; Grüssing Nr. 10268, 99,5 %, für analytische Zwecke
- Dichlormethan;** CH_2Cl_2 [84,93]; Fluka Nr. 66749, puriss., absolut, über Molekularsieb, Wasser <0,05 %, Sdp.: 40 °C, $d = 1,325$
- N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC);** $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2$ [206,33]; Fluka Nr. 36650, puriss., 99 %, Smp.: 33-35 °C
- Diethylamin;** $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$ [73,14]; Fluka Nr. 31730, puriss. p.a., >99,5 %, Wasser <0,1 %, Sdp.: 55-56 °C, $d = 0,704$
- Diethylazodicarboxylat (DEAD);** $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ [174,16]; Fluka Nr. 11624, purum, >97 %, Sdp.: 211-213 °C, $d = 1,12$
- N,N*-Diethyldithiocarbamidsäure-Ammoniumsalz;** $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2\text{S}_2$ [166,31]; Aldrich Nr. 35,954-8, Smp.: 80 °C
- Diethylether;** $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ [74,12]; technische Qualität, Sdp.: 34-36 °C, $d = 0,714$, zuerst über NaOH, dann über Natriumdraht getrocknet
- Diethylpyrocarbonat (DEPC);** $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ [162,14]; Fluka Nr. 32490, purum, >99 %, Sdp.: 160-163 °C, $d = 1,12$
- Diisopropylamin (DIPA);** $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ [101,19]; Fluka Nr. 38290, puriss. p.a., >99 %, Sdp.: 83-84 °C; $d = 0,716$ wird unter Argon über Calciumhydrid rückflußgekocht und abdestilliert
- Diisopropylethylamin (DIPEA, Hünigs Base);** $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}$ [129,25]; Fluka Nr. 03440, purum, >98 %, Sdp.: 126-128 °C, $d = 0,755$, wird unter Argon über Calciumhydrid rückflußgekocht und abdestilliert
- 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMTrCl);** $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{ClO}_2$ [338,83]; Merck Schuchardt Nr. 8.18616, zur Synthese
- 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP);** $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$ [122,17]; Fluka Nr. 39405, purum, >98 %, Smp.: 112-113 °C
- N,N*-Dimethylformamid (DMF);** $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ [73,10]; Fluka Nr. 40248, puriss., >99,5 %, über Molekularsieb, Wasser <0,01 %, Sdp.: 153-155 °C, $d = 0,948$
- N,N*-Dimethylformamid (DMF);** $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ [73,10]; Merck Nr. 103053, p.a., min. 99,5 %, Wasser max. 0,1 %, Sdp.: 153 °C, $d = 0,95$
- 1,4-Dioxan;** $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ [88,11]; Riedel-de Haën Nr. 33147, p.a., min. 99,5 %, Wasser max. 0,05 %, Sdp.: 100-102 °C, $d = 1,031-1,034$
- Essigsäure;** $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ [60,05]; Riedel-de Haën Nr. 33209, min. 99,8 %, p.a., $d = 1,05$
- Essigsäureanhydrid;** $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ [102,09]; Fluka Nr. 45830, puriss. p.a., > 99,5 %, Sdp.: 136-138 °C, $d = 1,08$
- Essigsäureethylester;** $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ [88,12]; technische Qualität, Sdp.: 76-77 °C, $d = 0,90$, wird über Kaliumcarbonat destilliert
- Essigsäuremethylester;** $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ [74,08]; Fluka Nr. 45999, >99,8 %, für die HPLC
- Ethanol;** $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ [46,07]; Riedel-de Haën Nr. 32205, >99,8 %, absolut, Sdp.: 78-79 °C, $d = 0,788$
- Ethylendiamin (EDA);** $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$ [60,10]; Fluka Nr. 03550, puriss., >99,5 %, Sdp.: 117-118 °C, $d = 0,895$
- Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat;** $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [372,24]; Fluka Nr. 34539, für Analyse, >99 %
- Ethylenglykol;** $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ [62,07]; Aldrich Nr. 32,455-8, >99 %, Wasser <0,005 %, Smp.: -13 °C, $d = 1,113$
- Formamid;** CH_3NO [45,04]; Fluka Nr. 47670, puriss. p.a., >99 %, Wasser <0,1 %, Sdp.: 81-83 °C, $d = 1,132$
- Harnstoff (Urea);** $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ [60,06]; Fluka Nr. 51456, >99,5 %, für die Molekularbiologie

- Hexamethyldisilazan (HMDS);** $C_6H_{19}NSi_2$ [161,40]; Fluka Nr. 52619, puriss., >99 %, Sdp.: 124-127 °C, $d = 0,774$
- n-Hexan;** C_6H_{14} [86,18]; technische Qualität, Sdp.: 68-70 °C, $d = 0,66$, wird frisch destilliert
- Imidazol;** $C_3H_4N_2$ [68,08]; Fluka Nr. 56750, puriss. p.a., Smp.: 88-91 °C
- Isobuttersäureanhydrid;** $C_8H_{14}O_3$ [158,20]; Fluka Nr. 58390, purum, >98 %, Sdp.: 179-182 °C, $d = 0,953$
- Isopropanol;** C_3H_8O [60,10]; Fluka Nr. 59300, puriss. p.a., >99,5 %, Wasser <0,1 %, Sdp.: 81-83 °C, $d = 0,785$
- Kaliumhydroxid;** KOH [56,11]; Fluka Nr. 60380, purum, Pulver, >85 %, Wasser <15 %
- Kohlendioxid;** CO_2 [44,01]; Messer Griesheim, eingesetzt wie gekauft
- Magnesium;** Mg [24,31]; Fluka Nr. 13110, Späne für Grignard Reaktionen
- Magnesiumsulfat;** $MgSO_4$ [120,37]; Riedel-de Haën Nr. 13143, getrocknet, reinst
- Methanol;** CH_4O [32,04]; technische Qualität, Sdp.: 64,7 °C, wird frisch destilliert
- Methanol;** CH_4O [32,04]; Riedel-de Haën Nr. 32213, p.a., >99,8 %, max. 0,05 % Wasser, Sdp.: 64,7 °C, $d = 0,791$
- N,N'-Methylen-bis-acrylamid;** $C_7H_{10}N_2O_2$ [154,17]; Fluka Nr. 66669, >99 %, für die Elektrophorese
- Natriumborhydrid;** $NaBH_4$ [37,83]; Acros Nr. 18930, Pulver, >98 %, Smp.: 36-37 °C
- Natriumchlorid;** NaCl [58,44]; Merck Nr. 1540, >99,5 %, für die Molekularbiologie
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat;** $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ [156,01]; Merck Nr. 106345, reinst
- Natriumhydrogencarbonat;** $NaHCO_3$ [84,01]; Fluka Nr. 71630, purum p.a., >99 %
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat;** $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ [358,14]; Merck Nr. 106573, kristallin, reinst
- Natriumhydroxid;** NaOH [40,00]; Riedel-de Haën Nr. 06306, microprills, 99 %
- Natrium(meta)periodat;** $NaIO_4$ [213,89]; Fluka Nr. 71860, puriss. p.a., >99,8 %
- Natriumsulfat;** Na_2SO_4 [142,14]; Riedel-de Haën Nr. 13462, trocken, 99 %
- Natriumsulfit;** Na_2SO_3 [126,04]; Fluka Nr. 71991, purum p.a., >97 %,
- Natriumthiosulfat;** $Na_2S_2O_3$ [158,11]; Fluka Nr. 72049, purum p.a., >98 %
- 4-Nitrophenol;** $C_6H_5NO_3$ [139,11]; Fluka Nr. 73550, puriss. p.a., >99 %, Smp.: 112-115 °C, wird bei Bedarf bei 90 °C unter Ölpumpenvakuum frisch sublimiert
- Osmiumtetroxid;** OsO_4 [254,20]; Fluka Nr. 75636, Lösung 2,5 % in *tert*-Butanol
- Petrolether;** technische Qualität, Siedebereich 40-60 °C, wird frisch destilliert
- Phosphorigsäure-mono-(2-cyanethylester)-diisopropylamidchlorid;** $C_9H_{18}ClN_2OP$ [236,68]; Aldrich Nr. 30,230-9, $d = 1,061$
- Phosphorpentoxid;** P_2O_5 [141,94]; Riedel-de Haën Nr. 04113, >98,5 %
- Phosphortrichlorid;** PCl_3 [137,33]; Fluka Nr. 79670, 97 %, Sdp.: 74-78 °C, $d = 1,574$, wird vor Gebrauch unter Argonatmosphäre destilliert
- Pyridin;** C_5H_5N [79,10]; Grüssing Nr. 13057, >99,5 %, Sdp.: 115 °C, $d = 0,978$, Pyridin wird in einer Umlaufapparatur über CaH_2 unter Argonatmosphäre abdestilliert
- Pyridin;** C_5H_5N [79,10]; Fluka Nr. 82704, puriss., >99,8 %, <50 ppm Wasser, über Molekularsieb, Sdp.: 116 °C, $d = 0,983$
- 4-Pyrrolidinopyridin;** $C_9H_{12}N_2$ [148,21]; Fluka Nr. 83275, purum, >98 %, Smp.: 55-57 °C
- Salzsäure;** HCl [36,46]; Riedel-de Haën Nr. 30721, min. 37 %, $d = 1,19$
- Schwefelsäure;** H_2SO_4 [98,08]; Merck Nr. 100731, p.a., 95-97 %, $d = 1,84$
- Taurin;** $C_2H_7NO_3S$ [125,15]; Fluka Nr. 86330, puriss. p.a., >99 %, Smp.: 328-329 °C
- Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF);** $C_{16}H_{36}FN$ [261,47]; Aldrich Nr. 21,614-3, 1M Lösung in THF, $d = 0,903$

- Tetrahydrofuran (THF)**; C_4H_8O [72,11]; Janssen Nr. 16.424.31, p.a., Wasser max. 0,03 %, THF wird in einer Umlaufapparatur über Calciumhydrid abdestilliert
- Tetrakis-(triphenylphosphin)palladium**; $C_{72}H_{60}P_4Pd$ [1155,58]; Fluka Nr. 87645, purum, >97 %, Smp.: >300 °C
- 1H-Tetrazol**; CH_2N_4 [70,05]; Acros Nr. 16.828.47, 98 %, Smp.: 156-158 °C, wird bei Bedarf bei max. 115 °C unter Ölpumpenvakuum frisch sublimiert
- Thymidin**; $C_{10}H_{14}N_2O_5$ [242,23]; Pharma Waldhof Nr. 66013, 99,4 %
- Toluol**; C_7H_8 [92,14]; J. T. Baker Nr. 8077, zur Analyse, Sdp.: 110-112 °C, d = 0,866
- p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat**; $C_7H_8O_3S \cdot H_2O$ [190,22]; Fluka Nr. 89760, puriss., 99 %, Smp.: 103-105 °C
- Tributylamin**; $C_{12}H_{27}N$ [185,36]; Fluka Nr. 90780, puriss. p.a., >99 %, Wasser <0,2 %, Sdp.: 88-90 °C, d = 0,777
- Trichlormethan**; $CHCl_3$ [119,38]; Riedel-de Haën Nr. 32211, p.a., Sdp.: 61 °C, d = 1,48
- Triethylamin (TEA)**; $C_6H_{15}N$ [101,19]; Janssen Nr. 15.791.77, 99 %, Sdp.: 88 °C, d = 0,726, wird unter Argon über Calciumhydrid rückflußgekocht und abdestilliert
- Triethylorthoacetat**; $C_8H_{18}O_3$ [162,23]; Fluka Nr. 75580, purum, >97 %, Sdp.: 142-145 °C, d = 0,889
- Trifluormethansulfonsäure**; $C_2F_6O_5S_2$ [150,07]; Acros Nr. 16989, 99 %, Sdp.: 162 °C, d = 1,6960
- Trimethylchlorsilan**; C_3H_8ClSi [108,64]; Fluka Nr. 92360, puriss., >99 %, Sdp.: 56-57 °C, d = 0,859
- Triphenylphosphin**; $C_{18}H_{15}P$ [262,30]; Fluka Nr. 93092, purum, 97 %, Smp.: 80-84 °C
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)**; $C_4H_{11}NO_3$ [121,14]; Fluka Nr. 93362, >99,8 %, für die Molekularbiologie
- Wasser**; H_2O [18,02]; Riedel-de Haën Nr. 34877, Wasser G, Chromasolv[®], für die Gradientenelution
- Zinkdichlorid**; $ZnCl_2$ [136,29]; Fluka Nr. 31650, für Analyse, >98 %, Smp.: 293 °C

12.1.2 Geräte und Ausrüstung

Analysenwaage	Sartorius Laboratory L 610D
CD-Spektrometer	Jasco J710
DNA-Synthesizer	PerSeptive Biosystems Expedite 8905
IR-Spektrometer	Perkin Elmer 1600 Series FTIR
Kühlzentrifuge	Sigma 3K10
Lyophylle	Christ LDC1
pH-Meter	Knick 761 calimatic
RNA-Synthesizer	Eppendorf D300+
Speed Vac	Savant SC 110
UV-Spektrometer	Varian Cary 1
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Milli-Q mit Organtex-Kartusche

12.1.3 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die analytische DC wurden fertig mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator F₂₅₄ (Schichtdicke 0,2 mm; Merck Nr. 5554) verwendet. Die Platten wurden vor Gebrauch auf eine Größe von 5 x 10 cm zugeschnitten. Alle R_f-Werte wurden bei Kammersättigung gemessen. Die Laufhöhe betrug ca. 8 cm. Die Detektion erfolgte im UV-Licht bei 254 nm. Verbindungen, die eine Dimethoxytritylgruppe tragen, färbten sich beim Überleiten gasförmiger HCl oder beim Erhitzen mit einem Heißluftfön orange. Nicht UV-aktive Cholesterol- und Gallensäurederivate wurden mit Hilfe eines Färbereagenzes sichtbar gemacht. Das Färbereagenz wurde aus 90 ml Ethanol, 5 ml Anisaldehyd, 5 ml konz. Schwefelsäure und 1 ml Essigsäure bereitet. Die DC-Platten wurden nach der Chromatographie mit dem Reagenz bestrichen und mit dem Heißluftfön auf 150 °C erhitzt (Stahl, 1961; Lisboa, 1964). Die Steroide färbten sich dunkel.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Für die präparative Dünnschichtchromatographie (Fliehkraft-Chromatographie) wurde ein Chromatotron der Fa. Harrison Research, Modell 7924T, verwendet. Gipshaltiges Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator PF₂₅₄ (Merck Nr. 7749) wurde in 1 mm, 2 mm und 4 mm Schichtdicke auf Glasplatten mit einem Durchmesser von 20 cm aufgetragen. Unter UV-Detektion bei 254 nm konnten bis zu 1200 mg Rohsubstanz aufgetrennt werden.

Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie)

Substanzgemische wurden durch Flash-Chromatographie bei leichtem Überdruck aufgereinigt (Still, 1978). Als Trennmateriale diente Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 40-63 µm, 230-400 mesh, (Merck Nr. 9385). Die Ermittlung von Chromatographieparametern wie Säulendurchmesser, Füllhöhe oder Fließgeschwindigkeit wurde nach der Gebrauchsanweisung für die Baker Flash-Chromatographie (J.T. Baker) vorgenommen.

Die Trennungen wurden - wie bei den Einzelverbindungen beschrieben - entweder isokratisch oder mit Stufengradienten durchgeführt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Gerät für die RP-HPLC: Merck-Hitachi Anlage bestehend aus: L6220 Intelligent Pump, Mixer, D6000 Interface, L4250 UV-VIS Detector und Computer mit Chromatographie Data Station, Software HPLC-Manager Version 2

- Analytische Säule: LiChrospher RP 18 von Merck; 5 μm ; 125 x 4 mm; Fluß: 0,8 ml/min; Probenschleife: 20 μl
- Analytische Säule: Purospher STAR RP 18 endcapped von Merck; 3 μm ; 55 x 4 mm; Fluß: 0,5 ml/min; Probenschleife: 20 μl
- Semipräparative Säule: LiChrospher RP 18 von Merck; 5 μm ; 250 x 10 mm; Fluß: 4,0 ml/min; Probenschleife: 800 μl
- Semipräparative Säule: POROS R3 Material von PerSeptive Biosystems; 5 μm ; 100 x 10 mm; Fluß: 4,0 ml/min; Probenschleife: 800 μl

Zur Aufreinigung von Oligonukleotiden wurden Gradienten von Acetonitril in 0,1 M wäßrigem Triethylammoniumacetatpuffer (TEAA) pH 6,5 - 7,0 verwendet. Als Laufmittel wurden nur Lösungsmittel des Reinheitsgrads „für die Gradientenelution“ verwendet. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Fluoreszein gelabelte Oligonukleotide wurden parallel zur UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 494 nm detektiert.

Vorschrift zum Ansetzen des TEAA-Puffers: 140 ml (1 mol) Triethylamin wurden unter Eiskühlung mit 200 ml HPLC-Wasser und 58 ml Essigsäure versetzt. Anschließend wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml aufgefüllt, der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit Essigsäure oder Triethylamin auf pH 7,0 eingestellt. Diese Stammlösung wurde vor Gebrauch 1:10 verdünnt und der pH-Wert überprüft.

Gerät für die Normalphasen-HPLC: Merck SepTech

- Präparative Säule: Nucleoprep von Macherey & Nagel; 100-20; 430 x 50 mm; Fluß: 100 ml/min

Die Elutionsmittel zur Trennung von Diastereomeren voll geschützter DNA-Dimere wurden jeweils auf das Trennproblem hin optimiert.

12.1.4 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden auf folgenden Geräten der Firma Bruker aufgenommen:

- Bruker AM 250 für ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und ^{19}F -NMR-Spektren
- Bruker DPX 250 für ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und ^{19}F -NMR-Spektren
- Bruker AM 270 für ^1H -NMR-Spektren
- Bruker AMX 400 für ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und ^{31}P -NMR-Spektren
- Bruker AMX 600 für ROESY-Spektren

Die chemischen Verschiebungen in ppm für ^1H -NMR-Spektren und ^{13}C -NMR-Spektren wurden auf einen internen Standard von Tetramethylsilan, das zuvor dem jeweiligen deuterierten Lösungsmittel zugesetzt wurde, geeicht. Die Verschiebung der ^{31}P -NMR-Signale wurde gegen einen externen Standard von 85 %iger Phosphorsäure angegeben. ^{31}P -NMR-Spektren wurden bei einer Frequenz von 161,98 MHz breitbandenkoppelt aufgenommen. ^1H -NMR-Spektren wurden bei einer Frequenz von 400 MHz, ^{13}C -NMR-Spektren bei einer Frequenz von 100,6 MHz gemessen. Die angegebenen Meßfrequenzen beziehen sich auf Messungen am Gerät Bruker AMX 400. ^{19}F -NMR-Spektren wurden am Gerät Bruker AM 250 bei einer Frequenz von 235,3 MHz aufgenommen. Als externer Standard diente Trichlorfluormethan. Die Temperatur betrug bei allen Messungen 300 K.

12.1.5 Massenspektrometrie (MS)

Massenspektren wurden auf Geräten der Fa. VG-Analytical und VG Biotec (jetzt: Micromass) aufgenommen. Für die Elektrospray-Ionisation stand eine VG Platform II mit Quadrupol Analysator zur Verfügung. Spektren mit matrixunterstützter Laserdesorption / Ionisation (MALDI) wurden auf einem Flugzeitmassenspektrometer (VG Tofspec) entweder im linearen oder im Reflectronmodus gemessen.

12.1.6 Weitere Analyseverfahren

Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden an einem Gerät der Firma Foss-Heraeus (CHN-O-Rapid) durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden an einer Schmelzpunktapparatur nach Dr. Tottoli der Firma Büchi (Büchi 510) bestimmt.

12.2 Einzelverbindungen

12.2.1 Cholsäurederivate

Übersicht:

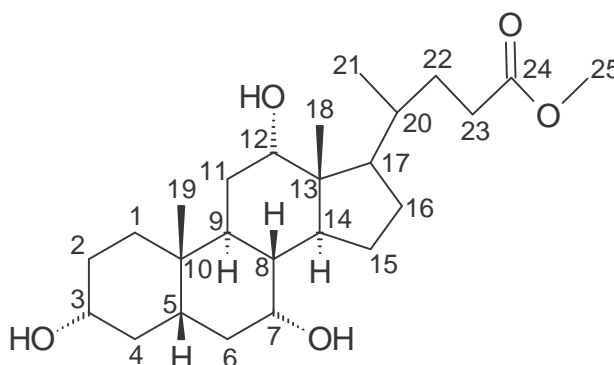
- Cholsäuremethylester **06**
- 3 α ,7 α ,12 α -Triacetylcholsäuremethylester **08**
- 3 α -Hydroxy-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylester **09**
- 3 α -Allylether-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylester **10**
- 3 α -(Ethan-2-yl-1-ether)-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylester **11**
- 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylester **12**
- 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäure **16**
- 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäureallylester **17**
- 3 α -(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy-7 α ,12 α -diacetylcholsäureallylester **19a/b**
- 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxicholsäure **20**
- 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxicholsäureallylester **21**
- 3 α -(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy-7 α ,12 α -dihydroxicholsäureallylester **22a/b**

- 2-Aminoethansulfonsäureethylester **24**
- 3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxytaurocholsäureethylester **25**
- 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxytaurocholsäureethylester **26**
- 3 α -(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy-7 α ,12 α -diacetyltaurocholsäureethylester **27a/b**
- 3 β -Allylether-cholesterol **29**
- 3 β -(Ethan-2-al-1-ether)-cholesterol **30**
- 3 β -(2-Hydroxyethoxy)-cholesterol **31**
- 3 β -[(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy]-cholesterol **32a/b**

Die Zuordnung charakteristischer Protonen in $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erfolgte mit Hilfe von H,H-COSY-Experimenten. Die Zuordnung der Kohlenstoffatome erforderte die Aufnahme von HSQC- bzw. DEPT 90- und DEPT 135-Experimenten. Zur Auswertung der NMR-Spektren wurde außerdem das Computerprogramm SpecInfo 3.2 verwendet. Auch literaturbekannte NMR-Daten von strukturell verwandten Gallensäure- und Cholesterolderivaten wurden zur exakten Zuordnung herangezogen (Baker, 1975; Iida, 1986; Goto, 1987; Wollborn, 1991; Niwa, 1992; Liu, 1995; Dayal, 1996; Gao, 1997).

Cholsäuremethylester **06**

Literatur: Morsman, 1936; Cortese, 1937; Grand, 1945; Fieser, 1949; Fieser, 1952; Iida, 1986



$\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_5$ [422,61]

In einem 500 ml Rundkolben wurden 21,25 g (52 mmol) Cholsäure unter leichtem Erwärmen in 200 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 5,5 ml konz. Salzsäure wurde für 20 h bei RT gerührt. Eine DC-Kontrolle zeigte, daß die Veresterung vollständig war. Da beim Abkühlen auf -20 °C keine Fällung einsetzte, wurde der Ansatz auf 50 ml eingeeengt und mit 200 ml Ether versetzt. Die organische Phase wurde zweimal mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingeeengt. Der resultierende weiße Schaum wurde unter Erwärmen in 100 ml Toluol gelöst. Zum Entfernen von Wasser wurde auf 30 ml eingeeengt und anschließend wurden 300 ml Ether zugesetzt. Das Produkt wurde über Nacht bei 4 °C gefällt. Nach dem Abfiltrieren wurde mit wenig kaltem Ether gewaschen und unter Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 19,62 g (46,4 mmol, 89 %) weißer Schaum

Schmelzpkt.: 154 - 155 °C Lit.: 155 - 156 °C (Cortese, 1937)

¹H-NMR: 250 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm: 4.31 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 4.2 Hz, OH-3α), 4.11 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, OH-12α), 4.00 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, OH-7α), 3.77 (m, 1 H, H-12β), 3.61 (m, 1 H, H-7β), 3.57 (s, 3 H, O-CH₃), 3.18 (m, 1 H, H-3β), 2.32-1.01 (24 H), 0.92 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, H-21), 0.80 (s, 3 H, H-19), 0.58 (s, 3 H, H-18)

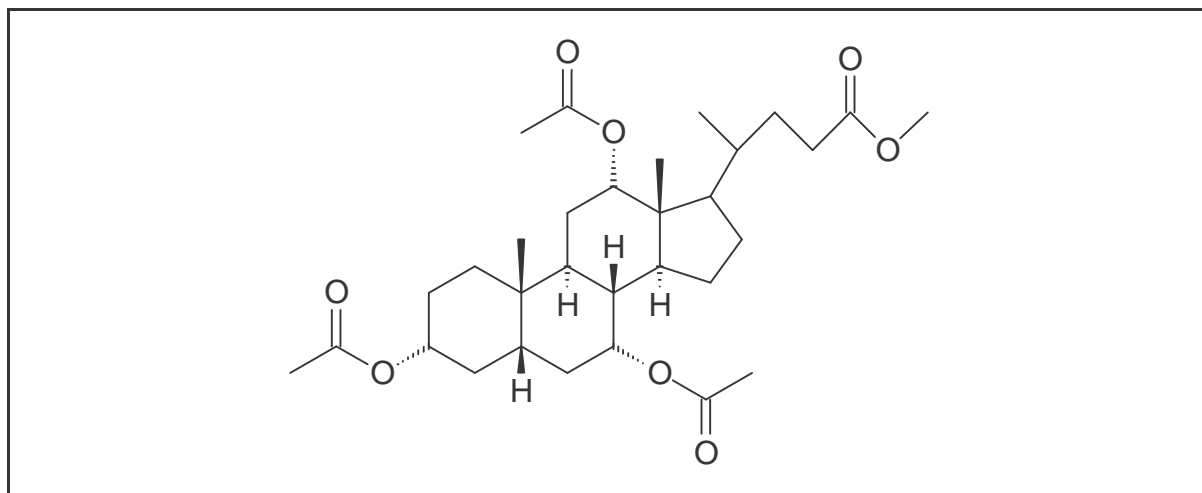
¹³C-NMR: 62.9 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm: 173.8 (C-24), 71.0 (C-12), 70.4 (C-3), 66.2 (C-7), 51.2 (C-25), 46.0 (C-17), 45.7 (C-13), 41.5 (C-5), 41.3 (C-14), 39.6 (C-4), 39.5 (C-8), 35.3 (C-1), 35.0 (C-20), 34.9 (C-6), 34.4 (C-10), 30.7 (C-23), 30.5 (C-22), 30.5 (C-2), 28.5 (C-11), 27.3 (C-16), 26.2 (C-9), 22.7 (C-15), 22.6 (C-19), 16.9 (C-21), 12.3 (C-18)

Elementaranalyse: berechnet: C 71,05 % H 10,02 %

gefunden: C 71,28 % H 9,83 %

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,38

ESI-MS [2M+NH₄]⁺: 2m/z 863,0

3 α ,7 α ,12 α -Triacetylcholsäuremethylester 08**Literatur:** Wieland, 1932; Plattner, 1944; Grand, 1945; Höfle, 1972; Höfle, 1978**C₃₁H₄₈O₈ [548,72]**

19,09 g (45,2 mmol) des Cholsäuremethylesters 06 wurden in 400 ml Dichlormethan gelöst und mit 3,35 g (22,6 mmol) 4-Pyrrolidinopyridin versetzt. Danach wurden 31,4 ml (226 mmol) Triethylamin und 17,1 ml (181 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben und es wurde für 18 h bei RT gerührt. Mittels DC konnte der Grad der Acetylierung verfolgt werden. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 ml Methanol abgebrochen und die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde in 200 ml Ether gelöst und die Etherphase je zweimal mit 2N HCl-Lösung und 5 %iger NaHCO₃-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde die organische Phase zu einem weißen Schaum eingengt, der nicht weiter aufgereinigt werden mußte.

Ausbeute: 24,60 g (44,8 mmol, 99 %) weißer Schaum**Schmelzpkt.:** 51 - 52 °C

Lit.: 49 - 51 °C (Höfle, 1972)

¹H-NMR: 250 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm: 4.96 (m, 1 H, H-12 β), 4.78 (m, 1 H, H-7 β), 4.57 (m, 1 H, H-3 β), 3.56 (s, 3 H, O-CH₃), 2.36-0.98 (24 H), 2.06, 2.00, 1.98 (3s, je 3 H, 3 x CH₃-Acetyl), 0.89 (s, 3 H, H-19), 0.73 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, H-21), 0.69 (s, 3 H, H-18)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 5.08 (m, 1 H, H-12 β), 4.90 (m, 1 H, H-7 β), 4.45 (m, 1 H, H-3 β), 3.65 (s, 3 H, O-CH $_3$), 2.40-1.00 (24 H), 2.13, 2.08, 2.04 (3s, je 3 H, 3 x CH $_3$ -Acetyl), 0.91 (s, 3 H, H-19), 0.80 (d, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, H-21), 0.72 (s, 3 H, H-18)

$^{13}\text{C-NMR}$: 62.9 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 174.5 (C-24), 170.5 (2 C, C=O-7 α und 12 α), 170.4 (C=O-3 α), 75.4 (C-12), 74.1 (C-3), 70.7 (C-7), 51.5 (O-CH $_3$), 47.4 (C-17), 45.1 (C-13), 43.4 (C-14), 41.0 (C-5), 37.8 (C-8), 34.7 (C-20), 34.6 (C-4), 34.6 (C-1), 34.3 (C-10), 31.3 (C-6), 30.9 (C-22), 30.8 (C-23), 28.9 (C-9), 27.2 (C-16), 26.9 (C-2), 25.6 (C-11), 22.8 (C-15), 22.6 (C-19), 21.6, 21.5, 21.4 (3 C, 3 x CH $_3$ -Acetyl), 17.5 (C-21), 12.2 (C-18)

Elementaranalyse: berechnet: C 67,86 % H 8,82 %

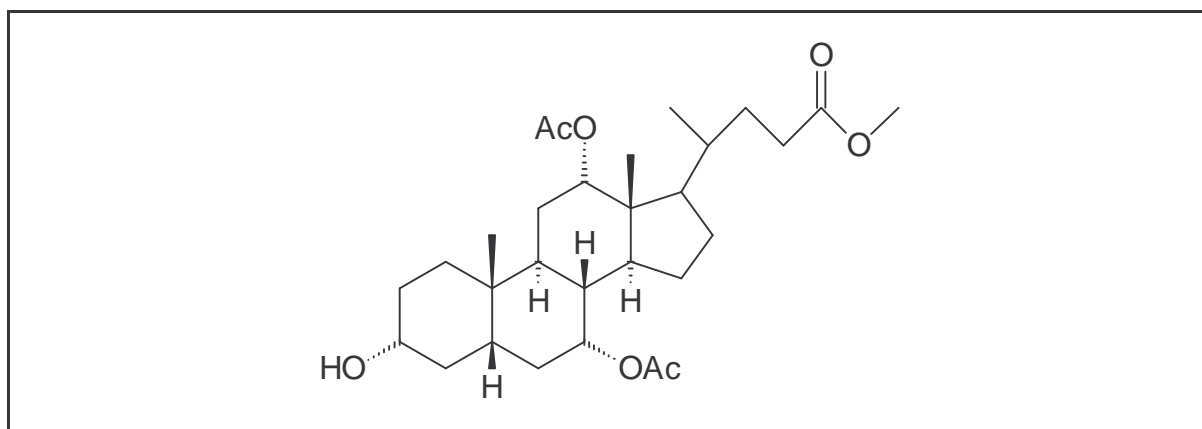
gefunden: C 67,88 % H 8,81 %

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95:5) = 0,77

ESI-MS $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: m/z 566,7

7 α ,12 α -Diacetylcholsäuremethylester 09

Literatur: Dias, 1977; Gao, 1997



$\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_7$ [506,68]

23,59 g (43,0 mmol) des 3 α ,7 α ,12 α -Triacetylcholsäuremethylesters **08** wurden in 220 ml trockenem Methanol gelöst. Nach Zugabe von 15,3 ml (215 mmol) Acetylchlorid wurde die Verseifung regelmäßig dünnschichtchromatographisch überprüft. Nach einer Stunde war die 3 α -Hydroxylfunktion vollständig entschützt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktion durch vorsichtige Zugabe von 220 ml 5 %iger NaHCO_3 -Lösung abgebrochen. Man rührte 15 min nach und engte die Lösung am Rotationsverdampfer auf etwa 150 ml ein. Das Re-

aktionsgemisch wurde in einen Scheidetrichter überführt und dreimal mit Ether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden noch einmal mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Das weiße Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 0 % bis 6 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 20,93 g (41,3 mmol, 96 %) weißer Schaum

Schmelzpkt.: 65 - 66 °C Lit.: 71 - 75 °C (Dias, 1977)

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 5.05 (m, 1 H, H-12β), 4.87 (m, 1 H, H-7β), 3.63 (s, 3 H, O-CH₃), 3.47 (m, 1 H, H-3β), 2.35-0.93 (24 H), 2.09, 2.05 (2s, je 3 H, 2 x CH₃-Acetyl), 0.88 (s, 3 H, H-19), 0.78 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, H-21), 0.70 (s, 3 H, H-18)

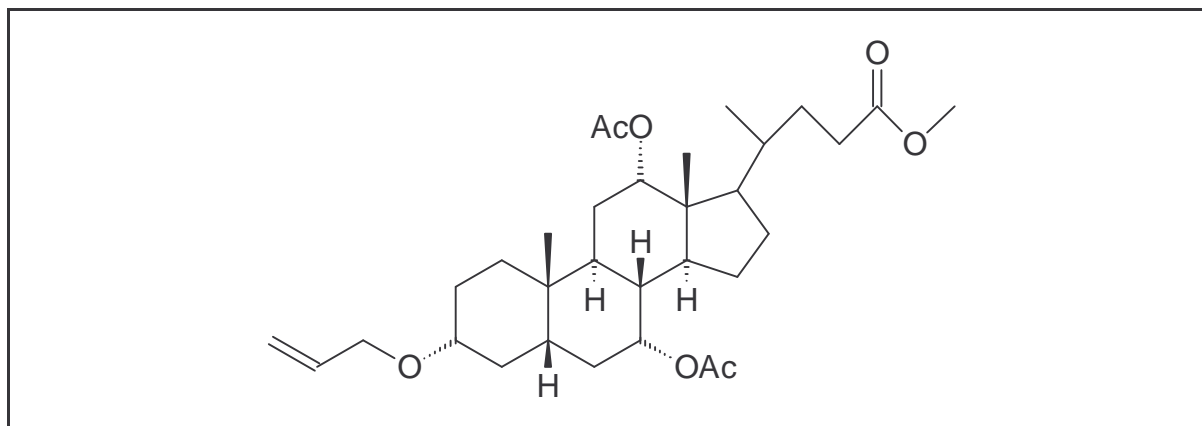
¹³C-NMR: 100.6 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 174.5 (C-24), 170.6 und 170.5 (2 C, C=O-7α und C=O-12α), 75.4 (C-12), 71.6 (C-3), 70.8 (C-7), 51.5 (O-CH₃), 47.3 (C-17), 45.0 (C-13), 43.4 (C-14), 41.0 (C-5), 38.6 (C-8), 37.7 (C-4), 34.8 (C-20), 34.6 (C-1), 34.2 (C-10), 31.3 (C-6), 30.8 (C-22), 30.7 (C-23), 30.4 (C-2), 28.9 (C-9), 27.1 (C-16), 25.5 (C-11), 22.8 (C-15), 22.5 (C-19), 21.6, 21.4 (2 C, 2 x CH₃-Acetyl), 17.5 (C-21), 12.2 (C-18)

Elementaranalyse: berechnet: C 68,75 % H 9,15 %

gefunden: C 68,50 % H 9,22 %

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95:5) = 0,37

ESI-MS [M+NH₄]⁺: m/z 524,6

3 α -Allylether-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylester 10**Literatur:** Wess, 1992

20,44 g (40,3 mmol) des 7 α ,12 α -Diacetylcholsäuremethylesters 09 wurden in einem 11-Rundkolben mit Rückflußkühler in 400 ml trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von 137 ml (807 mmol) DIPEA und 68 ml (807 mmol) Allylbromid wurde 18 h bei 120 °C gerührt. Die DC ergab fast vollständige Umsetzung. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der verbleibende tiefbraune Rückstand wurde in 300 ml Ether aufgenommen und in einen Scheidetrichter überführt. Die Etherphase wurde dreimal mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung und zweimal mit 5 %iger Na₂SO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden dreimal mit Ether reextrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten Etherphasen über Natriumsulfat wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das resultierende zähe Harz wurde durch Chromatographie an Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von 2 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 19,61 g (35,9 mmol, 89 %) glasiges, zähes Harz

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 5.93 (ddt, 1 H, ³J_{H,H} = 17.1 Hz und 10.4 Hz und 5.6 Hz, O-CH₂-CH=CH₂), 5.27 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 17.2 Hz, *trans*-O-CH₂-CH=CH₂), 5.16 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 10.3 Hz, *cis*-O-CH₂-CH=CH₂), 5.07 (m, 1 H, H-12 β), 4.89 (m, 1 H, H-7 β), 4.02 und 4.01 (2d, 2 H, ³J_{H,H} = je 5.4 Hz, O-CH₂-CH=CH₂), 3.66 (s, 3 H, O-CH₃), 3.15 (m, 1 H, H-3 β), 2.38-0.92 (24 H), 2.13, 2.08 (2s, je 3 H, 2 x CH₃-Acetyl), 0.90 (s, 3 H, H-19), 0.80 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, H-21), 0.72 (s, 3 H, H-18)

^{13}C -NMR: 100.6 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 174.4 (C-24), 170.6 und 170.5 (2 C, C=O-7 α und C=O-12 α), 135.3 (O-CH₂-CH=CH₂), 116.5 (O-CH₂-CH=CH₂), 78.8 (C-3), 75.3 (C-12), 70.7 (C-7), 69.2 (O-CH₂-CH=CH₂), 51.4 (O-CH₃), 47.2 (C-17), 45.0 (C-13), 43.3 (C-14), 41.1 (C-5), 37.7 (C-8), 35.6 (C-4), 34.9 (C-1), 34.6 (C-20), 34.5 (C-10), 31.4 (C-6), 30.8 (C-22), 30.7 (C-23), 28.9 (C-9), 27.3 (C-16), 27.1 (C-2), 25.5 (C-11), 22.7 (C-15), 22.5 (C-19), 21.6, 21.4 (2 C, 2 x CH₃-Acetyl), 17.4 (C-21), 12.1 (C-18)

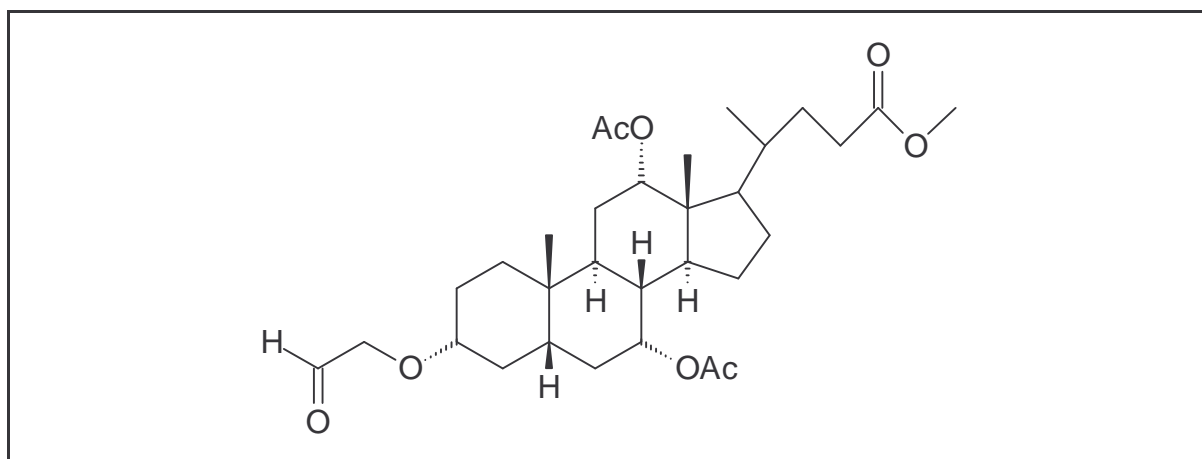
DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95:5) = 0,62

DC: R_f (Toluol/Essigester 2:1) = 0,45

ESI-MS [M+NH₄]⁺: m/z 564,6

3 α -(Ethan-2-yl-1-ether)-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylester 11

Literatur: Pappo, 1956; Schröder, 1980; Choi, 1992; Kraus, 1992; Wess, 1992



$\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_8$ [548,72]

6,48 g (11,9 mmol) des 3 α -Allylether-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylesters 10 wurden in 75 ml THF gelöst und mit 25 ml Wasser versetzt. Zu der einphasigen, klaren Lösung wurden 2,4 ml (237 μmol) einer 2,5 %igen Lösung von Osmiumtetroxid gelöst in *tert*-Butanol zugegeben und eine Stunde bei RT gerührt. Dabei färbte sich die Lösung durch reduziertes Osmiumtetroxid schwarz. Unter starkem Rühren wurden innerhalb von 2 h 6,34 g (29,6 mmol) Natrium(meta)periodat portionsweise zugegeben, wobei die Dunkelfärbung verschwand und sich ein voluminöser, weißer Niederschlag bildete. Unter DC-Kontrolle rührte der Ansatz nach beendeter Zugabe noch 3 h nach. Zur Aufarbeitung wurde der Niederschlag über eine Fritte abgetrennt und mehrmals mit Dichlormethan gewaschen. Das

Filtrat wurde in einen Scheidetrichter überführt und solange mit Dichlormethan und gesättigter NaHCO_3 -Lösung versetzt, bis eine Phasentrennung erfolgte. Die wäßrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je einmal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie an Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von Toluol/Essigester = 2:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 4,66 g (8,53 mmol, 72 %) weißer Schaum

Schmelzpkt.: 72 - 78 °C

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 9.73 (s, 1 H, CHO), 5.08 (m, 1 H, H-12 β), 4.90 (m, 1 H, H-7 β), 4.14 (m, 2 H, O-CH₂-CHO), 3.66 (s, 3 H, O-CH₃), 3.17 (m, 1 H, H-3 β), 2.41-0.95 (24 H), 2.14, 2.09 (2s, je 3 H, 2 x CH₃-Acetyl), 0.91 (s, 3 H, H-19), 0.81 (d, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, H-21), 0.73 (s, 3 H, H-18)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100.6 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 200.6 (O-CH₂-CHO), 174.3 (C-24), 170.6 und 170.5 (2 C, C=O-7 α und C=O-12 α), 80.7 (C-3), 75.2 (C-12), 74.1 (O-CH₂-CHO), 70.5 (C-7), 51.3 (O-CH₃), 47.2 (C-17), 44.9 (C-13), 43.2 (C-14), 40.9 (C-5), 37.6 (C-8), 35.2 (C-4), 34.6 (C-1), 34.4 (C-20), 34.4 (C-10), 31.2 (C-6), 30.7 (C-22), 30.6 (C-23), 28.8 (C-9), 27.0 (C-16), 27.0 (C-2), 25.4 (C-11), 22.6 (C-15), 22.4 (C-19), 21.5, 21.3 (2 C, 2 x CH₃-Acetyl), 17.3 (C-21), 12.0 (C-18)

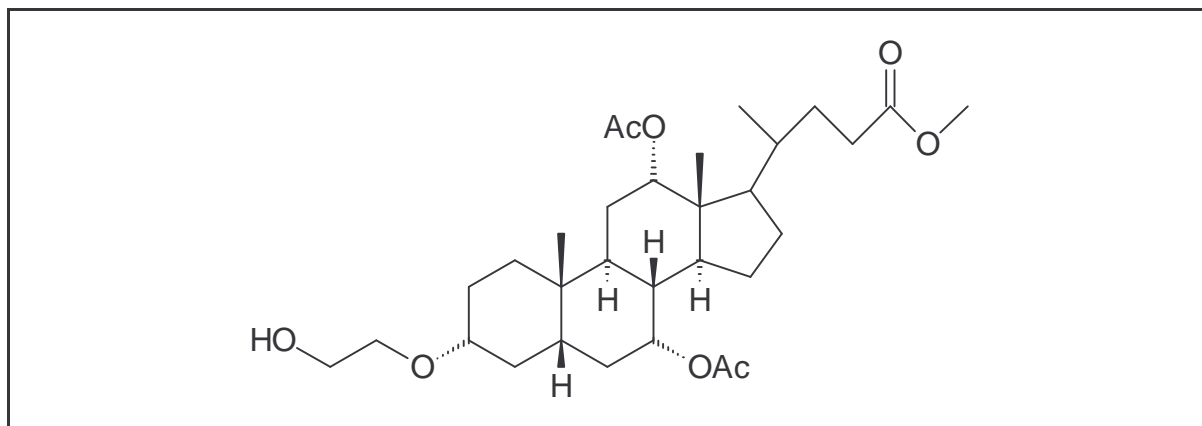
Elementaranalyse: berechnet: C 67,86 % H 8,82 %

gefunden: C 67,61 % H 8,79 %

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95:5) = 0,45

DC: R_f (Toluol/Essigester 2:1) = 0,19

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 547,5

3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylester 12**Literatur:** Brown, 1979b; Cobb, 1991; Wess, 1992**C₃₁H₅₀O₈ [550,73]**

4,53 g (8,3 mmol) des Aldehyds 11 wurden in 300 ml THF/Methanol (4:1) gelöst und mit Eis auf 4 °C gekühlt. Es wurden 156 mg (4,1 mmol) Natriumborhydrid zugegeben und unter Rühren ließ man das Reaktionsgemisch auf RT erwärmen. Nach 7 h Rühren unter DC-Kontrolle wurde die Reaktionslösung mit Ether in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wurde zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden zweimal mit Ether reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingengt. Zur Entfernung von Wasser wurde der Rückstand nochmals in Ether aufgenommen, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und wiederum am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie an Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von Toluol/Essigester = 1:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 4,15 g (7,54 mmol, 91 %) weißer Schaum**Schmelzpkt.:** 66 - 69 °C

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 5.05 (m, 1 H, H-12 β), 4.87 (m, 1 H, H-7 β), 3.70 (t, 2 H, O-CH₂-CH₂OH), 3.63 (s, 3 H, O-CH₃), 3.55 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂OH), 3.12 (m, 1 H, H-3 β), 2.36-0.91 (24 H), 2.11, 2.06 (2s, je 3 H, 2 x CH₃-Acetyl), 0.88 (s, 3 H, H-19), 0.78 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, H-21), 0.70 (s, 3 H, H-18)

^{13}C -NMR: 100.6 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 174.5 (C-24), 170.6 und 170.5 (2 C, C=O-7 α und C=O-12 α), 79.8 (C-3), 75.4 (C-12), 70.8 (C-7), 69.2 (O-CH $_2$ -CH $_2$ OH), 62.0 (O-CH $_2$ -CH $_2$ OH), 51.5 (O-CH $_3$), 47.3 (C-17), 45.1 (C-13), 43.4 (C-14), 41.1 (C-5), 37.8 (C-8), 35.6 (C-4), 34.9 (C-1), 34.6 (C-20), 34.5 (C-10), 31.4 (C-6), 30.8 (C-22), 30.7 (C-23), 29.0 (C-9), 27.4 (C-16), 27.1 (C-2), 25.6 (C-11), 22.8 (C-15), 22.6 (C-19), 21.6, 21.5 (2 C, 2 x CH $_3$ -Acetyl), 17.5 (C-21), 12.2 (C-18)

Elementaranalyse: berechnet: C 67,61 % H 9,15 %

gefunden: C 67,73 % H 9,29 %

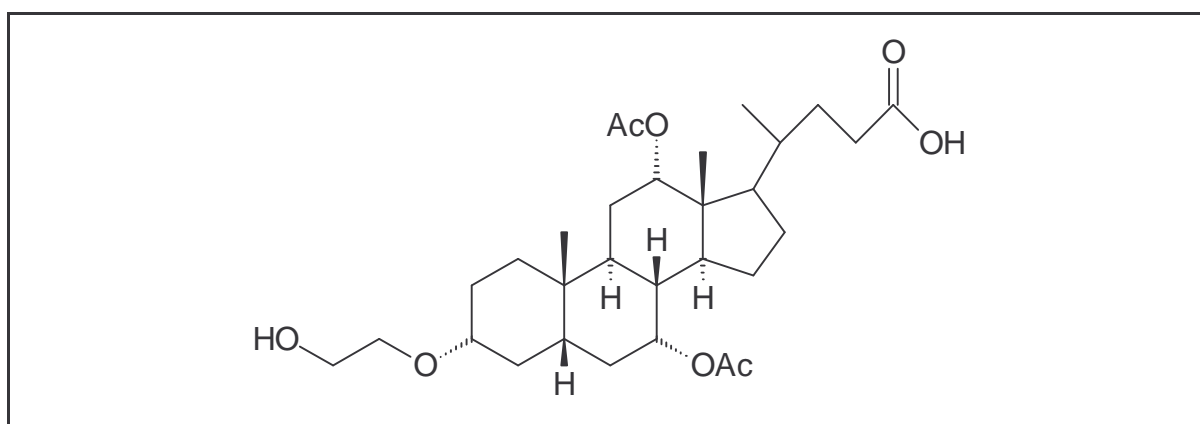
DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95:5) = 0,21

DC: R_f (Toluol/Essigester 1:1) = 0,11

ESI-MS [M+NH $_4$] $^+$: m/z 568,5

3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäure **16**

Literatur: Knowles, 1942; Wess, 1992



$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_8$ [536,71]

1,63 g (2,96 mmol) 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylester **12** wurden in 15 ml Acetonitril gelöst und mit 10 ml einer 0,5 M wässrigen Kaliumhydroxid-Lösung versetzt. Da eine DC-Kontrolle keine Umsetzung ergab, wurden nach 30 min 10 ml der basischen Lösung nachdosiert. Ebenso wurde nach 90 und 120 min verfahren. Nach 150 min war die Verseifung des Methylrestes vollständig. Es wurden 50 ml Wasser zugegeben und mit verdünnter Salzsäure auf pH 4-5 angesäuert. Die wässrige Phase wurde in einen Scheidetrichter überführt und dreimal mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser neutral gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet

und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit einem isokratischen Eluenten von 3 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 0,63 g (1,17 mmol, 40 %) weißer Feststoff

Schmelzpkt.: 90 - 93 °C

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 5.07 (m, 1 H, H-12β), 4.90 (m, 1 H, H-7β), 3.75-3.68 (t, 2 H, O-CH₂-CH₂OH), 3.61-3.56 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂OH), 3.15 (m, 1 H, H-3β), 2.46-0.95 (24 H), 2.14, 2.09 (2s, je 3 H, 2 x CH₃-Acetyl), 0.91 (s, 3 H, H-19), 0.82 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, H-21), 0.73 (s, 3 H, H-18)

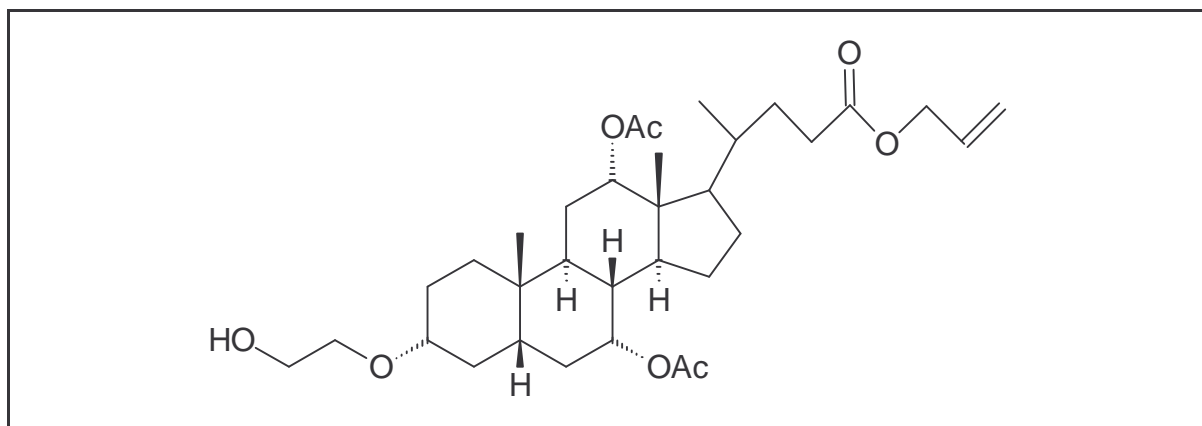
¹³C-NMR: 100.6 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 179.1 (C-24), 170.7 und 170.6 (2 C, C=O-7α und C=O-12α), 79.9 (C-3), 75.4 (C-12), 70.8 (C-7), 69.3 (O-CH₂-CH₂OH), 61.9 (O-CH₂-CH₂OH), 47.3 (C-17), 45.1 (C-13), 43.4 (C-14), 41.1 (C-5), 37.7 (C-8), 35.6 (C-4), 34.8 (C-1), 34.6 (C-20), 34.5 (C-10), 31.4 (C-6), 30.7 (C-22), 30.5 (C-23), 29.0 (C-9), 27.3 (C-16), 27.1 (C-2), 25.6 (C-11), 22.8 (C-15), 22.6 (C-19), 21.6, 21.5 (2 C, 2 x CH₃-Acetyl), 17.4 (C-21), 12.2 (C-18)

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,46

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 535,5

3α-(2-Hydroxyethoxy)-7α,12α-diacetylcholsäureallyylester 17

Literatur: Jansen, 1990; Schummer, 1992



C₃₃H₅₂O₈ [576,77]

In einem 100 ml Schlenckkolben wurden 490 mg (913 μmol) 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäure **16** unter Argon in 40 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nacheinander wurden 1,55 ml (9,13 mmol) frisch destilliertes DIPEA und 1,16 ml (13,7 mmol) frisch destilliertes Allylbromid zugegeben. Nach 20 h Rühren bei RT zeigte die DC vollständige Umsetzung. Nach dem Abdestillieren der Lösungsmittel wurde der Rückstand in Ether gelöst und in einen Scheidetrichter überführt. Die Etherphase wurde einmal mit 1N-Salzsäure und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit einem isokratischen Eluenten von 2 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 390 mg (676 μmol , 74 %) weißer Schaum

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 5.91 (ddt, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 17.1$ Hz und 10.4 Hz und 5.7 Hz, O-CH₂-CH=CH₂), 5.30 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 17.2$ Hz, *trans*-O-CH₂-CH=CH₂), 5.23 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 10.4$ Hz, *cis*-O-CH₂-CH=CH₂), 5.07 (m, 1 H, H-12 β), 4.89 (m, 1 H, H-7 β), 4.56 (d, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, O-CH₂-CH=CH₂), 3.74-3.70 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂OH), 3.60-3.55 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂OH), 3.15 (m, 1 H, H-3 β), 2.44-0.96 (24 H), 2.13, 2.08 (2s, je 3 H, 2 x CH₃-Acetyl), 0.91 (s, 3 H, H-19), 0.81 (d, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, H-21), 0.73 (s, 3 H, H-18)

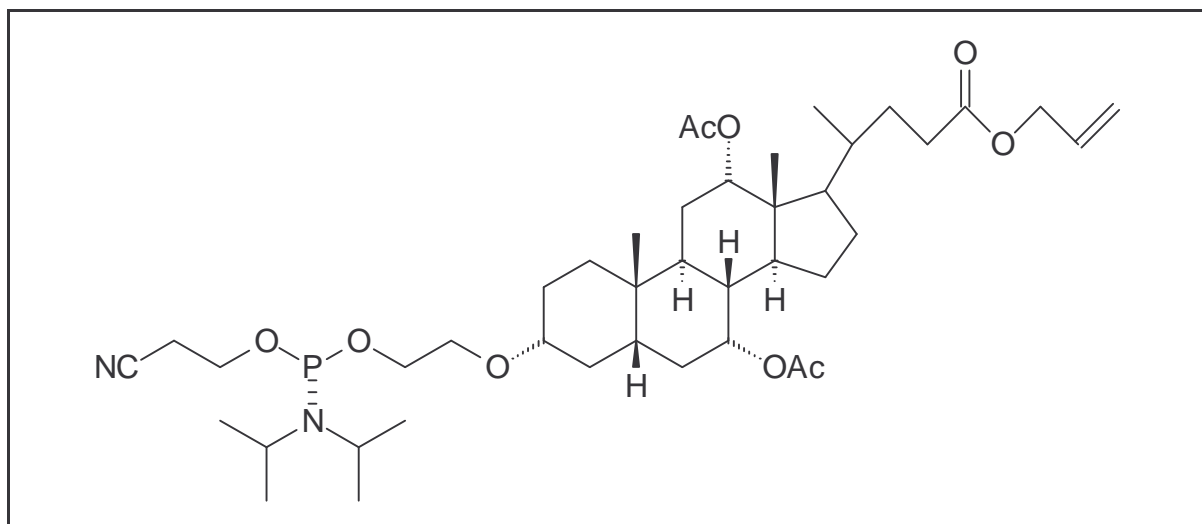
$^{13}\text{C-NMR}$: 62.9 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 174.4 (C-24), 170.7 und 170.6 (2 C, C=O-7 α und C=O-12 α), 132.3 (O-CH₂-CH=CH₂), 118.3 (O-CH₂-CH=CH₂), 79.5 (C-3), 75.3 (C-12), 70.5 (C-7), 69.2 (O-CH₂-CH₂OH), 64.8 (O-CH₂-CH=CH₂), 61.7 (O-CH₂-CH₂OH), 47.2 (C-17), 44.9 (C-13), 43.1 (C-14), 41.1 (C-5), 37.6 (C-8), 35.6 (C-4), 34.8 (C-1), 34.6 (C-20), 34.5 (C-10), 31.3 (C-6), 30.5 (C-22), 30.4 (C-23), 28.8 (C-9), 27.3 (C-16), 27.1 (C-2), 25.4 (C-11), 22.7 (C-15), 22.3 (C-19), 21.6, 21.5 (2 C, 2 x CH₃-Acetyl), 17.3 (C-21), 12.1 (C-18)

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,66

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 577,6

3 α -[(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy]-7 α ,12 α -diacetylcholsäureallylester **19a/b**

Literatur: Beaucage, 1981; Sinha, 1983; McBride, 1983



$C_{42}H_{69}N_2O_9P$ [776,99]

390 mg (676 μ mol) 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäureallylester **17** wurden in einen ausgeheizten 50 ml Schlenckkolben eingewogen und über Nacht im Exsikkator im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon wurde der Allylester **17** in 15 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Danach wurden 460 μ l (2,71 mmol) DIPEA zugegeben und 226 μ l (1014 μ mol) (Chloro-2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **18a/b** tropfenweise innerhalb von 15 min zugesetzt. Nach 90 min Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter überführt und einmal rasch mit 5 %iger $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde sofort über Magnesiumsulfat abfiltriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit einem Stufengradienten von 2 % bis 20 % Aceton in Dichlormethan aufgereinigt. Das isolierte klare Öl wurde analysiert und bei -20 °C gelagert.

Ausbeute: >90 % aller phosphorhaltigen Produkte

1H -NMR: 250 MHz, $CDCl_3$, δ in ppm: 5.93 (ddt, je 1 H, $^3J_{H,H} = 17.1$ Hz und 10.4 Hz und 5.6 Hz, O-CH₂-CH=CH₂), 5.30 (dd, je 1 H, $^3J_{H,H} = 17.3$ Hz, *trans*-O-CH₂-CH=CH₂), 5.16 (dd, je 1 H, $^3J_{H,H} = 10.3$ Hz, *cis*-O-CH₂-CH=CH₂), 5.07 (m, je 1 H, H-12 β), 4.88 (m,

je 1 H, H-7 β), 4.56 (m, je 2 H, $^3J_{H,H} = 5.7$ Hz, O-CH₂-CH=CH₂), 3.91-3.75 (m, je 4 H, O-CH₂-CH₂OP und NC-CH₂-CH₂OP), 3.68-3.55 (m, je 4 H, O-CH₂-CH₂OP und 2 x CH-Isopropyl), 3.15 (m, je 1 H, H-3 β), 2.64 (t, je 2 H, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz und $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, NC-CH₂-CH₂OP), 2.45-0.93 (je 24 H), 2.13, 2.08 (2s, je 6 H, 2 x CH₃-Acetyl), 1.19, 1.19, 1.17, 1.17 (4d, je 12 H, $^3J_{H,H} =$ je 6.8 Hz, 4 x CH₃-Isopropyl), 0.90 (s, je 3 H, H-19), 0.81 (d, je 3 H, $^3J_{H,H} = 6.1$ Hz, H-21), 0.72 (s, je 3 H, H-18)

$^{31}\text{P-NMR}$: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 148.9 und 148.8

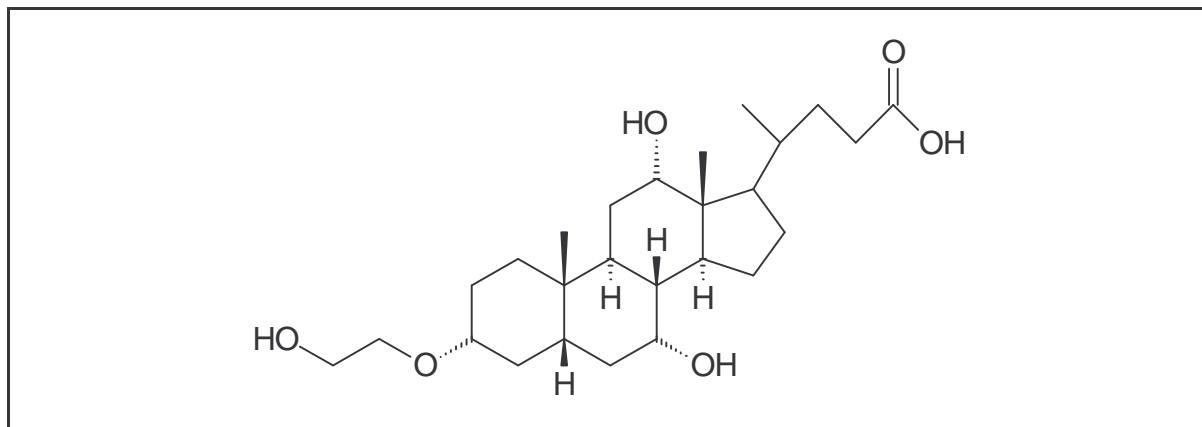
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

DC: R_f (Dichlormethan/Aceton 8:2) = 0,77

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 777,7

3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxycholsäure 20

Literatur: Knowles, 1942; Wess, 1992



$\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_6$ [452,63] $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_6 \cdot \text{CHCl}_3$ [572,01]

In einem 500 ml Rundkolben mit Rückflußkühler wurden 4,15 g (7,54 mmol) 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -diacetylcholsäuremethylester 12 in 250 ml trockenem Methanol gelöst und mit 28 ml (~150 mmol) einer 5,4 M Natriummethanolat-Lösung versetzt. Unter DC-Kontrolle wurde 5 h zum Rückfluß erhitzt. Es wurden 10 ml (~50 mmol) der 5,4 M Natriummethanolat-Lösung nachdosiert und eine weitere Stunde refluxiert, bis die Acetyl-schutzgruppen vollständig abgespalten waren. Dem Reaktionsgemisch wurden 10 ml Wasser zugesetzt und es wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach vollständiger Verseifung des

Methylesters wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde in 100 ml heißem Wasser vollständig gelöst und durch Zugabe von halbkonz. Salzsäure auf pH = 1 gebracht. Dabei fiel eine ölige, weiße Substanz aus. Die Wasserphase wurde in einen Scheidetrichter überführt und der ölige Niederschlag durch fünfmaliges Ausschütteln mit heißem Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und heiß abfiltriert. Nach dem Evaporieren der Lösungsmittel wurden 3,70 g des rohen Cholsäurederivats erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation aus 100 ml Chloroform bei 4 °C über Nacht aufgereinigt. Die reine Säure wurde in Form eines amorphen, weißen Pulvers als 1:1 Chloroform-Addukt erhalten.

Ausbeute: 3,46 g (6,05 mmol, 80 %) amorpher weißer Feststoff

Schmelzpkt.: 163 - 165 °C Lit.: 183 - 185 °C (Wess, 1992)

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm: 11.91 (b, 1 H, COOH), 4.50 (b, 1 H, O-CH₂-CH₂OH), 4.10 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, OH-12α), 4.01 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, OH-7α), 3.78 (m, 1 H, H-12β), 3.61 (m, 1 H, H-7β), 3.45-3.36 (m, je 2 H, O-CH₂-CH₂OH und O-CH₂-CH₂OH), 3.04 (m, 1 H, H-3β), 2.29-1.04 (24 H), 0.92 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, H-21), 0.82 (s, 3 H, H-19), 0.58 (s, 3 H, H-18)

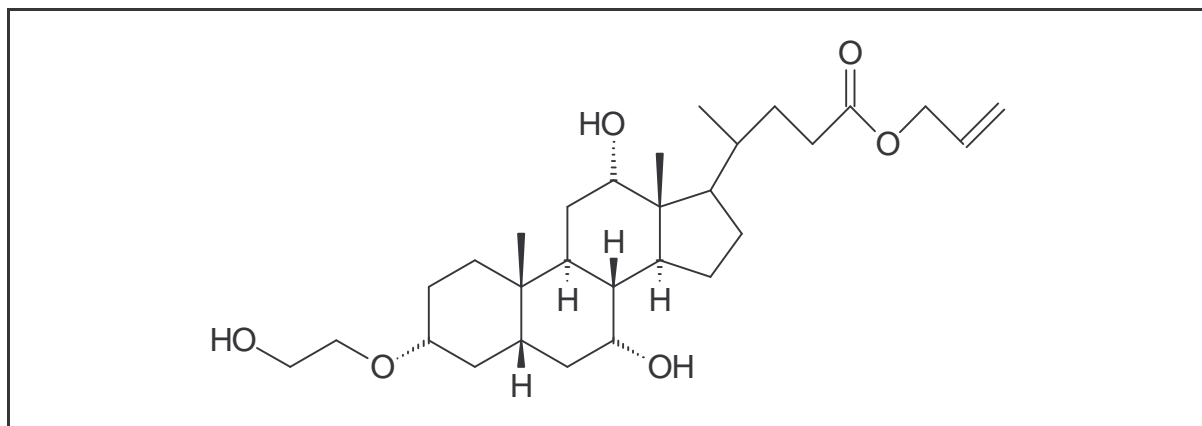
¹³C-NMR: 100.6 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm: 174.5 (C-24), 78.3 (C-3), 70.5 (C-12), 68.4 (O-CH₂-CH₂OH), 65.7 (C-7), 60.3 (O-CH₂-CH₂OH), 45.6 (C-17), 45.3 (C-13), 40.8 (C-5), 40.8 (C-14), 39.3 (C-8), 38.4 (C-4), 35.5 (C-1), 34.6 (C-20), 34.3 (C-6), 34.1 (C-10), 30.4 (C-23), 30.3 (C-22), 28.0 (C-11), 26.8 (C-2), 26.3 (C-16), 25.5 (C-9), 22.3 (C-15), 22.1 (C-19), 16.5 (C-21), 11.8 (C-18)

Elementaranalyse: berechnet: C 56,69 % H 7,93 %

gefunden: C 56,67 % H 7,91 %

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,13

ESI-MS [M-H]: m/z 451,5

3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxycholsäureallylester 21**Literatur:** Morsman, 1936; Cortese, 1937; Grand, 1945; Fieser, 1949; Fieser, 1952**C₂₉H₄₈O₆ [492,70]**

In einem 100 ml Schlenckkolben wurden 572 mg (1,0 mmol) 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxycholsäure 20 in 30 ml frisch destilliertem Allylalkohol gelöst. Nach Zugabe von 1,0 ml konz. Salzsäure wurde für 20 h bei RT gerührt. Eine DC-Kontrolle zeigte, daß die Veresterung vollständig war. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch vorsichtig mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung neutralisiert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mit Ether und mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung in einen Scheidetrichter überführt. Die Etherphase wurde dreimal mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit einem isokratischen Eluenten von 4 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 396 mg (0,80 mmol, 80 %) weißer Schaum**Schmelzpkt.:** 155 - 156 °C

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 5.91 (ddt, 1 H, ³J_{H,H} = 17.2 Hz und 11.6 Hz und 5.7 Hz, O-CH₂-CH=CH₂), 5.31 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 17.2 Hz, *trans*-O-CH₂-CH=CH₂), 5.22 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 11.6 Hz, *cis*-O-CH₂-CH=CH₂), 4.56 (d, 2 H, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, O-CH₂-CH=CH₂), 3.96 (m, 1 H, H-12 β), 3.84 (m, 1 H, H-7 β), 3.68, 3.57 (2b, je 2 H, O-CH₂-CH₂OH und O-CH₂-CH₂OH), 3.14 (m, 1 H, H-3 β), 2.43-0.95 (24 H), 0.98 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, H-21), 0.89 (s, 3 H, H-19), 0.67 (s, 3 H, H-18)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100.6 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 173.9 (C-24), 132.3 (O-CH₂-CH=CH₂), 118.1 (O-CH₂-CH=CH₂), 79.7 (C-3), 72.8 (C-12), 69.0 (O-CH₂-CH₂OH), 68.3 (C-7), 64.9 (O-CH₂-CH=CH₂), 62.1 (O-CH₂-CH₂OH), 47.1, 46.5, 41.9, 41.4, 39.6, 36.2, 35.1, 34.9, 34.6, 31.2, 30.8, 30.7, 28.3, 27.4, 27.2, 26.6, 23.1, 22.6 (C-19), 17.3 (C-21), 12.5 (C-18)

Elementaranalyse: berechnet: C 70,70 % H 9,82 %

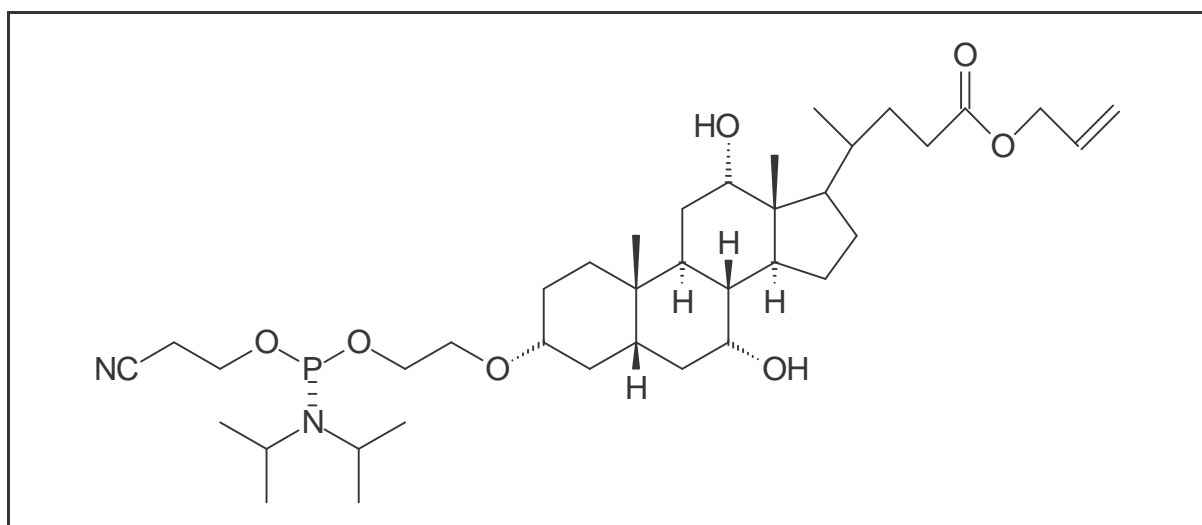
gefunden: C 70,56 % H 9,56 %

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,39

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 493,4

3 α -[(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy]-7 α ,12 α -dihydroxycholsäureallylester 22a/b

Literatur: Beaucage, 1981; Sinha, 1983; McBride, 1983



$\text{C}_{38}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$ [692,92]

410 mg (832 μmol) 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxycholsäureallylester 21 wurden in einen ausgeheizten 50 ml Schlenckkolben eingewogen und über Nacht im Exsikkator im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon wurde der Allylester 21 in 15 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Danach wurden 566 μl (3,33 mmol) DIPEA zugegeben und 204 μl (915 μmol) (Chloro-2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin 18a/b tropfenweise innerhalb von 15 min zugesetzt. Nach 90 min Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter überführt und einmal rasch mit 5 %iger NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde sofort

über Magnesiumsulfat abfiltriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Das farblose Öl wurde NMR-spektroskopisch analysiert und bei -20 °C gelagert. Chromatographie führte zu teilweiser Zersetzung des Phosphoramidits.

Ausbeute: >85 % aller phosphorhaltigen Produkte

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 5.89 (ddt, je 1 H, ³J_{H,H} = 17.1 Hz und 10.4 Hz und 5.6 Hz, O-CH₂-CH=CH₂), 5.29 (dd, je 1 H, ³J_{H,H} = 17.2 Hz, *trans*-O-CH₂-CH=CH₂), 5.20 (dd, je 1 H, ³J_{H,H} = 10.4 Hz, *cis*-O-CH₂-CH=CH₂), 4.52 (d, je 2 H, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, O-CH₂-CH=CH₂), 3.90 (m, je 1 H, H-12β), 3.81 (m, je 1 H, H-7β), 3.83-3.75 (m, je 4 H, O-CH₂-CH₂OP und NC-CH₂-CH₂OP), 3.67-3.51 (m, je 4 H, O-CH₂-CH₂OP und 2 x CH-Isopropyl), 3.12 (m, je 1 H, H-3β), 2.63 (t, je 2 H, ³J_{H,H} = 6.6 Hz und ³J_{H,H} = 6.9 Hz, NC-CH₂-CH₂OP), 2.47-0.91 (je 24 H), 1.14, 1.14, 1.12, 1.12 (4d, je 12 H, ³J_{H,H} = je 6.7 Hz, 4 x CH₃-Isopropyl), 0.93 (d, je 3 H, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, H-21), 0.84 (s, je 3 H, H-19), 0.63 (s, je 3 H, H-18)

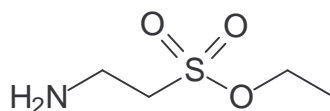
³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 149.2 und 149.0
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,50

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 693,7

2-Aminoethansulfonsäureethylester 24

Literatur: Padmapriya, 1985; Trujillo, 1993



C₄H₁₁NO₃S [153,20]

2,0 g (16 mmol) Taurin 23 wurden in einem 100 ml Rundkolben mit Rückflußkühler in 30 ml Triethylorthoacetat suspendiert. Es wurde für 46 h zum Rückfluß (142 °C) erhitzt, wo-

bei einer leichten Braunfärbung eintrat. Nicht umgesetztes Taurin wurde abfiltriert und überschüssiges Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der braune, ölige Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum von Lösungsmittelresten befreit und ohne weitere Aufreinigung zur Amidierung eingesetzt.

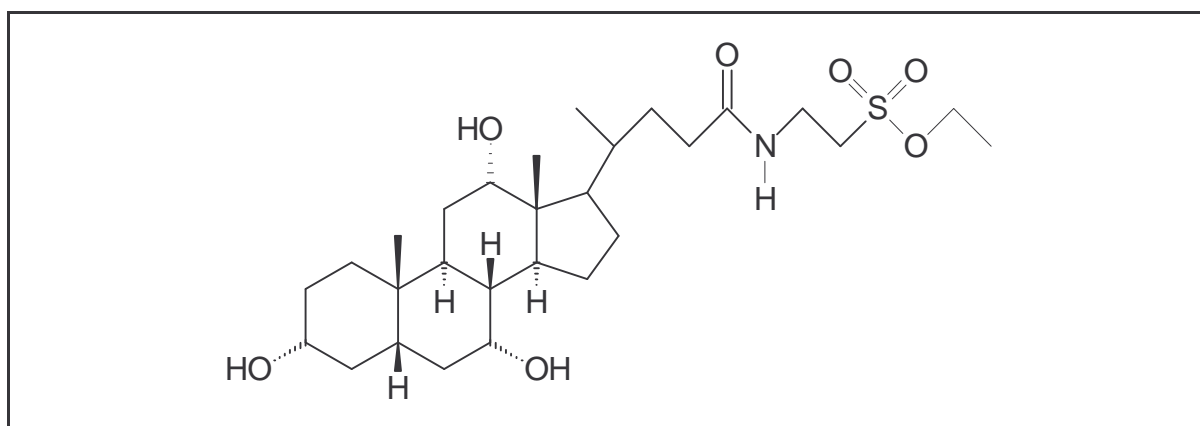
Ausbeute: 1,75 g eines braunen Öls

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 4.23 (q, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, CH_2 -Ethylester), 3.58 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz und $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, S- CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - NH_2), 3.28 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz und $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, S- $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - NH_2), 1.33 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, CH_3 -Ethylester)

ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 154,1

3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxytaurocholsäureethylester 25

Literatur: Norman, 1955; Dayal, 1996



$\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{NO}_7\text{S}$ [543,76]

613 mg (1,5 mmol) Cholsäure **05** wurden in einen ausgeheizten 50 ml Schlenckkolben eingewogen und über Nacht im Exsikkator über Phosphorpentoxid in Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon wurde die Cholsäure in 10 ml trockenem Dioxan suspendiert. Nach Zugabe von 382 μl (1,6 μmol) Tributylamin löste sich die Säure rasch auf. Nach 30 min Rühren wurden 200 μl (2,1 mmol) Chlorameisensäureethylester zutropft und 45 min bei RT gerührt. Danach wurde etwa 1 g des rohen 2-Aminoethansulfonsäureethylesters **24** in 6 ml Dioxan/Wasser = 1:1 gelöst und tropfenweise dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Nach anfänglicher Gasentwicklung wurde insgesamt noch 75 min

bei RT gerührt. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abdestilliert und der braune, ölige Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 4 % bis 12 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 750 mg (1,38 mmol, 92 %) blaßgelber Schaum

Schmelzpkt.: 86 - 92 °C

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 6.77 (t, 1 H, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, NH), 4.32 (q, 2 H, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, CH₂-Ethylester), 3.96 (m, 1 H, H-12β), 3.84 (m, 1 H, H-7β), 3.71 (m, 2 H, S-CH₂-CH₂-NH₂), 3.45 (m, 1 H, H-3β), 3.34 (t, 2 H, ³J_{H,H} = 5.8 Hz und ³J_{H,H} = 6.4 Hz, S-CH₂-CH₂-NH₂), 2.28-1.03 (24 H), 1.43 (t, 3 H, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, CH₃-Ethylester), 0.99 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, H-21), 0.89 (s, 3 H, H-19), 0.68 (s, 3 H, H-18)

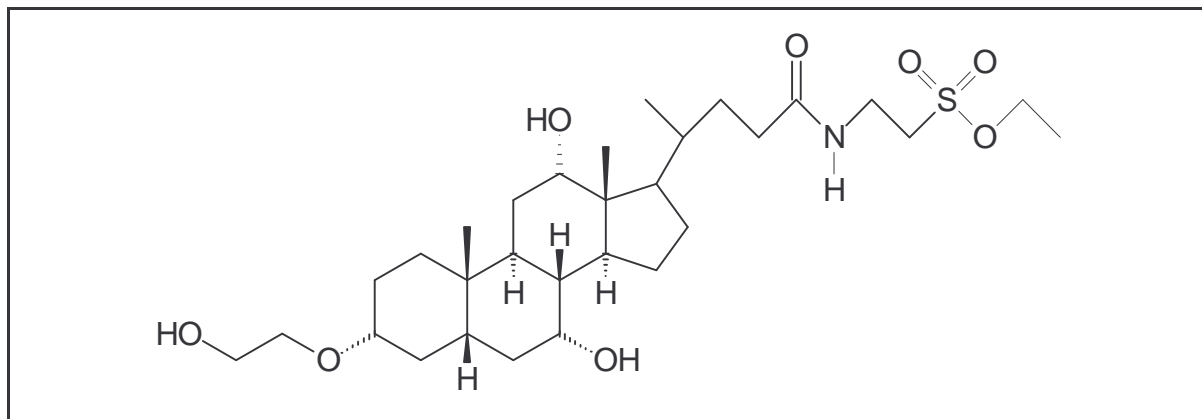
¹³C-NMR: 100.6 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm: 172.3 (C-24), 71.0 (C-12), 70.4 (C-3), 67.0 (CH₂-Ethylester), 66.2 (C-7), 50.5 (S-CH₂-CH₂-NH₂), 46.0, 45.7, 41.5, 41.3, 39.5, 35.3, 35.3, 35.1, 34.8, 34.3 (S-CH₂-CH₂-NH₂), 32.8, 31.4, 31.3, 30.4, 28.2, 27.2, 26.2, 22.7, 22.6 (C-19), 17.1 (C-21), 14.8 (CH₃-Ethylester), 12.3 (C-18)

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,21

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 542,5

3α-(2-Hydroxyethoxy)-7α,12α-dihydroxytaurocholsäureethylester 26

Literatur: Norman, 1955; Dayal, 1996



C₃₀H₅₃NO₈S [587,81]

858 mg (1,5 mmol) 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxycholsäure **20** wurden in einen ausgeheizten 50 ml Schlenckkolben eingewogen und über Nacht im Exsikkator über Phosphorpentoxid in Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon wurde die Verbindung **20** in 10 ml trockenem Dioxan suspendiert. Nach Zugabe von 382 μ l (1,6 μ mol) Tributylamin löste sich die Säure rasch auf. Nach 30 min Rühren wurden 200 μ l (2,1 mmol) Chlorameisensäureethylester zugetropft und 45 min bei RT gerührt. Danach wurde etwa 1 g des rohen 2-Aminoethansulfonsäureethylesters **24** in 6 ml Dioxan/Wasser = 1:1 gelöst und tropfenweise dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Nach anfänglicher Gasentwicklung wurde insgesamt noch 75 min bei RT gerührt. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abdestilliert und der braune, ölige Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 4 % bis 12 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 720 mg (1,22 mmol, 82 %) blaßgelber Schaum

Schmelzpkt.: 75 - 78 °C

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 6.57 (t, 1 H, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, NH), 4.32 (q, 2 H, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, CH₂-Ethylester), 3.96 (m, 1 H, H-12 β), 3.85 (m, 1 H, H-7 β), 3.75-3.65 (m, 4 H, S-CH₂-CH₂-NH₂ und O-CH₂-CH₂OH), 3.60-3.55 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂OH), 3.33 (t, 2 H, ³J_{H,H} = 5.7 Hz und ³J_{H,H} = 6.4 Hz, S-CH₂-CH₂-NH₂), 3.15 (m, 1 H, H-3 β), 2.34-1.03 (24 H), 1.42 (t, 3 H, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, CH₃-Ethylester), 0.99 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, H-21), 0.90 (s, 3 H, H-19), 0.69 (s, 3 H, H-18)

¹³C-NMR: 100.6 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 174.4 (C-24), 79.6 (C-3), 72.9 (C-12), 68.9 (O-CH₂-CH₂OH), 68.3 (C-7), 66.8 (CH₂-Ethylester), 62.1 (O-CH₂-CH₂OH), 49.7 (S-CH₂-CH₂-NH₂), 46.6, 46.5, 41.9, 41.4, 39.5, 36.3, 35.2, 35.1, 35.0, 34.6, 34.1 (S-CH₂-CH₂-NH₂), 32.8, 31.3, 28.2, 27.5, 27.2, 26.5, 23.2, 22.5 (C-19), 17.4 (C-21), 15.1 (CH₃-Ethylester), 12.5 (C-18)

Elementaranalyse: berechnet: C 61,30 % H 9,09 % N 2,38 %

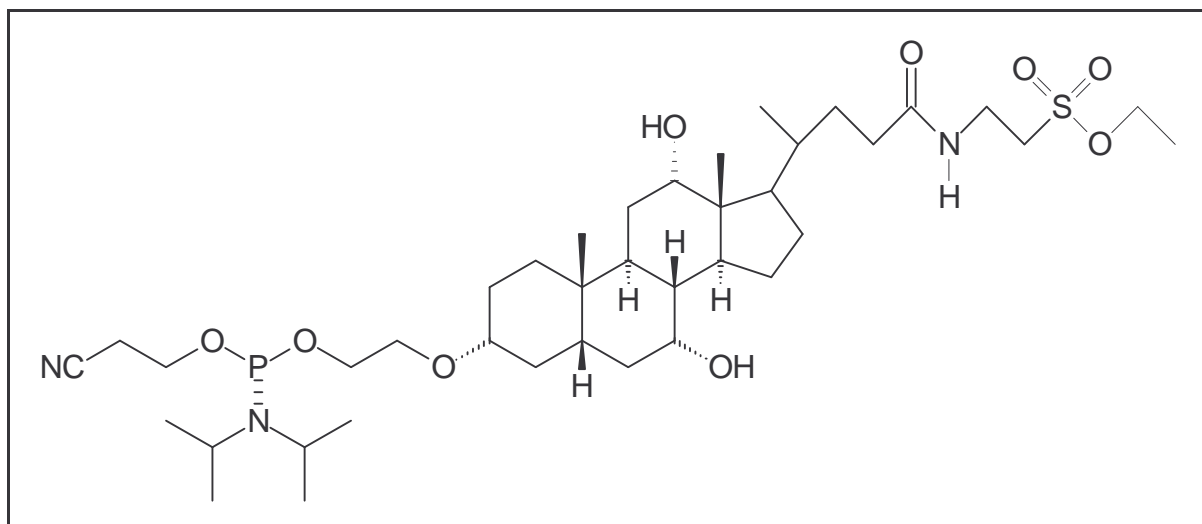
gefunden: C 61,05 % H 8,87 % N 2,76 %

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,24

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 586,6

3 α -[(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy]-7 α ,12 α -dihydroxytaurocholsäureethylester 27a/b

Literatur: Beaucage, 1981; Sinha, 1983; McBride, 1983



$C_{39}H_{70}N_3O_9PS$ [788,03]

350 mg (595 μ mol) 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxytaurocholsäureethylester 26 wurden in einen ausgeheizten 50 ml Schlenckkolben eingewogen und über Nacht im Exsikkator im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon wurde das Taurocholsäurederivat 26 in 15 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Danach wurden 405 μ l (2,38 mmol) DIPEA zugegeben und 146 μ l (915 μ mol) (Chloro-2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin 18a/b tropfenweise innerhalb von 5 min zugeetzt. Nach 90 min Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter überführt und einmal rasch mit 5 %iger $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde sofort über Magnesiumsulfat abfiltriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Das farblose Öl wurde NMR-spektroskopisch analysiert und bei -20 °C gelagert. Chromatographie führte zu teilweiser Zersetzung des Phosphoramidits.

Ausbeute: >75 % aller phosphorhaltigen Produkte

1H -NMR: 400 MHz, $CDCl_3$, δ in ppm: 6.38 (t, je 1 H, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, NH), 4.26 (q, je 2 H, $^3J_{H,H} = 7.1$ Hz, CH_2 -Ethylester), 3.89 (m, je 1 H, H-12 β), 3.86-3.74 (m, je 5 H, H-7 β und S- CH_2 - $\underline{CH_2}$ -NH $_2$ und O- $\underline{CH_2}$ - CH_2 OP), 3.67-3.51 (m, je 6 H, O- CH_2 - $\underline{CH_2}$ OP und 2 x CH-Isopropyl und NC- CH_2 - $\underline{CH_2}$ OP), 3.33 (2t, je 2 H, S- $\underline{CH_2}$ - CH_2 -NH $_2$), 3.11 (m, je 1 H,

H-3 β), 2.63 (t, je 2 H, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz und $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, NC-CH₂-CH₂OP), 2.28-1.03 (je 24 H), 1.38 (t, je 3 H, $^3J_{H,H} = 7.1$ Hz, CH₃-Ethylester), 1.13, 1.13, 1.11, 1.11 (4d, je 12 H, $^3J_{H,H} =$ je 6.7 Hz, 4 x CH₃-Isopropyl), 0.93 (d, je 3 H, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, H-21), 0.84 (s, je 3 H, H-19), 0.63 (s, je 3 H, H-18)

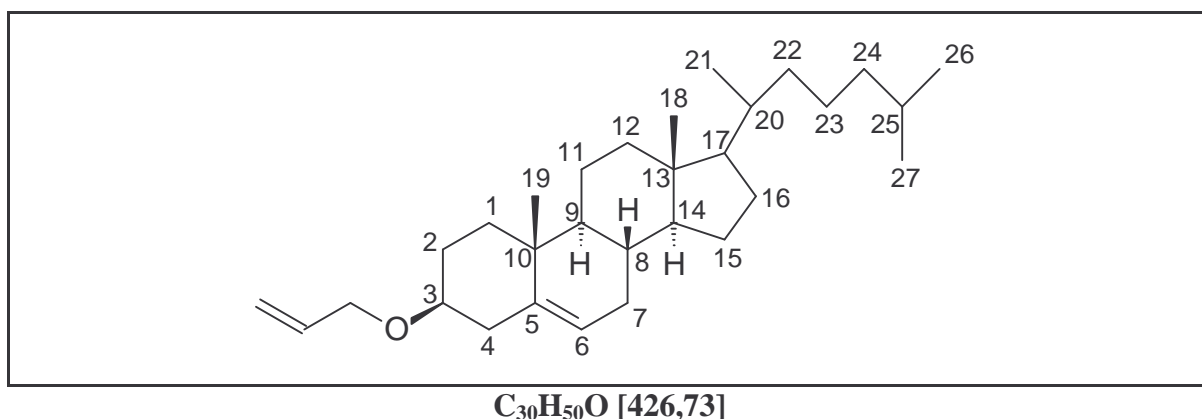
³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 149.2 und 149.1
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,50

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 786,8

3 β -Allylether-cholesterol 29

Literatur: Wess, 1992



9,67 g (25,0 mmol) Cholesterol 28 wurden in einem 1l-Rundkolben mit Rückflußkühler in 300 ml trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von 85 ml (500 mmol) DIPEA und 42 ml (500 mmol) Allylbromid wurde 18 h bei 120 °C gerührt. Die DC ergab fast vollständige Umsetzung. Zur Aufarbeitung wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der verbleibende tiefbraune Rückstand wurde in 300 ml Ether aufgenommen und in einen Scheidetrichter überführt. Die Etherphase wurde dreimal mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung, zweimal mit 5 %iger Na₂SO₃-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden einmal mit Ether reextrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten Etherphasen über Magnesiumsulfat wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das resultierende zähe Harz wurde durch Chromatographie an

Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von 1 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt. Es wurden 8,95 g eines bräunlichen Harzes erhalten, das beim Trocknen an der Ölpumpe durchkristallisierte. Umkristallisation erfolgte in 200 ml siedendem Ethanol und Fällung bei 4 °C über Nacht.

Ausbeute: 7,14 g (16,7 mmol, 67 %) weißes Pulver

Schmelzpkt.: 100 - 102 °C

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 5.92 (ddt, 1 H, ³J_{H,H} = 17.2 Hz und 10.3 Hz und 5.6 Hz, O-CH₂-CH=CH₂), 5.34 (m, 1 H, H-6), 5.27 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 17.2 Hz, *trans*-O-CH₂-CH=CH₂), 5.15 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 10.3 Hz, *cis*-O-CH₂-CH=CH₂), 3.21 (m, 1 H, H-3α), 2.41-0.94 (29 H), 1.00 (s, 3 H, H-19), 0.86 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, H-21), 0.79 (2d, 6 H, ³J_{H,H} = je 6.5 Hz, H-26 und H-27), 0.68 (s, 3 H, H-18)

¹³C-NMR: 62.9 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 141.0 (C-5), 135.5 (O-CH₂-CH=CH₂), 121.5 (C-6), 116.5 (O-CH₂-CH=CH₂), 78.6 (C-3), 69.0 (O-CH₂-CH=CH₂), 56.8 (C-14), 56.2 (C-17), 50.2 (C-9), 42.3 (C-13), 39.8 (C-16), 39.5 (C-24), 39.2 (C-4), 37.3 (C-1), 36.9 (C-22), 36.2 (C-10), 35.8 (C-20), 32.0 (C-12), 31.9 (C-7), 28.4 (C-8), 28.2 (C-2), 28.0 (C-25), 24.3 (C-15), 23.8 (C-23), 22.8 (C-27), 22.6 (C-26), 21.1 (C-11), 19.4 (C-19), 18.7 (C-21), 11.9 (C-18)

Elementaranalyse: berechnet: C 84,44 % H 11,81 %

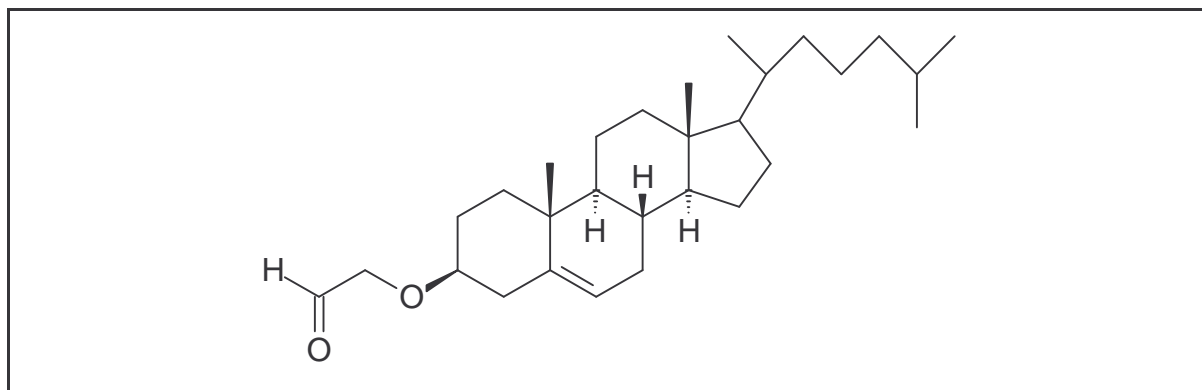
gefunden: C 84,25 % H 11,54 %

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95:5) = 0,73

ESI-MS [M+NH₄]⁺: m/z 444,4

3 β -(Ethan-2-yl-1-ether)-cholesterol 30

Literatur: Pappo, 1956; Choi, 1992; Kraus, 1992; Wess, 1992



$C_{29}H_{48}O_2$ [428,70]

5,97 g (14,0 mmol) des 3 β -Allylether-cholesterols 29 wurden in 120 ml THF gelöst und mit 40 ml Wasser versetzt. Zu der einphasigen, klaren Lösung wurden 2,8 ml (280 μ mol) einer 2,5 %igen Lösung von Osmiumtetroxid gelöst in *tert*-Butanol zugetropft und eine Stunde bei RT gerührt. Die Lösung färbte sich durch reduziertes Osmiumtetroxid leicht dunkel. Unter starkem Rühren wurden innerhalb von 2 h 7,49 g (35,0 mmol) Natrium(meta)periodat portionsweise zugegeben, wobei die Dunkelfärbung verschwand und sich ein voluminöser, weißer Niederschlag bildete. Unter DC-Kontrolle rührte der Ansatz nach beendeter Zugabe 3 h. Da die Reaktion nicht vollständig war, wurde über Nacht bei RT weitergerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Niederschlag über eine Fritte abgetrennt und mehrmals mit Ether gewaschen. Das Filtrat wurde in einen Scheidetrichter überführt und solange mit Ether und gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt, bis eine Phasentrennung erfolgte. Die organische Phase wurde je zweimal mit 5 %iger Na₂SO₃-Lösung und mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden zweimal mit Ether reextrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie an Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von Dichlormethan/Methanol = 99:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 2,44 g (5,69 mmol, 41 %) weißer Schaum

1,65 g (3,87 mmol, 28 %) reisoliertes Edukt

Schmelzpkt.: 82 - 86 °C

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 9.75 (s, 1 H, CHO), 5.36 (m, 1 H, H-6), 4.12 (m, 2 H, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -CHO), 3.24 (m, 1 H, H-3 α), 2.41-0.95 (29 H), 1.01 (s, 3 H, H-19), 0.90 (d, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, H-21), 0.88 und 0.85 (2d, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = \text{je } 6.6$ Hz, H-26 und H-27), 0.68 (s, 3 H, H-18)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100.6 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 201.5 (O- $\underline{\text{CH}_2}$ -CHO), 140.2 (C-5), 122.1 (C-6), 80.4 (C-3), 73.8 (O- $\underline{\text{CH}_2}$ -CHO), 56.7 (C-14), 56.1 (C-17), 50.1 (C-9), 42.3 (C-13), 39.7 (C-16), 39.5 (C-24), 38.8 (C-4), 37.0 (C-1), 36.8 (C-22), 36.2 (C-10), 35.8 (C-20), 31.9 (C-12), 31.8 (C-7), 28.2 (C-8), 28.2 (C-2), 28.0 (C-25), 24.3 (C-15), 23.8 (C-23), 22.8 (C-27), 22.5 (C-26), 21.1 (C-11), 19.3 (C-19), 18.7 (C-21), 11.8 (C-18)

Elementaranalyse: berechnet: C 81,25 % H 11,29 %

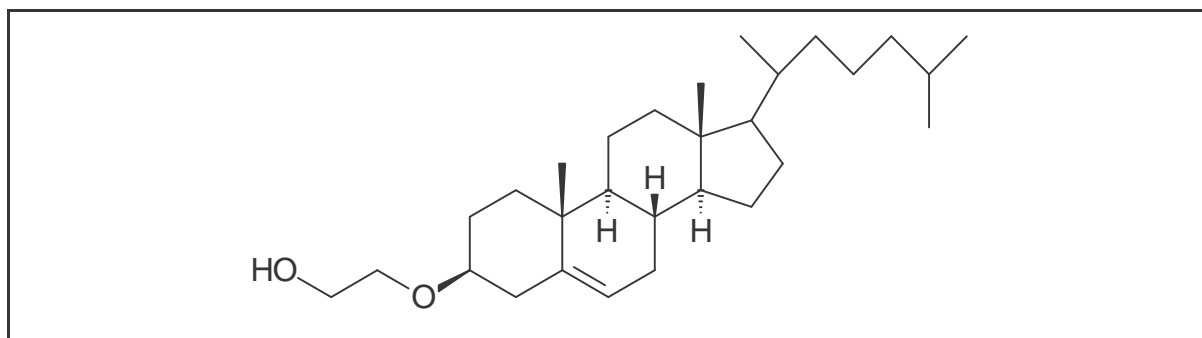
gefunden: C 80,66 % H 11,19 %

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95:5) = 0,42

ESI-MS [M-H] $^-$: m/z 446,4

3 β -(2-Hydroxyethoxy)-cholesterol 31

Literatur: Brown, 1979; Cobb, 1991; Wess, 1992



$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$ [430,71]

1,71 g (4,0 mmol) des Aldehyds 30 wurden in 150 ml THF/Methanol (4:1) gelöst und mit Eis auf 4 °C gekühlt. Es wurden 76 mg (2,0 mmol) Natriumborhydrid zugegeben und unter Rühren ließ man das Reaktionsgemisch auf RT erwärmen. Nach 4 h Rühren unter DC-Kontrolle wurde die Reaktionslösung mit Ether in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wurde zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden zweimal mit Ether reextrahiert. Die vereinigten organischen Pha-

sen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingengt. Zur Entfernung von Wasser wurde der Rückstand nochmals in Ether aufgenommen, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und wiederum am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert. Zusätzlich wurde durch Chromatographie an Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von Dichlormethan/Methanol = 99:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 1,16 g (2,69 mmol, 91 %) weißer Schaum

Schmelzpkt.: 100 - 102 °C Lit.: 93 - 105 °C (Davis, 1962)

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 5.35 (m, 1 H, H-6), 3.72 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂OH), 3.58 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂OH), 3.20 (m, 1 H, H-3α), 2.42-0.95 (29 H), 1.01 (s, 3 H, H-19), 0.91 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, H-21), 0.87 und 0.86 (2d, 6 H, ³J_{H,H} = je 6.6 Hz, H-26 und H-27), 0.68 (s, 3 H, H-18)

¹³C-NMR: 100.6 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 79.4 (C-3), 69.0 (O-CH₂-CH₂OH), 62.1 (O-CH₂-CH₂OH), 56.8 (C-14), 56.2 (C-17), 50.2 (C-9), 42.3 (C-13), 39.8 (C-16), 39.5 (C-24), 39.1 (C-4), 37.2 (C-1), 36.8 (C-22), 36.2 (C-10), 35.8 (C-20), 31.9 (C-12), 31.9 (C-7), 28.4 (C-8), 28.2 (C-2), 28.0 (C-25), 24.3 (C-15), 23.8 (C-23), 22.8 (C-27), 22.6 (C-26), 21.1 (C-11), 19.4 (C-19), 18.7 (C-21), 11.8 (C-18)

Elementaranalyse: berechnet: C 80,68 % H 11,91 %

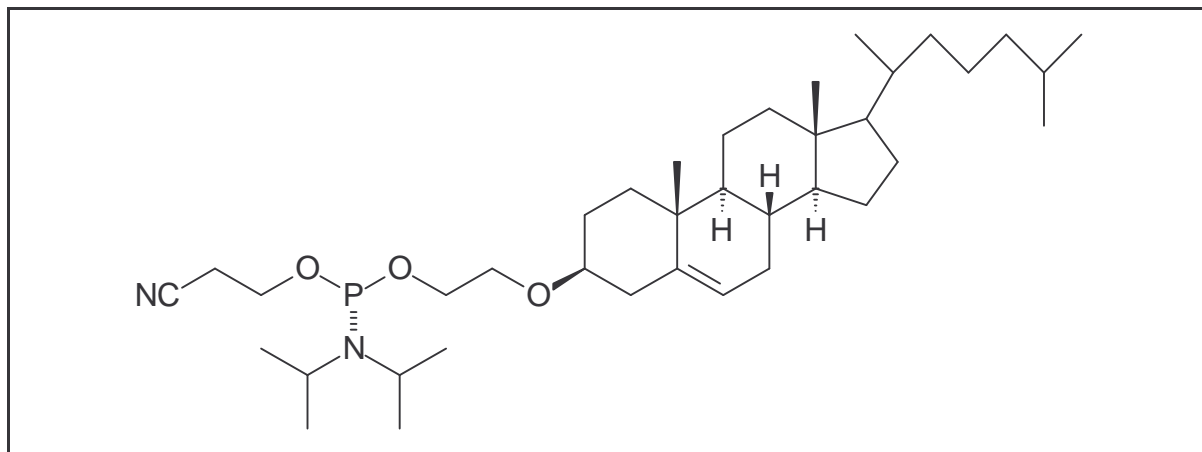
gefunden: C 80,93 % H 11,66 %

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95:5) = 0,43

ESI-MS [M+NH₄]⁺: m/z 448,6

3 β -[(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy]-cholesterol 32a/b

Literatur: Beaucage, 1981; Sinha, 1983; McBride, 1983



$C_{38}H_{67}N_2O_3P$ [630,94]

431 mg (1,0 mmol) 3 β -(2-Hydroxyethoxy)-cholesterol **31** wurden in einen ausgeheizten 50 ml Schlenckkolben eingewogen und über Nacht im Exsikkator im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon wurde das Cholesterolderivat **31** in 15 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Danach wurden 680 μ l (4,0 mmol) DIPEA zugegeben und 335 μ l (1,5 mmol) (Chloro-2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin tropfenweise innerhalb von 10 min zugesetzt. Nach 90 min Rühren bei RT zeigte eine DC-Kontrolle vollständigen Umsatz. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter überführt und einmal rasch mit 5 %iger $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde sofort über Magnesiumsulfat abfiltriert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das rohe Phosphoramidit wurde am Chromatotron mit einem isokratischen Eluenten von Essigester/*n*-Hexan = 1:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 590 mg (935 μ mol, 94 %) weißer, amorpher Feststoff

1H -NMR: 400 MHz, $CDCl_3$, δ in ppm: 5.31 (m, je 1 H, H-6), 3.87-3.53 (m, je 8 H, NC-CH₂-CH₂OP und O-CH₂-CH₂OP und O-CH₂-CH₂OP und 2 x CH-Isopropyl), 3.17 (m, je 1 H, H-3 α), 2.62 (t, je 2 H, $^3J_{H,H}$ = je 6.7 Hz, NC-CH₂-CH₂OP), 2.35-0.91 (je 28 H), 1.16, 1.16, 1.15, 1.15 (4d, je 12 H, $^3J_{H,H}$ = je 6.8 Hz, 4 x CH₃-Isopropyl), 0.97 (s, je 3 H, H-

19), 0.88 (d, je 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, H-21), 0.84 und 0.83 (2d, je 6 H, $^3J_{\text{H,H}} =$ je 6.6 Hz, H-26 und H-27), 0.64 (s, je 3 H, H-18)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100.6 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 140.9 (C-5), 121.5 (C-6), 117.6 ($\underline{\text{NC}}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OP}$), 79.4 (C-3), 67.8 und 62.9 und 58.4 (3 C, $\text{O-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{OP}$ und $\text{O-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{OP}$ und $\text{NC-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{OP}$), 56.8, 56.1, 50.2, 43.0 (2 x CH-Isopropyl), 42.3, 39.8, 39.5, 39.1, 39.0, 37.2, 36.8, 36.2, 35.7, 31.9, 28.4, 28.2, 28.0, 24.6 (4 x CH_3 -Isopropyl), 24.3, 23.8, 22.8, 22.5, 21.0, 20.3, 19.3 (C-19), 18.7 (C-21), 11.8 (C-18)

$^{31}\text{P-NMR}$: 162.0 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 149.03 und 149.00
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,65

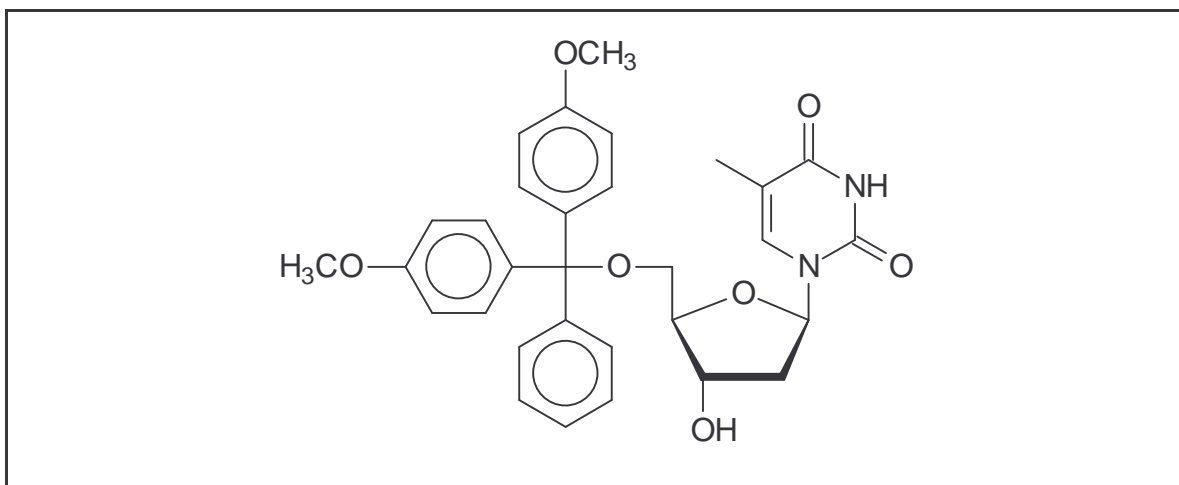
ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 631,6

12.2.2 Geschützte Nukleoside

Übersicht:

- 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **33**
- 3'-*O*-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-thymidin **34**
- N^6 -Benzoyl-2'-desoxyadenosin **35**
- N^6 -Benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenosin **36**
- N^4 -Benzoyl-2'-desoxycytidin **37**
- N^4 -Benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin **38**
- N^4 -Isobutyryl-2'-desoxycytidin **39**
- 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin **40**
- N^2 -Isobutyryl-2'-desoxyguanosin **41**
- 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- N^2 -isobutyryl-2'-desoxyguanosin **42**
- N^2 -Isobutyryl-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin **43**

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Reaktionen wurden in ausgeheizten Apparaturen unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin 33**Literatur:** Schaller, 1963**C₃₁H₃₂N₂O₇ [544,60]**

In 50 ml trockenem Pyridin wurden bei RT 61 mg (0,50 mmol) DMAP, 2,1 ml (15 mmol) Triethylamin und 2,42 g (10 mmol) über Phosphorpentoxid getrocknetes Thymidin gelöst. Unter Rühren wurden 4,40 g (13 mmol) DMTrCl zugesetzt. Nach 3 h zeigte die DC, daß die Tritylierung noch nicht vollständig war. Deshalb wurden noch 340 mg (1 mmol) DMTrCl zugesetzt und eine weitere Stunde gerührt, bis der Umsatz vollständig war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 ml Methanol beendet und die Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in 100 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden einmal mit 50 ml Chloroform reextrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde gut im Ölpumpenvakuum getrocknet und aus Benzol umkristallisiert.

Ausbeute: 4,85 g (8,90 mmol, 89 %) farblose Nadeln

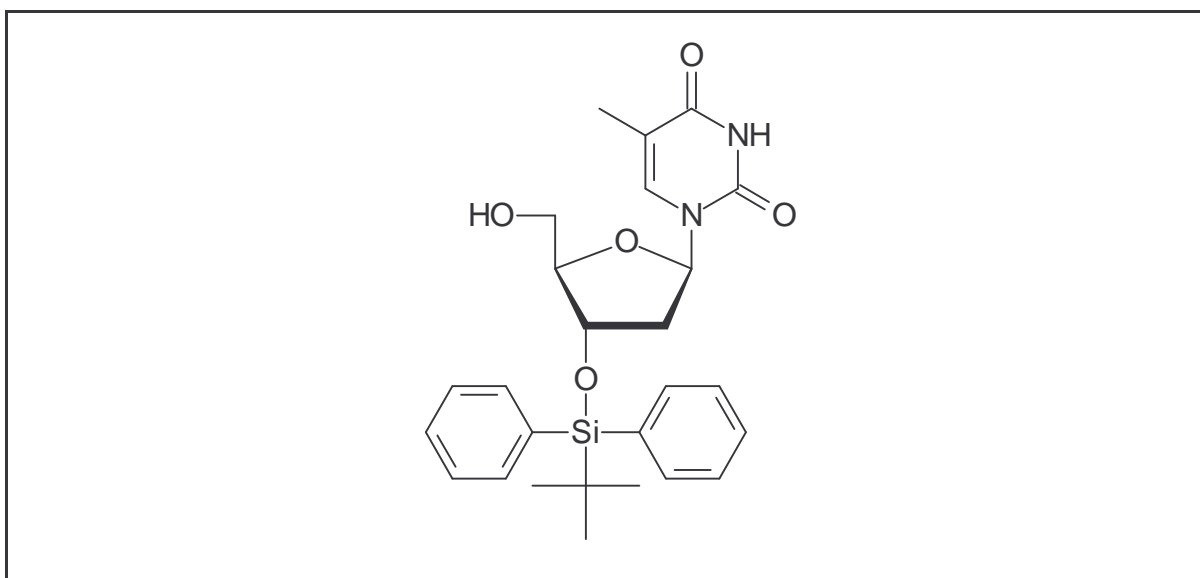
¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 9.05 (b, 1 H, N-H), 7.50 (s, 1 H, H-6), 7.32-7.10 (m, 9 H, DMTr-arom.), 6.76-6.71 (m, 4 H, DMTr-arom.), 6.34 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, H-1'), 4.47 (b, 1 H, H-3'), 3.98-3.94 (m, 1-H, H-4'), 3.69 (s, 6 H, 2 x O-CH₃), 3.40-3.35 (m, 1 H, H-5'), 3.30-3.24 (m, 1 H, H-5''), 2.71-2.69 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 4.3 Hz, 3'-OH), 2.38-2.31 (m, 1 H, H-2'), 2.27-2.16 (m, 1 H, H-2''), 1.37 (s, 3 H, CH₃-Thymin)

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,55

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 543,3

3'-O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-thymidin **34**

Literatur: Ogilvie, 1973; Hanessian, 1975; Szabó, 1995



$C_{26}H_{32}N_2O_5Si$ [480,63]

5,45 g (10 mmol) gut getrocknetes 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **33** und 1,63 g (24 mmol) Imidazol wurden unter Rühren in 60 ml abs. Pyridin gelöst. Es wurden 3,9 ml (15 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid zugetropft. Nach 18 h Rühren zeigte die DC vollständige Umsetzung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Methanol abgebrochen und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Zur Entfernung von Pyridinresten wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde in 10 ml Methanol gelöst und zur Abspaltung der Dimethoxytritylschutzgruppe mit 100 ml 80 %iger Essigsäure versetzt. Die Lösung wurde 2 h bei RT gerührt und die Umsetzung durch DC überprüft. Danach wurde die Essigsäure am Rotationsverdampfer unter mehrmaliger Zugabe von Wasser abgezogen. Der Rückstand wurde wiederum zweimal mit Toluol coevaporiert und danach in 200 ml Essigsäureethylester gelöst. Nach Extraktion mit 5 %iger NaHCO₃-Lösung und Wasser wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 0 % bis 5 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 4,23 g (8,80 mmol, 88 %) farbloser Schaum

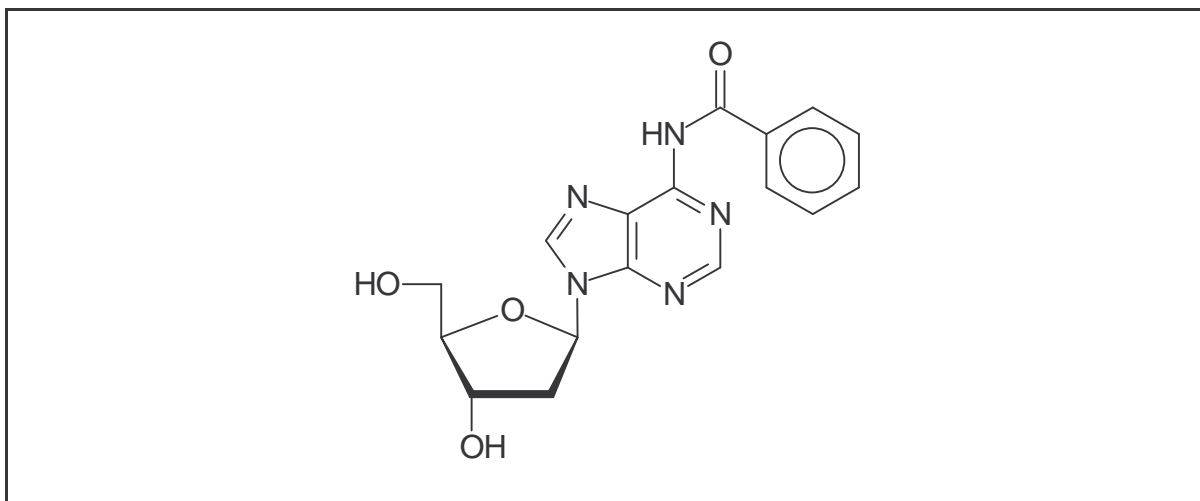
¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 8.65 (b, 1 H, N-H), 7.67-7.62 (m, 4 H, TBDPS-arom.), 7.50-7.37 (m, 6 H, TBDPS-arom.), 7.37 (d, 1 H, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, H-6), 6.23 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, H-1'), 4.47-4.42 (m, 1 H, H-3'), 3.99-3.96 (m, 1 H, H-4'), 3.66-3.60 (m, 1 H, H-5'), 3.27-3.21 (m, 1 H, H-5'), 2.33-2.10 (m, 3 H, H-2' und H-2'' und OH-5'), 1.85 (s, 3 H, CH₃-Thymin), 1.08 (s, 9 H, *tert*-Butyl)

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95:5) = 0,78

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 479,2

***N*⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin 35**

Literatur: Schaller, 1963; Ti, 1982



C₁₇H₁₇N₅O₄ [355,35]

3,77 g (15 mmol) über Phosphorpentoxid getrocknetes 2'-Desoxyadenosin wurden in 100 ml abs. Pyridin gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Es wurden 9,5 ml (75 mmol) Trimethylchlorosilan zugetropft und für 30 min gerührt. Danach wurden 8,7 ml (75 mmol) Benzoylchlorid zugegeben und unter Erwärmung auf RT für 2 h gerührt. Nach erneuter Kühlung auf 0 °C wurde die Umsetzung durch Zugabe von 30 ml Eiswasser abgebrochen. Nach 15 min wurden 30 ml 25 %ige Ammoniaklösung zum Entfernen der Silylschutzgruppen zugesetzt. Nach 30 min wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 100 ml heißem Wasser gelöst. Die wäßrige Phase wurde zweimal mit je 30 ml heißem Essigsäureethylester gewaschen. Die vereinigten organischen

Phasen wurden mit 30 ml heißem Wasser reextrahiert. Das Produkt kristallisierte aus den vereinigten wäßrigen Phasen über Nacht bei 4 °C aus und wurde abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 3,84 g (10,8 mmol, 72 %) weiße Nadeln

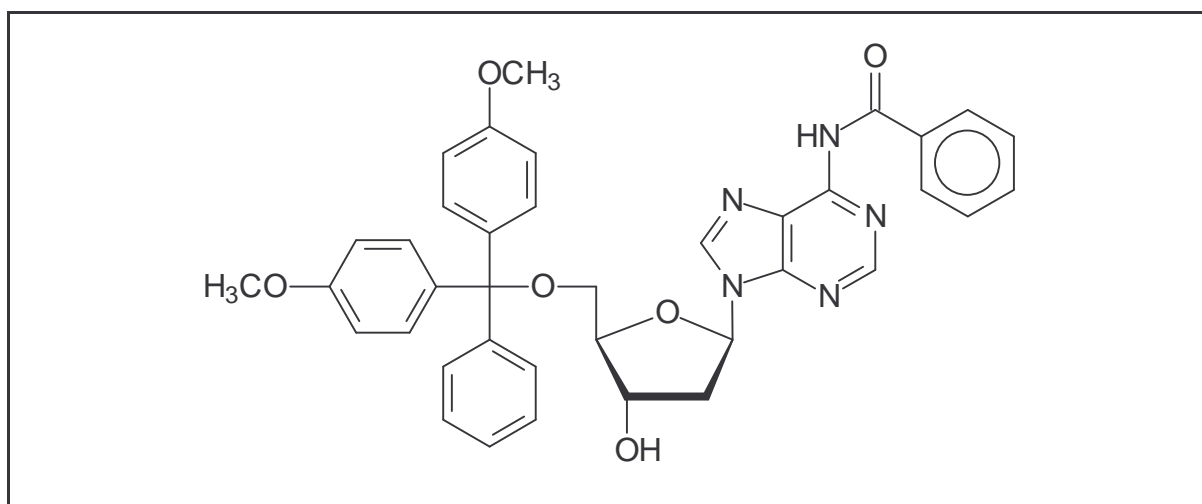
¹H-NMR: 250 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm: 11.14 (b, 1 H, N-H), 8.76 und 8.70 (2 s, je 1 H, H-8 und H-2), 8.07-8.04 (m, 2 H, ortho-H-Benzoyl), 7.69-7.53 (m, 3 H, meta- und para-H-Benzoyl), 6.50 (ψt, 1 H, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, H-1'), 5.40 (b, 1 H, OH), 5.05 (b, 1 H, OH), 4.50-4.45 (m, 1 H, H-3'), 3.94-3.90 (m, 1 H, H-4'), 3.69-3.52 (m, 2 H, H-5' und H-5''), 2.87-2.76 (m, 1 H, H-2'), 2.38 (ddd, 1 H, ²J_{H,H} = 13.2 Hz, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, H-2')

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,33

ESI-MS [M-H]: m/z 479,2

***N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenosin 36**

Literatur: Schaller, 1963; Ti, 1982



C₃₈H₃₅N₅O₆ [657,72]

3,84 g (10,8 mmol) gut getrocknetes *N*⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin 35 und 66 mg (0,54 mmol) DMAP wurden zweimal mit Pyridin coevaporiert und in 70 ml abs. Pyridin suspendiert. Bei RT wurden 2,3 ml (16,2 mmol) Triethylamin und 4,76 g (14 mmol) Dimethoxytritylchlorid zugegeben und unter DC-Kontrolle gerührt. Nach 2 h wurden 500 mg (1,5

mmol) Dimethoxytritylchlorid nachdosiert und es wurde weitere 2 h gerührt, bis die Umsetzung vollständig war. Durch Zugabe von 15 ml Methanol wurde die Reaktion abgebrochen. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in 150 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 0 % bis 8 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 5,77 g (8,8 mmol, 81 %) farbloser Schaum

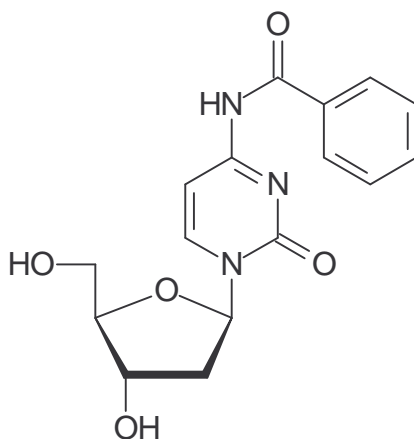
¹H-NMR: 270 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 9.18 (b, 1 H, N-H), 8.71 und 8.15 (2 s, je 1 H, H-2 und H-8), 8.02-7.99 (m, 2 H, ortho-H-Benzoyl), 7.59-7.15 (m, 3 H, meta- und para-H-Benzoyl und 9 H, DMTr-arom.), 6.80-6.75 (m, 4 H, DMTr-arom.), 6.47 (ψt, 1 H, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, H-1'), 4.73-4.69 (m, 1 H, H-3'), 4.19-4.14 (m, 1 H, H-4'), 3.75 (s, 6 H, 2 x O-CH₃), 3.40-3.38 (m, 2 H, H-5' und H-5''), 2.91-2.81 (m, 1 H, H-2'), 2.60-2.51 (m, 1 H, H-2'')

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95:5) = 0,29

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 658,1

***N*⁴-Benzoyl-2'-desoxycytidin 37**

Literatur: Schaller, 1963; Ti, 1982



C₁₆H₁₇N₃O₅ [331,32]

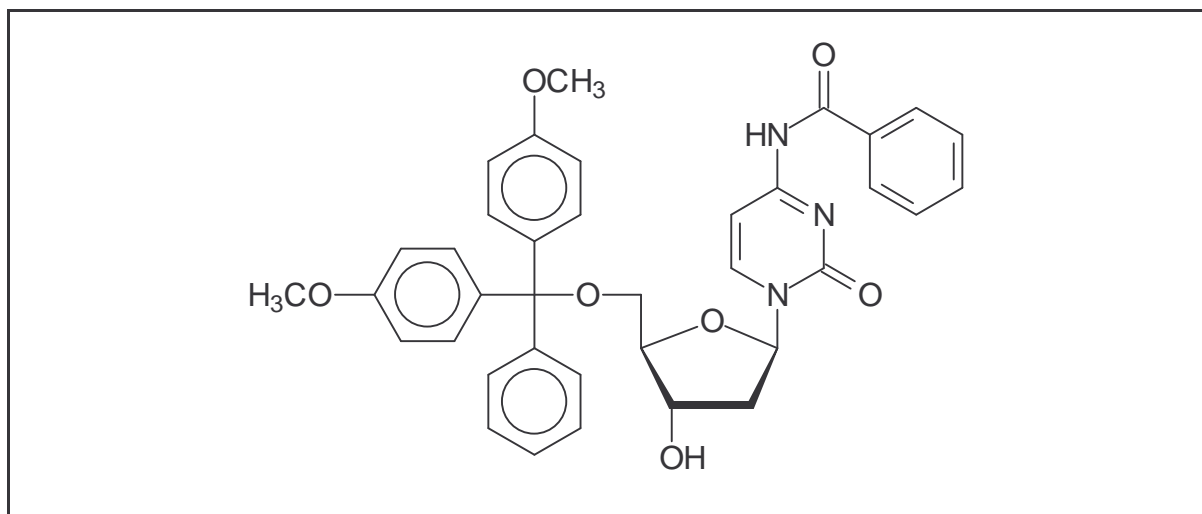
2,27 g (8,6 mmol) gut getrocknetes 2'-Desoxycytidin-Hydrochlorid wurden in 70 ml abs. Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden 5,5 ml (43 mmol) Trimethylchlorsilan zugegeben und 30 Minuten gerührt. Danach wurden 5,0 ml (43 mmol) Benzoylchlorid zugegeben und unter Erwärmung auf RT für 2 h gerührt. Nach erneuter Kühlung auf 0 °C wurde die Reaktion mit 20 ml Eiswasser abgebrochen. Nach Zugabe von 20 ml 25 %iger Ammoniaklösung waren die Silylschutzgruppen nach 30 min Rühren entfernt. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum zur Trockene eingedunstet. Der Rückstand wurde in 100 ml heißem Wasser gelöst und zweimal mit je 30 ml heißem Essigsäureethylester gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 ml heißem Wasser reextrahiert. Aus den vereinigten wässrigen Phasen kristallisierte das Produkt über Nacht bei 4 °C aus und wurde abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 1,96 g (5,9 mmol, 69 %) farblose Nadeln

¹H-NMR: 270 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm: 11.05 (b, 1 H, N-H), 8.38 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, H-6), 8.01-7.98 (m, 2 H, ortho-H-Benzoyl), 7.65-7.45 (m, 3 H, meta-H und para-H-Benzoyl), 7.33 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, H-5), 6.13 (ψt, 1 H, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, H-1'), 5.26 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 3.8 Hz, OH-3'), 5.06 (b, 1 H, OH-5'), 4.28-4.23 (m, 1 H, H-3'), 3.89-3.85 (m, 1 H, H-4'), 3.66-3.55 (m, 2 H, H-5' und H-5''), 2.30 (ddd, 1 H, ²J_{H,H} = 13.1 Hz, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ³J_{H,H} = 3.9 Hz, H-2'), 2.09-2.00 (m, 1 H, H-2'')

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,29

ESI-MS [M-H]: m/z 330,0

N*⁴-Benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin 38*Literatur:** Schaller, 1963; Ti, 1982**C₃₇H₃₅N₃O₇ [633,70]**

3,31 g (10,0 mmol) *N*⁴-Benzoyl-2'-desoxycytidin 37 und 61 mg (0,5 mmol) wurden zweimal aus abs. Pyridin coevaporiert und danach in 70 ml abs. Pyridin aufgenommen. Es wurden 2,1 ml (15 mmol) Triethylamin und 4,40 g (13 mmol) Dimethoxytritylchlorid zugegeben und unter DC-Kontrolle 2 h bei RT gerührt. Da die Tritylierung noch nicht vollständig war, wurden 670 mg (2 mmol) Dimethoxytritylchlorid nachdosiert und weitere 2 h gerührt. Bei vollständigem Umsatz wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Methanol abgebrochen. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in 150 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 0 % bis 8 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 5,01 g (7,9 mmol, 79 %) blaßgelber Schaum

¹H-NMR: 270 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 8.83 (b, 1 H, N-H), 8.32-8.29 (m, 1 H, H-6), 7.87-7.83 (m, 2 H, ortho-H-Benzoyl), 7.60-7.19 (m, 9 H, DMTr-arom. und m, 3 H, meta-H und para-H-Benzoyl und m, 1 H, H-5), 6.87-6.83 (m, 4 H, DMTr-arom.), 6.23 (ψt, 1 H, ³J_{H,H} = 5,8 Hz, H-1'), 4.59-4.54 (m, 1 H, H-3'), 4.22-4.18 (m, 1 H, H-4'), 3.78 (s, 6 H, 2 x

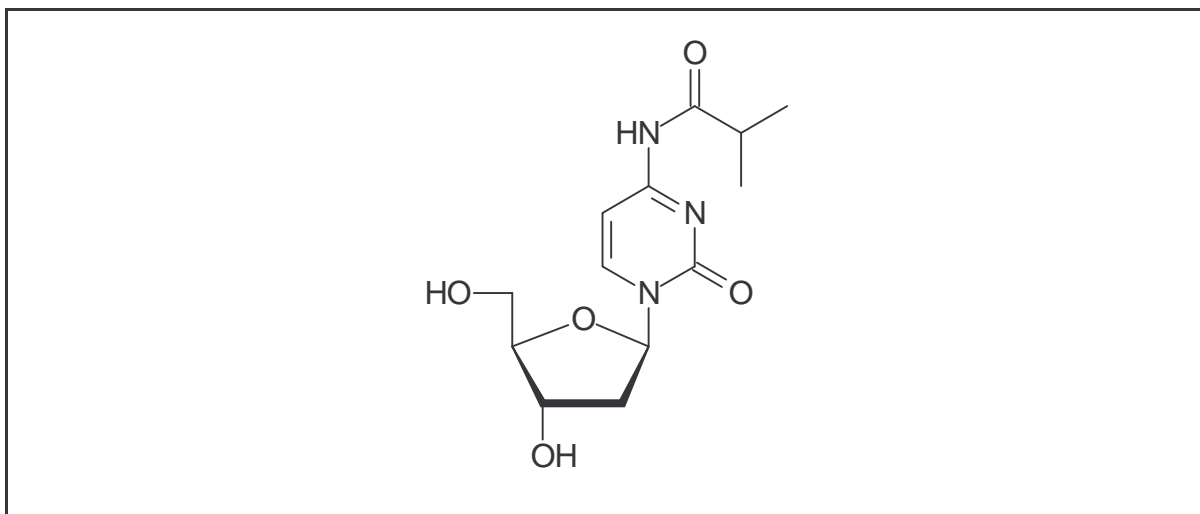
O-CH₃), 3.52-3.40 (m, 3 H, H-5' und H-5'' und OH-3'), 2.83-2.73 (m, 1 H, H-2'), 2.33-2.23 (m, 1 H, H-2'')

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,56

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 634,5

***N*⁴-Isobutyryl-2'-desoxycytidin 39**

Literatur: Ti, 1982



C₁₃H₁₉N₃O₅ [297,31]

2,64 g (10 mmol) gut getrocknetes 2'-Desoxycytidin-Hydrochlorid wurden in 80 ml abs. Pyridin unter Argon gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach 30 min Rühren wurden 6,3 ml (50 mmol) Trimethylchlorsilan zugetropft. Nach weiteren 30 min wurden 8,3 ml (50 mmol) Isobuttersäureanhydrid zugegeben. Unter Erwärmung auf RT wurde das Reaktionsgemisch 2 h gerührt. Bei 0 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 ml Wasser abgebrochen und die Silylschutzgruppen wurden durch Zugabe von 30 ml 25 %iger Ammoniaklösung entfernt. Nach 30 min Rühren wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand in 100 ml heißem Wasser gelöst. Es wurde zweimal mit je 30 ml heißem Essigsäureethylester gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 30 ml heißem Wasser extrahiert. Da bei Eiskühlung der wäßrigen Phasen keine Kristallisation einsetzte, wurde zur Trockene eingengt und an Kieselgel mit einem Eluenten von 10 % Methanol in Dichlormethan chromatographiert.

Ausbeute: 2,46 g (8,3 mmol, 83 %) weißer Schaum

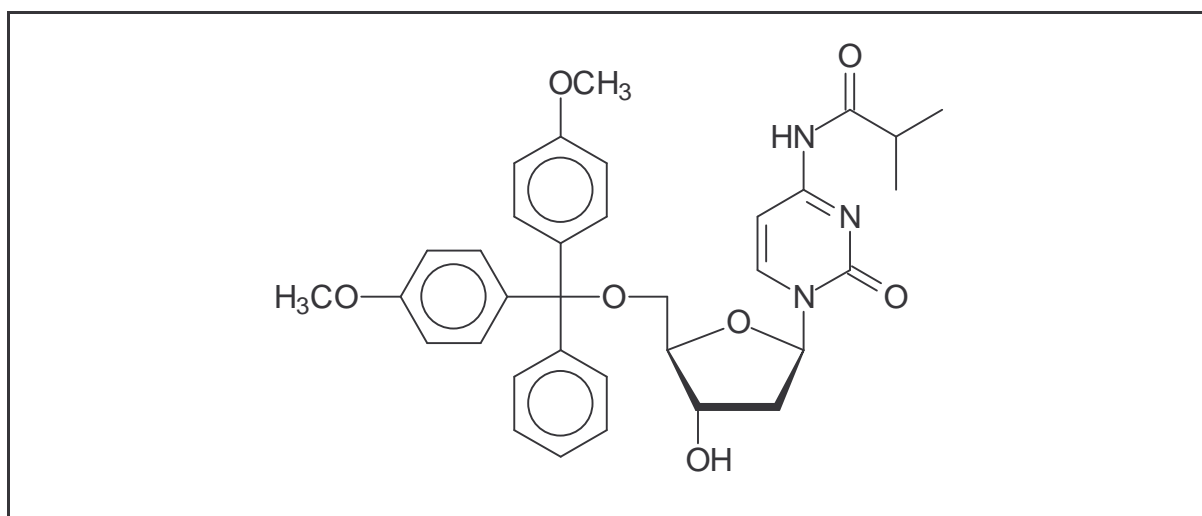
$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz, DMSO- d_6 , δ in ppm: 10.82 (b, 1 H, N-H), 8.32 (d, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, H-6), 7.26 (d, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, H-5), 6.10 (ψt , 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, H-1'), 5.25 (b, 1 H, OH-3'), 5.04 (b, 1 H, OH-5'), 4.23-4.21 (m, 1 H, H-3'), 3.87-3.83 (m, 1 H, H-4'), 3.64-3.53 (m, 2 H, H-5' und H-5''), 2.79-2.62 (h, 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, CH-Isobutyryl), 2.28 (ddd, 1 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.9$ Hz, H-2'), 2.05-1.95 (m, 1 H, H-2''), 1.05 (d, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, CH_3 -Isobutyryl)

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,24

ESI-MS [M-H] $^-$: m/z 296,3

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin **40**

Literatur: Schaller, 1963; Ti, 1982



$\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_7$ [599,68]

2,44 g (8,2 mmol) N^4 -Isobutyryl-2'-desoxycytidin **39** wurden zusammen mit 51 mg (0,41 mmol) DMAP zweimal mit abs. Pyridin coevaporiert und danach in 80 ml abs. Pyridin gelöst. Nacheinander wurden 1,7 ml (12,3 mmol) Triethylamin und 3,66 g (10,8 mmol) Dimethoxytritylchlorid zugegeben. Man rührte für 2 h bei RT unter DC-Kontrolle. Da die Tritylierung nicht vollständig war, wurden 670 mg (2 mmol) Dimethoxytritylchlorid nachdosiert und weitere 2 h gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Methanol abgebrochen. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum abgezo-

gen und der Rückstand in 100 ml Chloroform aufgenommen. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 0 % bis 6 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 3,58 g (6,0 mmol, 73 %) weißer Schaum

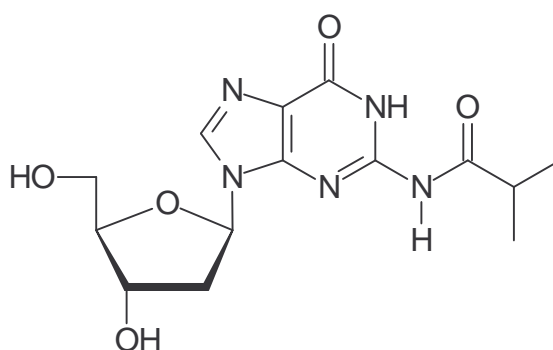
¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 8.28 (b, 1 H, N-H), 8.23 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, H-6), 7.42-7.16 (m, 9 H, DMTr-arom.), 7.22 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, H-5), 6.87-6.83 (m, 4 H, DMTr-arom.), 6.29 (ψt, 1 H, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, H-1'), 5.25 (b, 1 H, OH-3'), 4.53-4.47 (m, 1 H, H-3'), 4.17-4.13 (m, 1 H, H-4'), 3.80 (s, 6 H, 2 x O-CH₃), 3.52-3.37 (m, 2 H, H-5' und H-5''), 2.82-2.72 (m, 1 H, H-2'), 2.65-2.52 (h, 1 H, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, CH-Isobutyryl), 2.28-2.17 (m, 1 H, H-2''), 1.21 (d, 6 H, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, CH₃-Isobutyryl)

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,50

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 600,5

***N*²-Isobutyryl-2'-desoxyguanosin 41**

Literatur: Ti, 1982



C₁₄H₁₉N₅O₅ [337,33]

4,01 g (15 mmol) gut getrocknetes 2'-Desoxyguanosin wurden in 100 ml abs. Pyridin suspendiert und bei 0 °C mit 9,5 ml (75 mmol) Trimethylchlorsilan versetzt. Nach 30 min Rühren lag eine klare Lösung vor. Es wurden 12,5 ml (75 mmol) Isobuttersäureanhydrid

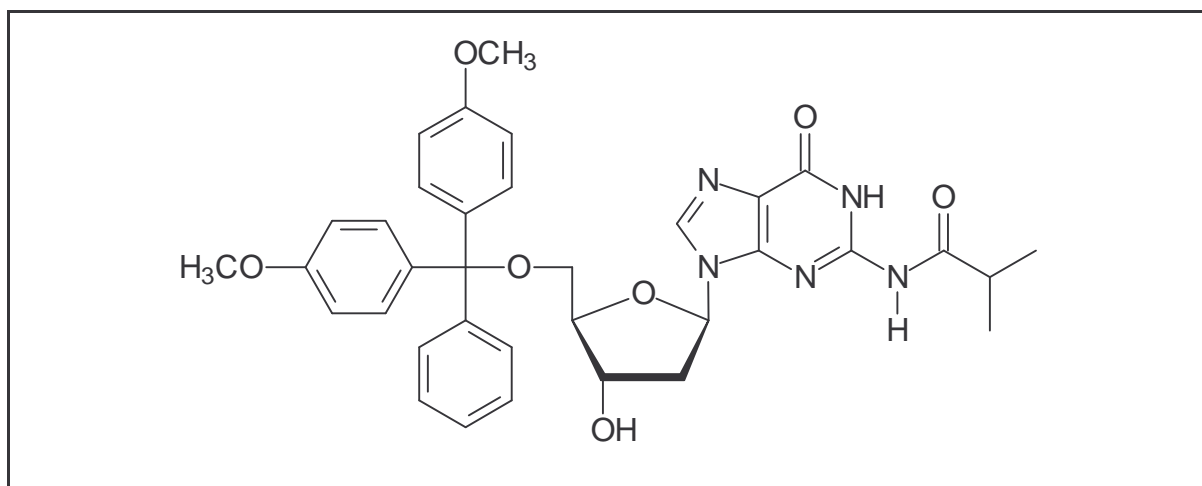
zugetropft und unter Erwärmung auf RT für 2 h gerührt. Nach erneutem Kühlen auf 0 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Eiswasser abgebrochen. Durch die Zugabe von 20 ml 25 %iger Ammoniaklösung und 30 minütigem Rühren wurden die Silylschutzgruppen entfernt. Am Rotationsverdampfer wurden die Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in 100 ml heißem Wasser gelöst. Die Wasserphase wurde zweimal mit je 50 ml heißem Essigsäureethylester gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 50 ml heißem Wasser reextrahiert. Aus den vereinigten wäßrigen Phasen kristallisierte das Produkt bei 4 °C über Nacht aus. Es wurde abgesaugt und über Phosphorpentoxid im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 4,20 g (12,5 mmol, 83 %) farblose Nadeln

¹H-NMR: 250 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm: 12.05 (b, 1 H, N-H), 11.65 (b, 1 H, N-H), 8.22 (s, 1 H, H-8), 6.20 (ψt, 1 H, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, H-1'), 5.29 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 3.7 Hz, OH-3'), 4.93 (t, 1 H, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, OH-5'), 4.36-4.33 (m, 1 H, H-3'), 3.84-3.79 (m, 1 H, H-4'), 3.59-3.47 (m, 2 H, H-5' und H-5''), 2.81-2.70 (h, 1 H, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, CH-Isobutyryl), 2.60-2.48 (m, 1 H, H-2'), 2.26 (ddd, 1 H, ²J_{H,H} = 12.9 Hz, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, H-2''), 1.11 (d, 6 H, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, CH₃-Isobutyryl)

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,21

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 336,2

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-N²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin**42****Literatur:** Gait, 1984**C₃₅H₃₇N₅O₇ [639,70]**

3,37 g (10 mmol) gut getrocknetes *N*²-Isobutyryl-2'-desoxyguanosin **41** wurden zusammen mit 61 mg (0,5 mmol) DMAP zweimal mit abs. Pyridin coevaporiert und danach in 80 ml abs. Pyridin suspendiert. Nacheinander wurden 2,1 ml (15 mmol) Triethylamin und 4,40 g (13 mmol) Dimethoxytritylchlorid zugesetzt. Es wurde 2 h bei RT unter DC-Kontrolle gerührt. Da die Tritylierung noch nicht vollständig war, wurden 670 mg (2 mmol) Dimethoxytritylchlorid nachdosiert. Nach weiteren 2 h Rühren wurde die Umsetzung durch Zugabe von 15 ml Methanol abgebrochen. Der Rückstand wurde nach Abziehen der Lösungsmittel im Vakuum in 100 ml Chloroform gelöst und dreimal mit Wasser gewaschen. Die wäßrigen Phasen wurden zweimal mit je 30 ml Chloroform reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 0 % bis 8 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 5,22 g (8,2 mmol, 82 %) farbloser Schaum

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 12.30 (b, 1 H, N-H), 10.25 (b, 1 H, N-H), 7.74 (s, 1 H, H-8), 7.29-6.98 (m, 9 H, DMTr-arom.), 6.64-6.61 (m, 4 H, DMTr-arom.), 6.08 (ψt, 1 H, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, H-1'), 4.95 (b, 1 H, OH-3'), 4.68-4.64 (m, 1 H, H-3'), 4.17-4.12 (m, 1 H, H-4'), 3.61 (s, 6 H, 2 x O-CH₃), 3.27-3.20 (m, 2 H, H-5' und H-5''), 2.66-2.50 (m, 2 H,

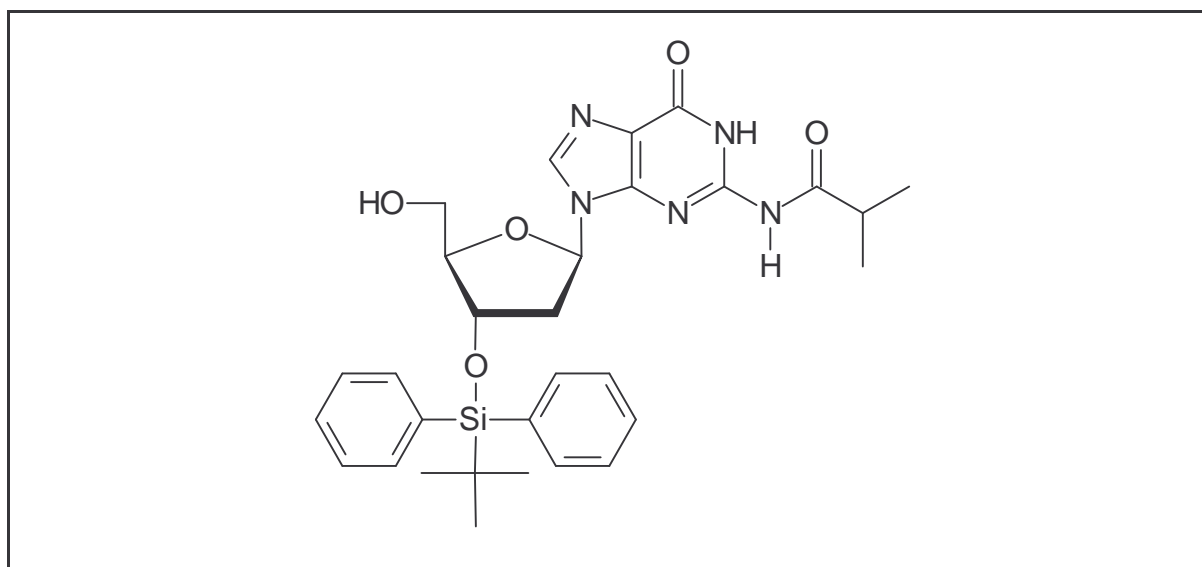
$^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH-Isobutyryl und H-2'), 2.43-2.33 (m, 1 H, H-2'), 1.05 (d, 6 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, CH₃-Isobutyryl)

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,44

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 640,6

***N*²-Isobutyryl-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin 43**

Literatur: Perbost, 1995



C₃₀H₃₇N₅O₅Si [575,73]

3,20 g (5,0 mmol) gut getrocknetes 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin 42 und 851 mg (12,5 mmol) Imidazol wurden in 40 ml abs. Pyridin gelöst. Innerhalb von 30 min wurden 1,9 ml (7,5 mmol) *tert*-Butyldiphenylchlorsilan zutropft und für 18 h bei RT gerührt. Eine DC-Kontrolle zeigte vollständigen Umsatz. Durch Zugabe von 10 ml Methanol wurde die Reaktion abgebrochen und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Pyridinreste wurden durch zweimalige Coevaporation mit Toluol entfernt. Nach Lösen des Rohprodukts in 5 ml Methanol wurden zur Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe 80 ml 80 %ige Essigsäure zugesetzt und 30 min bei RT gerührt. Die Essigsäure wurde unter mehrmaliger Zugabe von Wasser am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 200 ml Chloroform gelöst. Es wurde mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser neutral gewaschen. Die wäßrigen Phasen wurden zweimal mit je 50 ml Chloroform reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen

wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 0 % bis 8 % Methanol in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 2,42 g (4,2 mmol, 84 %) farbloser Schaum

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 11.96 (b, 1 H, N-H), 8.64 (b, 1 H, N-H), 7.61 (s, 1 H, H-8), 7.58-7.52 (m, 4 H, TBDPS-arom.), 7.41-7.25 (m, 6 H, TBDPS-arom.), 6.14 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 9.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, H-1'), 4.81 (b, 1 H, OH-5'), 4.53-4.51 (m, 1 H, H-3'), 4.03-4.01 (m, 1 H, H-4'), 3.64-3.59 (m, 1 H, H-5'), 3.16-3.08 (m, 1 H, H-5''), 2.62-2.50 (m, 2 H, CH-Isobutyryl und H-2'), 2.21-2.13 (m, 1 H, H-2''), 1.14 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, CH₃-Isobutyryl), 1.12 (d, 3 H, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, CH₃-Isobutyryl), 1.02 (s, 9 H, *tert*-Butyl)

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,54

ESI-MS [M-H]⁻: m/z 574,4

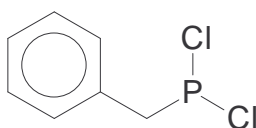
12.2.3 Benzylphosphonate

Übersicht:

- (Benzyl-dichloro)-phosphin **47**
- (Benzyl-chloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **48a/b**
- 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **49a/b**
- *N*⁶-Benzoyl-3'-*O*-[(benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenosin **50a/b**
- 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **51a/b**
- 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin **52a/b**
- Benzimidazoliumtriflat **53**
- ³¹P-Hochfeld-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin benzylphosphonat **54a**
- ³¹P-Tieffeld-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin benzylphosphonat **54b**
- ³¹P-Hochfeld-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidylyl-(3'→5')-*N*²-isobutyryl-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin benzylphosphonat **55a**
- ³¹P-Tieffeld-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidylyl-(3'→5')-*N*²-isobutyryl-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin benzylphosphonat **55b**

(Benzyl-dichloro)-phosphin **47**

Literatur: Rowley, 1974; Collins, 1974; Samstag, 1992; Samstag, 1994



C₇H₇Cl₂P [192,96]

In einem ausgeheizten 2l-Vierhalskolben wurden unter Argon 12,16 g (500 mmol) Magnesiumspäne in 130 ml trockenem Diethylether suspendiert. 58,2 ml (505 mmol) Benzylchlorid **44** wurden in 650 ml trockenem Diethylether gelöst und unter KPG-Rührung innerhalb von 90 min zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Lösung noch eine Stunde refluxiert. Die Benzylmagnesiumchloridlösung wurde auf 0 °C gekühlt. Die Ummetallierung wurde durch Zutropfen von 505 ml einer 1 M etherischen Zinkchloridlösung innerhalb einer Stunde erreicht. Dabei bildete sich ein grauer Niederschlag. Es wurde eine Stunde nachgerührt und die Suspension in einen Tropftrichter überführt.

In einem zweiten, ausgeheizten 2l-Vierhalskolben mit KPG-Rührer wurden 131 ml (1500 mmol) Phosphortrichlorid **46** in 260 ml trockenem Diethylether vorgelegt. Der siedenden Phosphortrichloridlösung wurde innerhalb von 75 min die zuvor hergestellte Benzylzinkchloridlösung **45** zugetropft. Es wurde eine weitere Stunde refluxiert, auf RT abgekühlt und der Niederschlag durch rasches Filtrieren über einen Büchner-Trichter abgetrennt. Der Niederschlag wurde mehrmals mit trockenem Diethylether gewaschen. Diethylether und überschüssiges Phosphortrichlorid wurden aus dem Filtrat bei Normaldruck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde durch fraktionierte Vakuumdestillation aufgereinigt.

Ausbeute: 40,0 g (207 mmol, 41 %) farbloses Destillat

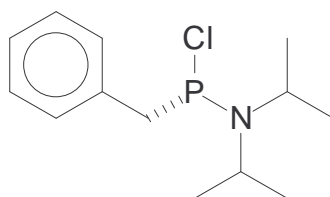
Siedepunkt: 125 - 130 °C / 15 mbar

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 7.39-7.24 (m, 5 H, Benzyl-arom.), 3.68 (d, 2 H, ²J_{H,H} = 15.4 Hz, CH₂-Benzyl)

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 179.2

(Benzyl-chloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **48a/b**

Literatur: Caruthers, 1987



C₁₃H₂₁ClNP [257,74]

In einem ausgeheizten 500 ml Schlenckkolben wurden unter Argon 40,0 g (207 mmol) (Benzyl-dichloro)-phosphin **47** in 200 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Kühlen auf -20 °C wurden innerhalb von 90 min 59 ml (415 mmol) frisch destilliertes *N,N*-Diisopropylamin zugetropft. Man ließ das Reaktionsgemisch auf RT kommen und rührte eine Stunde nach. Ausgefallenes Diisopropylammonium-Hydrochlorid wurde über eine Schlenckfritte über Argon abfiltriert. Das Dichlormethan wurde bei Normaldruck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde durch fraktionierte Destillation im Hochvakuum aufgereinigt.

Ausbeute: 21,8 g (84,6 mmol, 41 %) bei RT erstarrendes Destillat

Siedepunkt: 86 - 88 °C / 0,5 mbar

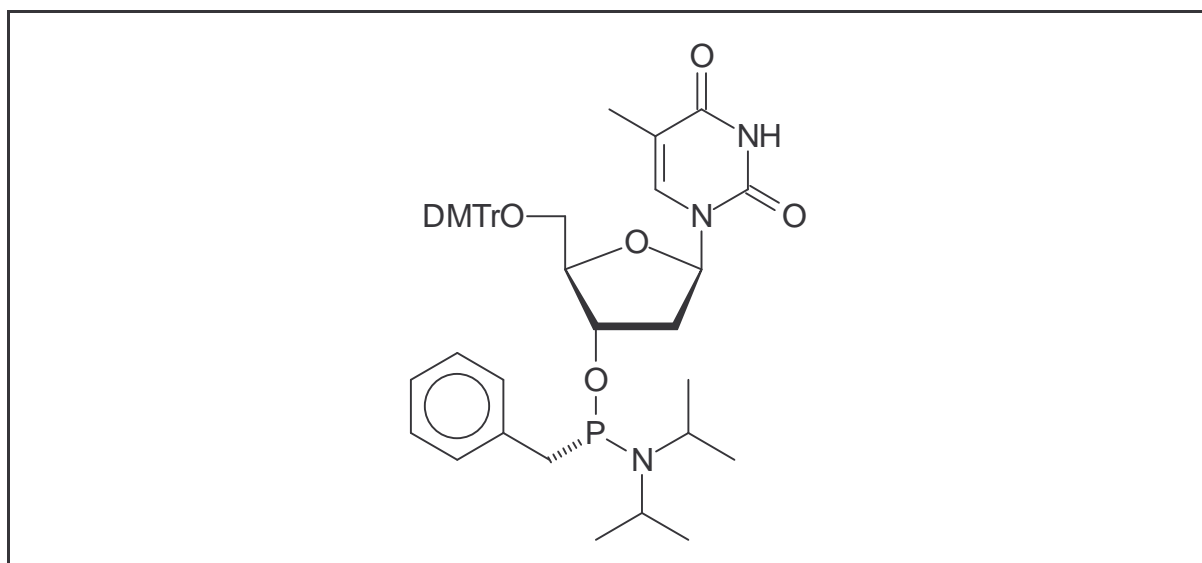
¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 7.34-7.15 (m, 5 H, Benzyl-arom.), 3.48 (m, 2 H, CH₂-Benzyl), 3.46 (m, 2 H, 2 x CH-Isopropyl), 1.29 (m, 6 H, 2 x CH₃-Isopropyl), 0.98 (d, 6 H, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2 x CH₃-Isopropyl)

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 134.5

(Signale der Diastereomeren trennten sich nicht auf)

3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **49a/b**

Literatur: Samstag, 1992; Samstag, 1994



C₄₄H₅₂N₃O₇P [765,89]

In einem ausgeheizten Schlenckkolben wurden unter Argon 1,63 g (3,0 mmol) über Phosphorpentoxid getrocknetes 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **33** eingewogen und in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Unter Rühren wurden 2,0 ml (12 mmol) frisch destilliertes Diisopropylethylamin und 1,16 g (4,5 mmol) (Benzyl-chloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **48a/b** nacheinander zugetropft. Der Ansatz rührte über Nacht (18 h) unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß. Danach zeigte die DC, daß die Phosphitylierung vollständig war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 487 µl (12 mmol) Methanol abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde mit 100 ml Essigester in einen Scheidetrichter überführt und je zweimal mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das rohe Phosphoramidit wurde durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von Essigester/*n*-Hexan/TEA = 33:66:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 1,96 g (2,56 mmol, 85 %) blaßgelber Schaum

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 9.12 (b, je 1 H, N-H), 7.62 und 7.52 (2s, je 1 H, H-6), 7.38-7.06 (m, je 9 H, DMTr-arom. und m, je 5 H, Benzyl-arom.), 6.83-6.78 (m, je 4 H, DMTr-arom.), 6.38 und 6.31 (2dd, je 1 H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, ³J_{H,H} = 5.5 Hz und ³J_{H,H} = 9.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, H-1'), 4.48-4.39 (m, je 1 H, H-3'), 4.08 und 3.68 (2m, je 1 H, H-4'), 3.78 (s, je 6 H, 2 x O-CH₃), 3.63-3.48 (m, je 2 H, 2 x CH-Isopropyl), 3.41-3.25 und 3.29-3.06 (2m, je 2 H, H-5' und H-5'), 3.26-3.06 (m, je 1 H, CH₂-Benzyl), 2.73-2.63 (m, je 1 H, CH₂-Benzyl), 2.47-2.39 und 2.29-2.21 (2m, 2 H, H-2' und H-2''), 2.08-2.01 und 1.81-1.74 (2m, 2 H, H-2' und H-2''), 1.38 und 1.35 (2s, je 3 H, CH₃-Thymin), 1.19, 1.06, 1.06, 1.04 (4d, je 12 H, ³J_{H,H} = je 6.7 Hz, 4 x CH₃-Isopropyl)

¹³C-NMR: 100.6 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 163.9 (C-4), 158.6 und 158.5 (2 x para-C-DMTr), 150.3 (C-2), 144.4 und 144.1 (C-DMTr), 136.8 und 136.7 (C-Benzyl), 135.8 und 135.7 (C-6), 135.4 und 135.3, 135.3 und 135.1 (2 x C-DMTr), 130.0-127.0 (12 x C-arom.), 125.4 und 124.5 (para-C-Benzyl und para-C-DMTr), 113.2 (4 x meta-C-DMTr), 111.1 und 111.0 (C-5), 86.9 und 86.8 (O-C-DMTr), 85.9 und 85.7 (C-4'), 84.9 und 84.5 (C-1'), 78.1, 77.9 und 76.6, 76.4 (C-3'), 63.7 und 63.5 (C-5'), 55.2 (2 x O-CH₃), 44.7 und 44.6 (2 x CH-Isopropyl), 40.5 (CH₂-Benzyl), 40.3 und 39.5 (C-2'), 24.5 und 24.1 (4 x CH₃-Isopropyl), 11.6 und 11.5 (CH₃-Thymin)

$^{31}\text{P-NMR}$: 162.0 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 128.6 und 126.3

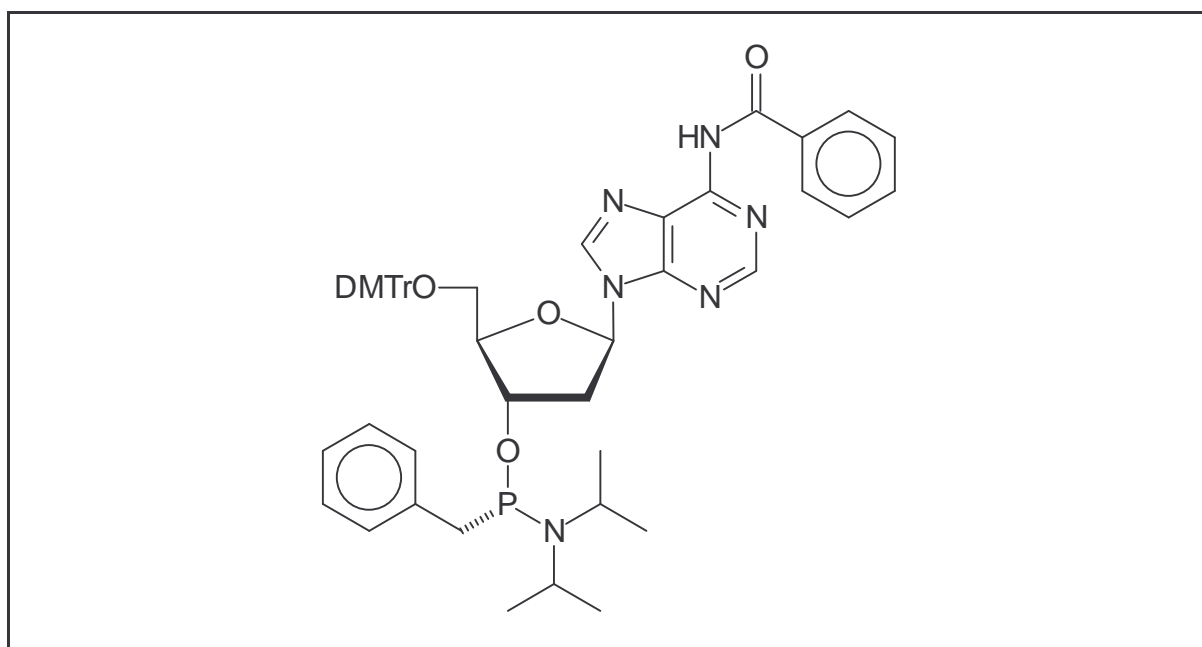
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

DC: R_f (Essigester/n-Hexan/TEA 66:33:1) = 0,63 für beide Diastereomere

ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 766,6

N^6 -Benzoyl-3'-O-[(benzyl- N,N -diisopropylamino)-phosphin]-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenosin 50a/b

Literatur: Samstag, 1992; Samstag, 1994



$\text{C}_{51}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_6\text{P}$ [879,01]

In einem ausgeheizten Schlenckkolben wurden unter Argon 1,64 g (2,5 mmol) über Phosphorpentoxid getrocknetes N^6 -Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenosin **36** eingewogen und in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Unter Rühren wurden 1,7 ml (10 mmol) frisch destilliertes Diisopropylethylamin und 967 mg (3,75 mmol) (Benzyl-chloro- N,N -diisopropylamino)-phosphin **48a/b** nacheinander zugetropft. Der Ansatz rührte über Nacht (18 h) unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß. Danach zeigte die DC, daß die Phosphitylierung vollständig war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 406 μl (10 mmol) Methanol abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde mit 100 ml Essigester in einen Scheidetrichter überführt und je zweimal mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische

Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das rohe Phosphoramidit wurde durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von Essigester/n-Hexan/TEA = 49:49:2 aufgereinigt.

Ausbeute: 1,61 g (1,83 mmol, 73 %) blaßgelber Schaum

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 9.15 (b, je 1 H, N-H), 8.75 und 8.68 (2s, je 1 H, H-2), 8.17 und 7.99 (2s, je 1 H, H-8), 8.02-7.98 (m, je 2 H, ortho-H-Benzoyl), 7.59-7.10 (m, je 9 H, DMTr-arom. und m, je 5 H, Benzyl-arom. und m, je 3 H, meta- und para-H-Benzoyl), 6.78-6.75 (m, je 4 H, DMTr-arom.), 6.46 und 6.03 (2dd, je 1 H, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, ³J_{H,H} = 5.9 Hz und ³J_{H,H} = 8.5 Hz, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, H-1'), 4.60-4.55 und 4.53-4.49 (2m, je 1 H, H-3'), 4.24 und 3.91 (2m, je 1 H, H-4'), 3.75 (2s, je 6 H, 2 x O-CH₃), 3.59-3.57 (m, je 2 H, 2 x CH-Isopropyl), 3.37-3.28 und 3.29-3.10 (2m, je 2 H, H-5' und H-5''), 3.26-3.15 (m, je 1 H, CH₂-Benzyl), 2.83-2.76 und 2.64-2.57 (2m, 2 H, H-2' und H-2''), 2.79-2.68 (m, je 1 H, CH₂-Benzyl), 2.70-2.60 und 1.94-1.90 (2m, 2 H, H-2' und H-2''), 1.20, 1.14, 1.11, 1.06 (4d, je 12 H, ³J_{H,H} = je 6.7 Hz, 4 x CH₃-Isopropyl)

Die unterstrichenen Daten gehören zum Diastereomer mit dem höheren R_f-Wert.

¹³C-NMR: 100.6 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 164.6 (C=O-Benzoyl), 158.5 und 158.4 (2 x para-C-DMTr), 152.5 und 152.4 (C-2), 151.7 und 151.6 (C-6), 149.5 und 149.4 (C-4), 144.5 und 144.4 (C-DMTr), 141.7 und 141.4 (C-8), 137.2 und 136.9 (C-Benzyl), 135.7 und 135.6, 135.6 und 135.5 (2 x C-DMTr), 133.7 (C-Benzoyl), 132.6 (para-C-Benzoyl), 130.0-125.6 (18 x C-arom.), 123.6 und 123.5 (C-5), 113.1 (4 x meta-C-DMTr), 86.5 und 86.4 (O-C-DMTr), 86.2 und 86.1 (C-4'), 84.9 und 84.6 (C-1'), 77.4, 77.1 und 76.7, 76.4 (C-3'), 63.7 und 63.4 (C-5'), 55.2 (2 x O-CH₃), 44.7 und 44.6 (2 x CH-Isopropyl), 40.8 und 40.5 (CH₂-Benzyl), 40.3 und 38.4 (C-2'), 24.5 und 24.2 (4 x CH₃-Isopropyl)

Die unterstrichenen Daten gehören zum Diastereomer mit dem höheren R_f-Wert.

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 127.1 und 126.2

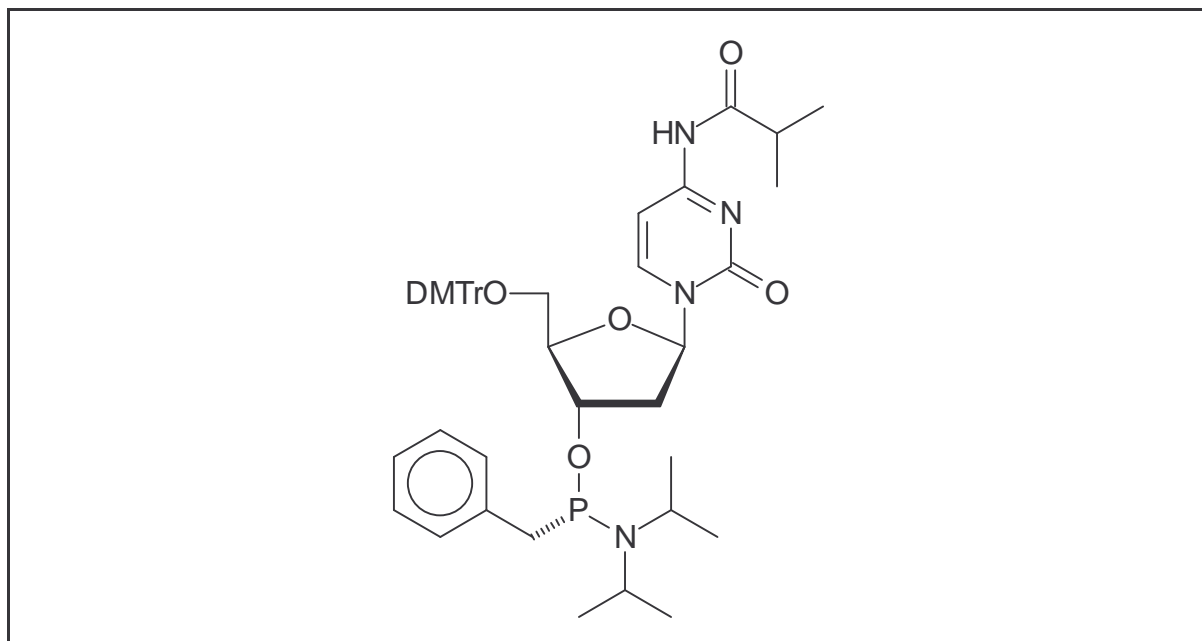
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

DC: R_f (Essigester/n-Hexan/TEA 66:33:1) = 0,45 und 0,35

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 879,7

3'-O-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin 51a/b

Literatur: Samstag, 1992; Samstag, 1994



C₄₇H₅₇N₄O₇P [820,96]

In einem ausgeheizten Schlenckkolben wurden unter Argon 1,80 g (3,0 mmol) über Phosphorpentoxid getrocknetes 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **40** eingewogen und in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Unter Rühren wurden 2,0 ml (12 mmol) frisch destilliertes Diisopropylethylamin und 1,16 g (4,5 mmol) (Benzyl-chloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **48a/b** nacheinander zugetropft. Der Ansatz rührte über Nacht (18 h) unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß. Danach zeigte die DC, daß die Phosphitylierung vollständig war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 487 µl (12 mmol) Methanol abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde mit 100 ml Essigester in einen Scheidetrichter überführt und je zweimal mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das rohe Phosphoramidit wurde durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von Essigester/*n*-Hexan/TEA = 44:54:2 aufgereinigt.

Ausbeute: 1,85 g (2,25 mmol, 75 %) blaßgelber Schaum

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 8.88 (b, je 1 H, N-H), 8.19 und 8.07 (2d, je 1 H, ³J_{H,H} = je 7.5 Hz, H-6), 7.36-7.06 (m, je 9 H, DMTr-arom. und m, je 5 H, Benzyl-arom. und 2d, je 1 H, H-5), 6.84-6.80 (m, je 4 H, DMTr-arom.), 6.22 (ψt, je 1 H, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, H-1'), 4.45 und 4.37 (2m, je 1 H, H-3'), 4.19 und 3.76 (2m, je 1 H, H-4'), 3.79 (s, je 6 H, 2 x O-CH₃), 3.61-3.49 (m, je 2 H, 2 x CH-Isopropyl), 3.44-3.30 und 3.24-3.08 (2m, je 2 H, H-5' und H-5''), 3.17-3.08 (m, je 1 H, CH₂-Benzyl), 2.78-2.63 (m, je 1 H, CH₂-Benzyl und m, je 1 H, CH-Isobutyryl), 2.78-2.63 und 2.19-2.14 (2m, 2 H, H-2' und H-2''), 2.28-2.21 und 1.99-1.92 (2m, 2 H, H-2' und H-2''), 1.21-1.18 (3d, je 9 H, 1 x CH₃-Isopropyl und 2 x CH₃-Isobutyryl), 1.06-1.01 (3d, je 9 H, 3 x CH₃-Isopropyl)

¹³C-NMR: 100.6 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 176.9 (C=O-Isobutyryl), 162.3 und 162.2 (C-4), 158.6 und 158.5 (2 x para-C-DMTr), 155.1 und 154.9 (C-2), 144.6 und 144.4 (C-DMTr), 144.0 und 143.9 (C-6), 136.8 und 136.7 (C-Benzyl), 135.5 und 135.3, 135.2 und 135.1 (2 x C-DMTr), 130.0-127.0 (12 x C-arom.), 125.5 und 124.5 (para-C-Benzyl und para-C-DMTr), 113.1 (4 x meta-C-DMTr), 96.1 und 96.0 (C-5), 87.1 und 87.0 (O-C-DMTr), 86.8 und 86.7 (C-1'), 86.1 und 86.0 (C-4'), 76.5, 76.3 und 75.2, 75.0 (C-3'), 63.0 und 62.3 (C-5'), 55.1 (2 x O-CH₃), 44.7 und 44.6 (2 x CH-Isopropyl), 41.4 und 40.9 (C-2'), 40.4 und 40.3 (CH₂-Benzyl), 36.4 (CH-Isobutyryl), 24.5 und 24.2 (4 x CH₃-Isopropyl), 19.1 und 18.9 (2 x CH₃-Isobutyryl)

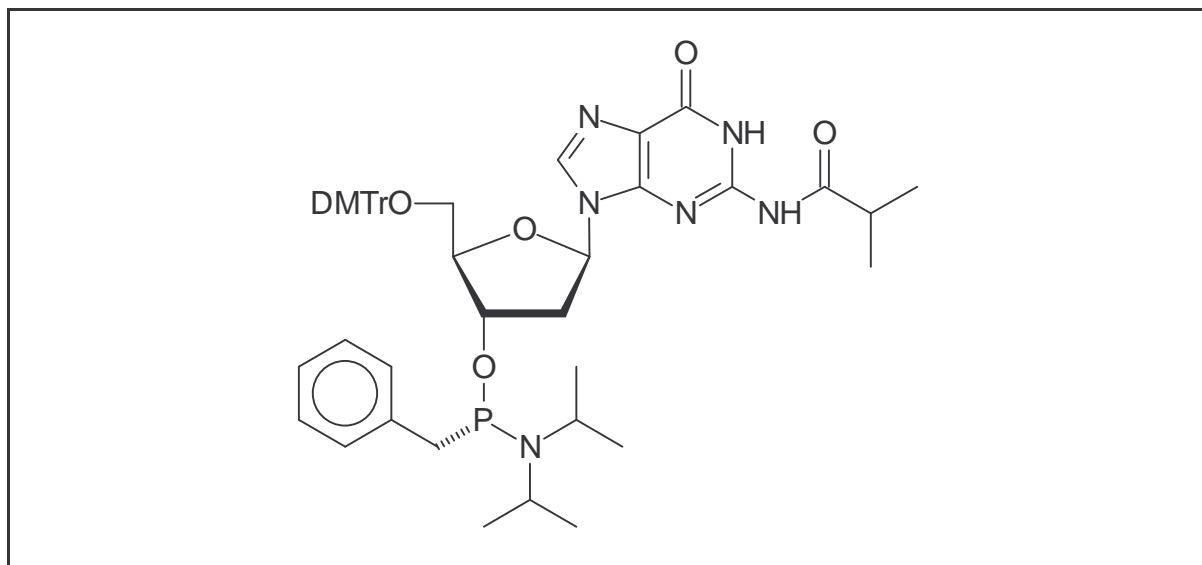
³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 128.6 und 127.4
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

DC: R_f (Essigester/n-Hexan/TEA 66:33:1) = 0,24 und 0,16

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 821,7

3'-O-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin 52a/b

Literatur: Samstag, 1992; Samstag, 1994



C₄₈H₆₇N₆O₇P [860,99]

In einem ausgeheizten Schlenckkolben wurden unter Argon 1,92 g (3,0 mmol) über Phosphorpentoxid getrocknetes 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin **42** eingewogen und in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Unter Rühren wurden 2,0 ml (12 mmol) frisch destilliertes Diisopropylethylamin und 1,16 g (4,5 mmol) (Benzyl-chloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **48a/b** nacheinander zutropft. Der Ansatz rührte über Nacht (18 h) unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß. Danach zeigte die DC, daß die Phosphitylierung vollständig war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 487 µl (12 mmol) Methanol abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde mit 100 ml Essigester in einen Scheidetrichter überführt und je zweimal mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das rohe Phosphoramidit wurde durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von Essigester/TEA = 99:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 1,75 g (2,03 mmol, 68 %) blaßgelber Schaum

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 11.95 (b, je 1 H, N-H), 8.05 (b, je 1 H, N-H), 7.79 und 7.65 (2s, je 1 H, H-8), 7.48-7.08 (m, je 9 H, DMTr-arom. und m, je 5 H, Benzyl-arom.), 6.79-6.74 (m, je 4 H, DMTr-arom.), 6.09 und 5.77 (2dd, je 1 H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.2 Hz und ³J_{H,H} = 9.2 Hz, ³J_{H,H} = 4.9 Hz, H-1'), 4.57-4.52 und 4.52-4.47 (2m, je 1 H, H-3'), 4.12 und 3.87 (2m, je 1 H, H-4'), 3.75 (2s, je 6 H, 2 x O-CH₃), 3.57-3.46 (m, je 2 H, 2 x CH-Isopropyl), 3.38-3.03 und 3.28-2.94 (2m, je 2 H, H-5' und H-5''), 3.17-3.03 (m, je 1 H, CH₂-Benzyl), 2.95-2.89 und 2.42-2.37 (2m, 2 H, H-2' und H-2''), 2.77-2.66 (m, je 1 H, CH₂-Benzyl), 1.94 und 1.76 (m, je 1 H, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, CH-Isobutyryl), 2.80-2.70 und 1.83-1.78 (2m, 2 H, H-2' und H-2''), 1.14, 1.05, 1.01, 0.94, 0.86 und 0.77 (6d, je 18 H, ³J_{H,H} = je 6.8 Hz, 4 x CH₃-Isopropyl und 2 x CH₃-Isobutyryl)

Die unterstrichenen Daten gehören zum Diastereomer mit dem höheren R_f-Wert.

¹³C-NMR: 100.6 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 178.3 (C=O-Isobutyryl), 158.6 und 158.5 (2 x para-C-DMTr), 155.5 (C-6), 148.2 und 148.1 (C-2), 147.1 und 146.9 (C-4), 144.8 (C-DMTr), 138.1 und 137.9 (C-Benzyl), 137.2 und 136.8 (C-8), 136.0 und 135.8, 135.8 und 135.6 (2 x C-DMTr), 130.0-125.6 (14 x C-arom.), 122.3 und 122.1 (C-5), 113.1 (4 x meta-C-DMTr), 86.2 und 86.1 (O-C-DMTr), 86.0 und 85.9 (C-4'), 84.8 und 84.7 (C-1'), 76.7, 76.5 und 76.1, 75.9 (C-3'), 63.6 (C-5'), 55.2 (2 x O-CH₃), 44.7 und 44.6 (2 x CH-Isopropyl), 40.4 und 40.1 (CH₂-Benzyl), 39.8 und 38.5 (C-2'), 36.0 (CH-Isobutyryl), 24.5 und 24.2 (4 x CH₃-Isopropyl), 18.6 und 18.5 (2 x CH₃-Isobutyryl)

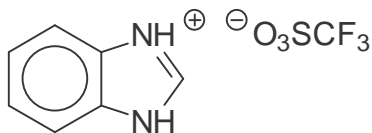
Die unterstrichenen Daten gehören zum Diastereomer mit dem höheren R_f-Wert.

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 126.2 und 125.9

zwei Diastereomere im Verhältnis 2 : 3

DC: R_f (Essigester/n-Hexan/TEA 66:33:1) = 0,18 für beide Diastereomere

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 861,7

Benzimidazoliumtriflat 53**Literatur:** Hayakawa, 1996

In einem ausgeheizten 500 ml Rundkolben wurden unter Argon 10 ml (110 mmol) Trifluormethansulfonsäure aus einer frisch geöffneten Ampulle vorgelegt. Nach Zugabe von 150 ml trockenem Dichlormethan wurde unter Rühren eine Suspension von 13,0 g (110 mmol) Benzimidazol in ebenfalls 150 ml trockenem Dichlormethan zugetropft. Die Zugabe verlief unter leichter Wärmeentwicklung. Nach vollständiger Zugabe wurde 2 h nachgerührt. Das Rohprodukt fiel in Form eines blaß violetten, feinkristallinen Niederschlags aus. Es wurde abfiltriert und mehrmals mit trockenem Dichlormethan gewaschen. Das rohe Produkt wurde aus 400 ml Essigester/Acetonitril = 4:1 umkristallisiert. Nach Abfiltrieren und Waschen mit Dichlormethan wurden die violetten Nadeln im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 24,3 g (91 mmol, 82 %) violette Nadeln**Schmelzpkt.:** 214 - 215 °C Lit.: 188 - 190 °C (Hayakawa, 1996)**¹H-NMR:** 250 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm: 13.80 (b, 2 H, 2 x NH), 9.59 (s, 1 H, N=CH-N), 7.96-7.87 (m, 2 H, arom.), 7.67-7.59 (m, 2 H, arom.)**Elementaranalyse:** berechnet: C 35,83 % H 2,63 % N 10,44 %

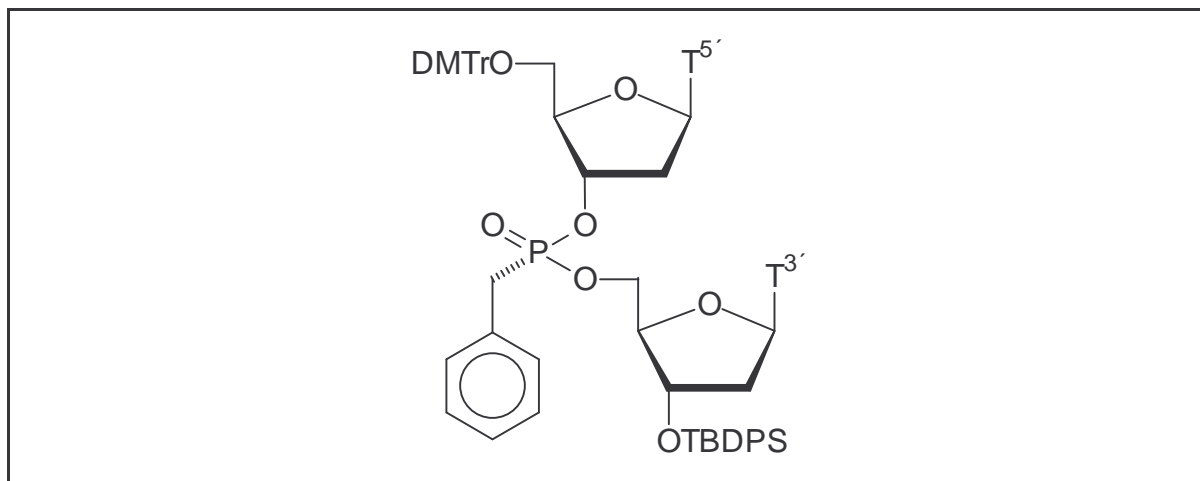
gefunden: C 35,68 % H 2,70 % N 10,67 %

ESI-MS [M-H]: m/z 148,8**ESI-MS [M+H]⁺:** m/z 118,6

³¹P-Hochfeld-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin benzylphosphonat 54a

³¹P-Tieffeld-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin benzylphosphonat 54b

Literatur: Samstag, 1992; Samstag, 1994; Hayakawa, 1996



C₆₄H₆₉N₄O₁₃PSi [1161,33]

In einen ausgeheizten 50 ml-Schlenckkolben wurden 383 mg (500 µmol) 3'-O-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin 49a/b, 216 mg (450 µmol) 3'-O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-thymidin 34 und 201 mg (750 µmol) des Aktivators Benzimidazoliumtriflat 53 eingewogen. Das Substanzgemisch wurde über Nacht über Phosphorpentoxid im Exsikkator unter Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon wurde die Reaktion durch Lösen der Reaktionspartner in 10 ml trockenem Acetonitril gestartet. Nach 20 min Rühren wurde durch Zugabe von 340 µl (1000 µmol) einer 3M-Lösung von TBHP in Isooctan oxidiert. Nach weiteren 5 min Rühren wurde die Reaktionslösung mit Essigester in einen Scheidetrichter überführt und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Ein ³¹P-NMR-Spektrum des Rohprodukts ergab ein Diastereomerenverhältnis von Tieffeld-Isomer zu Hochfeld-Isomer von 40:60. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte am Chromatotron mit einem Stufengradienten von 1 % bis 8 % Methanol in Dichlormethan. Die Trennung der Diastereomeren gelang durch präparative Normalphasen-HPLC mit einem Eluenten von *n*-Hexan/Isopropanol = 2:1.

Ausbeute: 472 mg (406 μ mol, 91 %) des Diastereomergemischs nach Chromatographie am Chromatotron als weißen Schaum

³¹P-Hochfeld-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-O-(tert-butyl-diphenylsilyl)-thymidin benzylphosphonat 54a

Ausbeute: 147 mg (127 μ mol, 25 %) nach Isomerentrennung durch HPLC

¹H-NMR: 600 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 9.42 und 9.39 (2s, 2 H, 2 x N-H), 7.64-7.07 (m, 9 H, DMTr-arom. und m, 10 H, TBDPS-arom. und m, 5 H, Benzyl-arom. und 2s, 2 H, 2 x H-6), 6.83-6.81 (m, 4 H, DMTr-arom.), 6.35 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 8.8 Hz, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, H-1' T5'), 6.33 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, H-1' T3'), 5.00-4.98 (m, 1 H, H-3' T5'), 4.26-4.24 (m, 1 H, H-3' T3'), 4.05 (m, 1 H, H-4' T3'), 3.86-3.83 (m, 1 H, H-5' T3'), 3.81 (m, 1 H, H-4' T5'), 3.77 (s, 6 H, 2 x O-CH₃), 3.55-3.51 (m, 1 H, H-5'' T3'), 3.34-3.32 (m, 1 H, H-5' T5'), 3.02-2.99 (m, 1 H, H-5'' T5'), 3.03-2.92 (m, 2 H, ²J_{H,H} = 14.9 Hz, ²J_{P,H} = 21.4 Hz, CH₂-Benzyl), 2.38-2.33 (m, 1 H, H-2' T5'), 2.28-2.23 (m, 2 H, H-2' T3' und H-2'' T5'), 1.85 (s, 3 H, CH₃-Thymin), 1.69-1.64 (m, 1 H, H-2'' T3'), 1.34 (s, 3 H, CH₃-Thymin), 1.08 (s, 9 H, tert-Butyl-TBDPS)

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 27.58

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,73

ESI-MS [M+NH₄]⁺: m/z 1178,8

³¹P-Tieffeld-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-O-(tert-butyl-diphenylsilyl)-thymidin benzylphosphonat 54b

Ausbeute: 66 mg (57 μ mol, 11 %) nach Isomerentrennung durch HPLC

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 9.29 und 9.17 (2s, 2 H, 2 x N-H), 7.63-7.07 (m, 9 H, DMTr-arom. und m, 10 H, TBDPS-arom. und m, 5 H, Benzyl-arom. und 2s, 2 H, 2 x H-6), 6.82-6.80 (m, 4 H, DMTr-arom.), 6.36 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, H-1' T3'), 6.33 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, H-1' T5'), 5.00-4.98 (m, 1 H, H-3' T5'),

4.19-4.17 (m, 1 H, H-3' T3'), 3.99 (m, 1 H, H-4' T5'), 3.98 (m, 1 H, H-4' T3'), 3.76 (s, 6 H, 2 x O-CH₃), 3.68-3.61 (m, 1 H, H-5' T3'), 3.57-3.52 (m, 1 H, H-5'' T3'), 3.37-3.34 (m, 1 H, H-5' T5'), 3.26-3.23 (m, 1 H, H-5'' T5'), 3.16-2.98 (m, 2 H, ²J_{H,H} = 14.8 Hz, ²J_{P,H} = 21.5 Hz, CH₂-Benzyl), 2.24-2.20 (m, 1 H, H-2' T3'), 2.16-2.13 (m, 2 H, H-2' T5' und H-2'' T5'), 1.84 (s, 3 H, CH₃-Thymin), 1.64-1.55 (m, 1 H, H-2'' T3'), 1.36 (s, 3 H, CH₃-Thymin), 1.08 (s, 9 H, *tert*-Butyl-TBDPS)

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 28.58

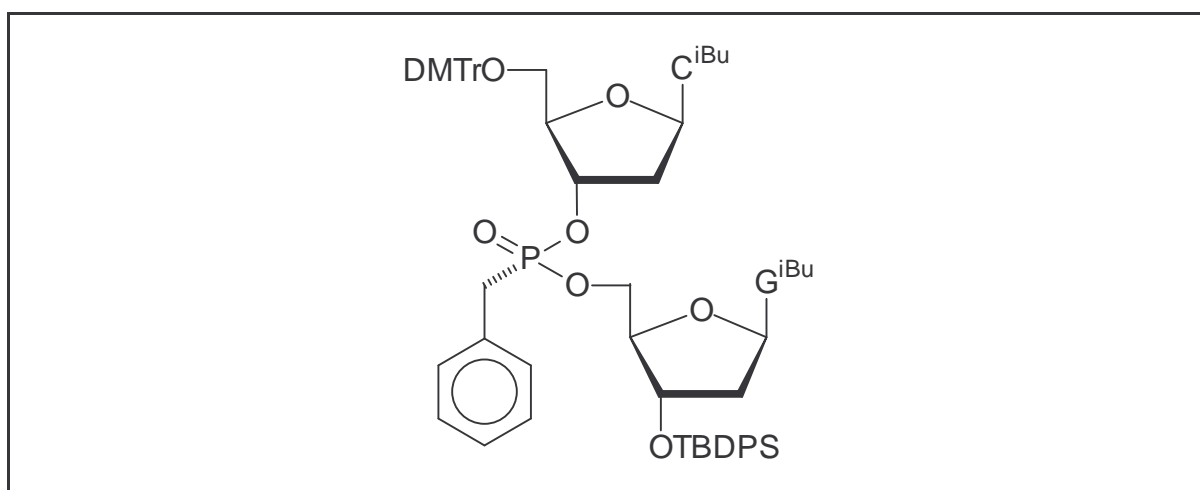
DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,69

ESI-MS [M+NH₄]⁺: m/z 1178,8

³¹P-Hochfeld-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-N⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidylyl-(3'→5')-N²-isobutyryl-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin benzylphosphonat 55a

³¹P-Tieffeld-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-N⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidylyl-(3'→5')-N²-isobutyryl-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin benzylphosphonat 55b

Literatur: Samstag, 1992; Samstag, 1994; Hayakawa, 1996



C₇₁H₇₉N₈O₁₃PSi [1311,51]

In einen ausgeheizten 50 ml-Schlenckkolben wurden 431 mg (525 μmol) 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **51a/b**, 288 mg (500 μmol) *N*²-Isobutyryl-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin **43** und 215 mg (800 μmol) des Aktivators Benzimidazoliumtriflat **53** eingewogen. Das Substanzgemisch wurde über Nacht über Phosphorpentoxid im Exsikkator unter Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon wurde die Reaktion durch Lösen der Reaktionspartner in 10 ml trockenem Acetonitril gestartet. Nach 20 min Rühren wurde durch Zugabe von 367 μl (1100 μmol) einer 3M-Lösung von TBHP in Isooctan oxidiert. Nach weiteren 5 min Rühren wurde die Reaktionslösung mit Essigester in einen Scheidetrichter überführt und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Ein ³¹P-NMR-Spektrum des Rohprodukts ergab ein Diastereomerenverhältnis von Tieffeld-Isomer zu Hochfeld-Isomer von 24:76. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte am Chromatotron mit einem Stufengradienten von 1 % bis 5 % Methanol in Dichlormethan. Die Trennung der Diastereomeren gelang durch präparative Normalphasen-HPLC mit einem Eluenten von Essigsäuremethylester/Dioxan = 10:1.

Ausbeute: 546 mg (416 μmol , 79 %) des Diastereomerengemischs nach Chromatographie am Chromatotron als weißen Schaum

³¹P-Hochfeld-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidylyl-(3'→5')-*N*²-isobutyryl-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin benzylphosphonat **55a**

Ausbeute: 174 mg (133 μmol , 25 %) nach Isomerentrennung durch HPLC

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 12.05 (b, 1 H, N-H G3'), 10.57 (b, 1 H, N-H G3'), 8.68 (b, 1 H, N-H C5'), 7.90 (d, 1 H, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, H-6), 7.67-7.06 (m, 9 H, DMTr-arom. und m, 10 H, TBDPS-arom. und m, 5 H, Benzyl-arom. und s, 1 H, H-8 und s, 1 H, H-5), 6.82-6.78 (m, 4 H, DMTr-arom.), 6.20 (dd, 1 H, ³J_{H,H} = 9.2 Hz, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, H-1' G3'), 6.14 (ψ t, 1 H, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, H-1' C5'), 4.88 (m, 1 H, H-3' C5'), 4.31-4.27 (m, 2 H, H-3' G3' und H-4' G3'), 4.18-4.13 (m, 1 H, H-5' G3'), 4.05 (m, 1 H, H-4' C5'), 4.02-3.95 (m, 1 H, H-5'' G3'), 3.77 (s, 6 H, 2 x O-CH₃), 3.23-3.11 (m, 2 H, H-5' und H-5'' C5'), 3.07-2.91 (m, 2 H, ²J_{H,H} = 15.0 Hz, ²J_{P,H} = 21.7 Hz, CH₂-Benzyl), 2.76-2.71 (m, 1 H, H-2')

C5'), 2.67-2.50 (2h, 2 H, $^3J_{H,H} = 6.9$ und 6.7 Hz, 2 x CH-Isobutyryl und m, 1 H, H-2' G3'), 2.19-2.11 (m, 2 H, H-2'' C5' und H-2'' G3'), 1.22 und 1.20 (2d, 6 H, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz und $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2 x CH₃-Isobutyryl), 1.15 (d, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 1 x CH₃-Isobutyryl), 1.12 (s, 9 H, *tert*-Butyl-TBDPS), 0.87 (d, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 1 x CH₃-Isobutyryl)

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 27.58

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,58

ESI-MS [M+NH₄]⁺: m/z 1329,0

³¹P-Tieffeld-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-N⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidylyl-(3'→5')-N²-isobutyryl-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin benzylphosphonat 55b

Ausbeute: 47 mg (36 μmol, 7 %) nach Isomerentrennung durch HPLC

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 12.14 (b, 1 H, N-H G3'), 10.51 (b, 1 H, N-H G3'), 8.77 (b, 1 H, N-H C5'), 8.03 (d, 1 H, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, H-6), 7.64-7.06 (m, 9 H, DMTr-arom. und m, 10 H, TBDPS-arom. und m, 5 H, Benzyl-arom. und s, 1 H, H-8 und s, 1 H, H-5), 6.80-6.77 (m, 4 H, DMTr-arom.), 6.26 (dd, 1 H, $^3J_{H,H} = 9.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.4$ Hz, H-1' G3'), 6.14 (dd, 1 H, $^3J_{H,H} = 9.8$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.2$ Hz, H-1' C5'), 4.92 (m, 1 H, H-3' C5'), 4.27 (m, 2 H, H-3' G3') 4.20-4.19 (m, 1 H, H-4' G3'), 4.12 (m, 1 H, H-4' C5'), 4.10-4.07 (m, 1 H, H-5' G3'), 3.74 (s, 6 H, 2 x O-CH₃), 3.66-3.58 (m, 1 H, H-5'' G3'), 3.34-3.21 (m, 2 H, H-5' und H-5'' C5'), 3.18-2.94 (m, 2 H, $^2J_{H,H} = 15.1$ Hz, $^2J_{P,H} = 21.4$ Hz, CH₂-Benzyl), 2.77-2.71 (m, 2 H, H-2' G3' und h, 1 H, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, CH-Isobutyryl), 2.70-2.63 (m, 1 H, H-2' C5'), 2.58-2.51 (h, 1 H, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, CH-Isobutyryl), 2.25-2.20 (m, 1 H, H-2'' G3'), 2.17-2.13 (m, 1 H, H-2'' C5'), 1.23 und 1.21 (2d, 6 H, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz und $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2 x CH₃-Isobutyryl), 1.14 (d, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 1 x CH₃-Isobutyryl), 1.10 (s, 9 H, *tert*-Butyl-TBDPS), 1.01 (d, 3 H, $^3J_{H,H} = 6.8$ Hz, 1 x CH₃-Isobutyryl)

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 29.53

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,59

ESI-MS [M+NH₄]⁺: m/z 1329,0

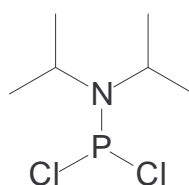
12.2.4 Fluorphosphonate

Übersicht:

- (Dichloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **63**
- [*N,N*-Diisopropylamino-*di-O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin **65**
- 3'-*O*-{[*N,N*-Diisopropylamino-*O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin}-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytri-phenylmethyl)-thymidin **66a/b**
- 3'-*O*-[*N,N*-Diisopropylamino-fluoro]-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenyl-methyl)-thymidin **68a/b**
- *N*⁴-Benzoyl-3'-*O*-{[*N,N*-diisopropylamino-*O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin}-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin **67a/b**
- *N*⁴-Benzoyl-3'-*O*-[*N,N*-diisopropylamino-fluoro]-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytri-phenylmethyl)-2'-desoxycytidin **69a/b**
- (Rp/Sp)-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-*O*-(*tert*-butyldi-phenylsilyl)-thymidin phosphorfluoridit **70a/b**
- (Rp/Sp)-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-*O*-(*tert*-butyldi-phenylsilyl)-thymidin phosphorfluoridat **72a/b**
- (Rp/Sp)-*N*⁴-Benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidylyl-(3'→5')-*N*²-benzoyl-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin phosphorfluori-dit **71a/b**
- (Rp/Sp)-*N*⁴-Benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidylyl-(3'→5')-*N*²-benzoyl-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin phosphorfluori-dat **73a/b**

(Dichloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **63**

Literatur: Caruthers, 1987



C₆H₁₄Cl₂NP [202,06]

In einem ausgeheizten 2l-Dreihalskolben mit KPG-Rührer wurden unter Argon 58 ml (660 mmol) Phosphortrichlorid **46** in 550 ml über Natriumdraht getrocknetem Petrolether gelöst. Nach Kühlen mit Eis auf 5 °C wurden innerhalb von 30 min 185 ml (1,32 mol) frisch destilliertes *N,N*-Diisopropylamin gelöst in 200 ml trockenem Petrolether zugetropft. Um die Rührfähigkeit des Reaktionsgemischs zu gewährleisten, wurden noch weitere 300 ml trockener Petrolether zugegeben. Man ließ das Reaktionsgemisch auf RT erwärmen und rührte zwei Stunden nach. Ausgefallenes Diisopropylammonium-Hydrochlorid wurde rasch über einen Büchner-Trichter abfiltriert. Der Niederschlag wurde mehrmals mit trockenem Petrolether gewaschen. Petrolether und überschüssiges Phosphortrichlorid **46** wurden aus dem Filtrat bei Normaldruck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde durch fraktionierte Vakuumdestillation im Hochvakuum aufgereinigt.

Ausbeute: 93,7 g (464 mmol, 70 %) bei RT erstarrendes Destillat

Siedepunkt.: 55 - 58 °C / 0,5 mbar

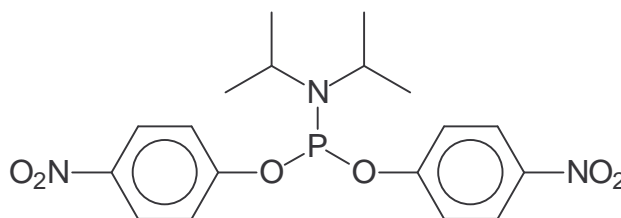
Schmelzpkt.: ~ 22 °C

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 3.92 (h, 2 H, ³J_{H,H} = je 6.8 Hz, 2 x CH-Isopropyl), 1.27 (d, 12 H, ³J_{H,H} = je 6.8 Hz, 4 x CH₃-Isopropyl)

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 170.2

[*N,N*-Diisopropylamino-*di-O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin **65**

Literatur: Helinski, 1991; Helinski, 1993a



C₁₈H₂₂N₃O₆P [407,36]

In einem ausgeheizten 250 ml-Schlenckkolben wurden unter Argon 5,05 g (25 mmol) (Dichloro-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **63** in 50 ml trockenem THF gelöst. Nach Zugabe von 7,3 ml (52 mmol) trockenem Triethylamin wurden unter starkem Rühren 6,96 g (50 mmol) *p*-Nitrophenol gelöst in 50 ml trockenem THF innerhalb einer Stunde zuge-

tropft. Der Ansatz rührte über Nacht bei RT. Das ausgefallene Hydrochlorid wurde mit Hilfe einer Schlenckfritte unter Argonatmosphäre abgetrennt. Nach Evaporation der Lösungsmittel wurde der blaßgelbe Rückstand in wenig heißem THF gelöst und nach Zugabe von Dichlormethan bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ auskristallisiert. Das Produkt wurde abfiltriert und mit wenig kaltem Dichlormethan nachgewaschen.

Ausbeute: 7,3 g (17,9 mmol, 72 %) blaßgelbe Kristalle

Schmelzpkt.: 124 - 125 $^{\circ}\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 8.22-8.18 (m, 4 H, meta-H-p-Nitrophenyl), 7.17-7.13 (m, 4 H, ortho-H-p-Nitrophenyl), 3.87 (h, 2 H, $^3J_{\text{H,H}} = \text{je } 6.8\text{ Hz}$, 2 x CH-Isopropyl), 1.26 (d, 12 H, $^3J_{\text{H,H}} = \text{je } 6.8\text{ Hz}$, 4 x CH_3 -Isopropyl)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100.6 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 159.4 (2 C, para-C-p-Nitrophenyl), 143.0 (2 C, C-p-Nitrophenyl), 125.7 (4 C, meta-C-p-Nitrophenyl), 119.5 (4 C, ortho-C-p-Nitrophenyl), 44.6 (2 C, CH-Isopropyl), 24.3 (4 C, CH_3 -Isopropyl)

$^{31}\text{P-NMR}$: 162.0 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 144.5

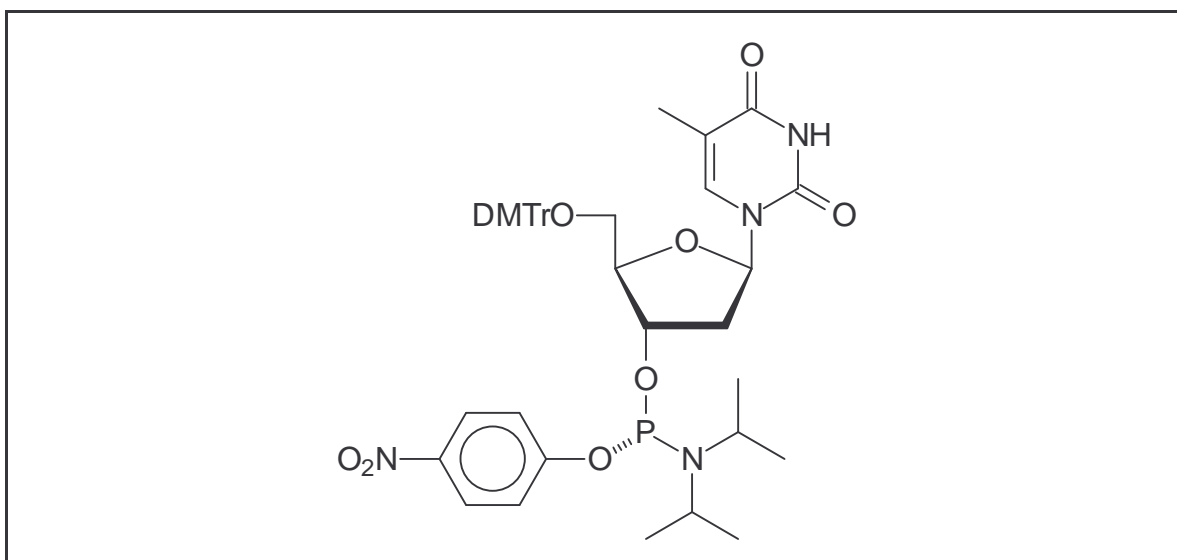
DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,79

DC: R_f (Dichlormethan/Aceton 10:1) = 0,87

ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 406,2

3'-O-[[*N,N*-Diisopropylamino-*O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin]-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin 66a/b

Literatur: Helinski, 1993a; Helinski, 1993b; Dabkowski, 1995a



C₄₃H₄₉N₄O₁₀P [812,86]

In einem ausgeheizten 100 ml Schlenckkolben wurden 3,58 g (8,8 mmol) gut getrocknetes [*N,N*-Diisopropylamino-*di-O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin 65 unter Argon in 30 ml trockenem THF gelöst. In einem Tropftrichter wurden 4,36 g (8,0 mmol) über Phosphorpentoxid getrocknetes 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin 33 in 30 ml trockenem THF gelöst und mit 1,3 ml (8,8 mmol) DBU versetzt. Diese Lösung wurde unter Gelbfärbung des Reaktionsgemischs durch substituiertes *p*-Nitrophenolat innerhalb einer Stunde zuge- tropft. Nach 3 h Rühren bei RT konnte mittels DC nur noch wenig Edukt detektiert werden. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von Dichlormethan/Aceton = 10:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 5,68 g (7,0 mmol, 87 %) blaßgelber Schaum

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 8.68 (b, je 1 H, N-H), 8.14-8.07 (m, 2 H, meta-H-*p*-Nitrophenyl), 7.68 und 7.64 (2s, je 1 H, H-6), 7.40-7.17 (m, je 9 H, DMTr-arom.), 6.95-6.89 (m, 2 H, ortho-H-*p*-Nitrophenyl), 6.84-6.77 (m, je 4 H, DMTr-arom.), 6.43 und 6.41 (2dd, je 1 H, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, ³J_{H,H} = 4.5 Hz und ³J_{H,H} = 5.6 Hz, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, H-1'),

4.79-4.72 (m, je 1 H, H-3'), 4.23-4.21 (m, je 1 H, H-4'), 3.79 und 3.78 (2s, je 6 H, 2 x O-CH₃), 3.73-3.64 (m, je 2 H, 2 x CH-Isopropyl), 3.55-3.51 (m, je 1 H, H-5'), 3.37-3.27 (m, je 1 H, H-5''), 2.58-2.53 (m, je 1 H, H-2'), 2.41-2.29 (m, je 1 H, H-2''), 1.45 (s, je 3 H, CH₃-Thymin), 1.22, 1.15, 1.13, 1.12 (4d, je 12 H, ³J_{H,H} = je 6.8 Hz, 4 x CH₃-Isopropyl)

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 148.7 und 147.8

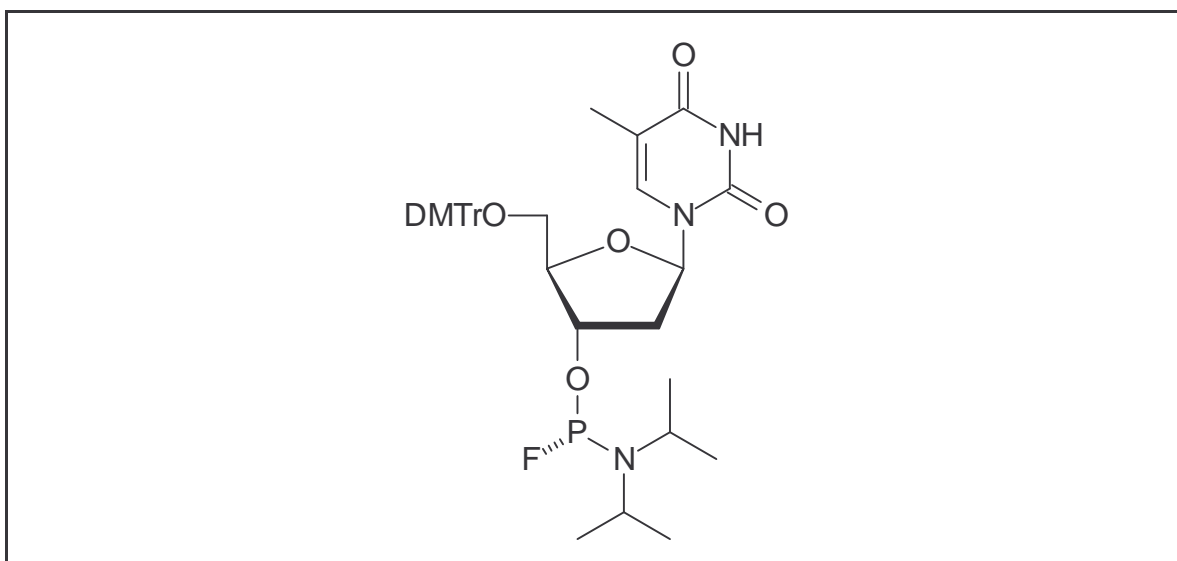
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

DC: R_f (Dichlormethan/Aceton 10:1) = 0,46 für beide Diastereomere

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 813,4

3'-O-[(*N,N*-Diisopropylamino-fluoro)-phosphin]-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-thymidin **68a/b**

Literatur: Dabkowski, 1995a; Dabkowski, 1995b



C₃₇H₄₅FN₃O₇P [693,75]

In einem ausgeheizten 250 ml Schlenckkolben wurden unter Argon 4,95 g (6,1 mmol) über Phosphorpentoxid getrocknetes 3'-O-{[*N,N*-Diisopropylamino-*O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin}-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **66a/b** eingewogen und in 100 ml trockenem THF gelöst. Unter Gelbfärbung durch substituiertes p-Nitrophenolat wurden 7,6 ml (7,6 mmol) einer 1 M-Lösung von TBAF in THF innerhalb von 20 min zugetropft.

Nach 10 min bildete sich ein Niederschlag von Tetrabutylammonium-p-nitrophenolat. Nach zweistündigem Rühren bei RT wurde der Niederschlag mit Hilfe einer Schlenckfritte unter Argon abgetrennt. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abdestilliert und das rohe Phosphoramidit durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 3 % bis 10 % Aceton in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 2,05 g (2,95 mmol, 48 %) weißer Schaum

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 8.53 (b, je 1 H, N-H), 7.65 und 7.63 (2s, je 1 H, H-6), 7.41-7.22 (m, je 9 H, DMTr-arom.), 6.86-6.82 (m, je 4 H, DMTr-arom.), 6.41 (ψt, je 1 H, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, H-1'), 4.80-4.74 (m, je 1 H, H-3'), 4.19 und 4.14 (2m, je 1 H, H-4'), 3.79 (s, je 6 H, 2 x O-CH₃), 3.68-3.58 (m, je 2 H, 2 x CH-Isopropyl), 3.53-3.47 (m, je 1 H, H-5'), 3.40-3.34 (m, je 1 H, H-5''), 2.58-2.51 (m, je 1 H, H-2'), 2.40-2.32 (m, je 1 H, H-2''), 1.44 (s, je 3 H, CH₃-Thymin), 1.22, 1.20, 1.18, 1.12 (4d, je 12 H, ³J_{H,H} = je 6.8 Hz, 4 x CH₃-Isopropyl)

¹³C-NMR: 100.6 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 163.9 (C-4), 158.6 und 158.5 (2 x para-C-DMTr), 150.3 (C-2), 144.4 und 144.1 (C-DMTr), 135.8 und 135.7 (C-6), 135.4 und 135.3, 135.3 und 135.1 (2 x C-DMTr), 130.0-127.0 (12 x C-arom.), 125.4 und 124.5 (para-C-Benzyl und para-C-DMTr), 113.2 (4 x meta-C-DMTr), 111.1 und 111.0 (C-5), 86.9 und 86.8 (O-C-DMTr), 85.9 und 85.7 (C-4'), 84.9 und 84.5 (C-1'), 78.1, 77.9 und 76.6, 76.4 (C-3'), 63.7 und 63.5 (C-5'), 55.2 (2 x O-CH₃), 44.7 und 44.6 (2 x CH-Isopropyl), 39.6 und 39.5 (C-2'), 24.5 und 24.1 (4 x CH₃-Isopropyl), 11.6 und 11.5 (CH₃-Thymin)

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 155.9 (d, ¹J_{P,F} = 1117.2 Hz)
155.7 (d, ¹J_{P,F} = 1116.3 Hz)
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

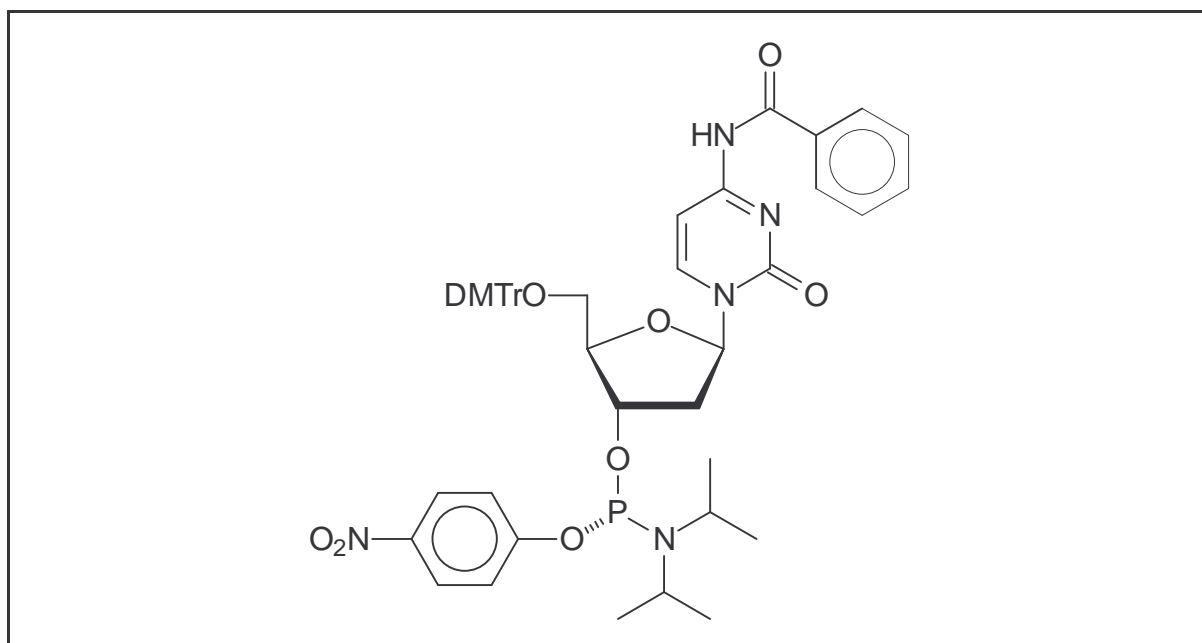
¹⁹F-NMR: 235.3 MHz, CDCl₃, δ in ppm: - 76.5 (d, ¹J_{P,F} = 1116.9 Hz)
- 77.1 (d, ¹J_{P,F} = 1115.9 Hz)
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

DC: R_f (Dichlormethan/Aceton 10:1) = 0,33 für beide Diastereomere

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 694,5

N*⁴-Benzoyl-3'-*O*-{[*N,N*-diisopropylamino-*O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin}-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin **67a/b*

Literatur: Helinski, 1993a; Helinski, 1993b; Dabkowski, 1995a



C₄₉H₅₂N₅O₁₀P [901,95]

Unter Argon wurden in einem ausgeheizten 100 ml Schlenckkolben 1,74 g (4,1 mmol) gut getrocknetes [*N,N*-Diisopropylamino-*di-O*-(4-nitrophenyl)]-phosphin **65** eingewogen und in 30 ml trockenem THF gelöst. In einem Tropftrichter wurden 2,37 g (3,7 mmol) über Phosphorpentoxid getrocknetes 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **40** eingewogen, mit etwa 30 ml trockenem THF gelöst und mit 0,6 ml (4,1 mmol) DBU versetzt. Diese Lösung wurde innerhalb von 30 min zugetropft, wobei sich die Reaktionslösung durch substituiertes p-Nitrophenolat tiefgelb färbte. Nach zweistündigem Rühren bei RT war die Umsetzung laut DC fast vollständig. Zur Aufarbeitung wurden die Lösungsmittel evaporiert. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem isokratischen Eluenten von Dichlormethan/Aceton = 10:1 aufgereinigt.

Ausbeute: 3,09 g (3,43 mmol, 92 %) blaßgelber Schaum

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 8.64 (b, je 1 H, N-H), 8.29 und 8.28 (2d, je 1 H, ³J_{H,H} = je 6.4 Hz, H-6), 8.17-8.08 (m, je 2 H, meta-H-p-Nitrophenyl), 7.88-7.86 (m, je 2 H, ortho-H-Benzoyl), 7.63-7.22 (m, je 9 H, DMTr-arom. und m, je 3 H, meta- und para-H

Benzoyl und 2d, je 1 H, H-5), 7.02-6.95 (m, je 2 H, ortho-H-p-Nitrophenyl), 6.86-6.80 (m, je 4 H, DMTr-arom.), 6.30 (ψt, je 1 H, $^3J_{H,H} = 5.9$ Hz, H-1'), 4.74-4.66 (m, je 1 H, H-3'), 4.30-4.27 (m, je 1 H, H-4'), 3.80 und 3.78 (2s, je 6 H, 2 x O-CH₃), 3.74-3.65 (m, je 2 H, 2 x CH-Isopropyl) 3.55-3.49 (m, je 1 H, H-5'), 3.45-3.37 (m, je 1 H, H-5''), 2.87-2.81 (m, je 1 H, H-2'), 2.38-2.26 (m, je 1 H, H-2''), 1.23, 1.15, 1.15, 1.12 (4d, je 12 H, $^3J_{H,H} =$ je 6.8 Hz, 4 x CH₃-Isopropyl)

^{31}P -NMR: 162.0 MHz, CDCl₃, δ in ppm: 148.7 und 148.2

zwei Diastereomere im Verhältnis 3 : 2

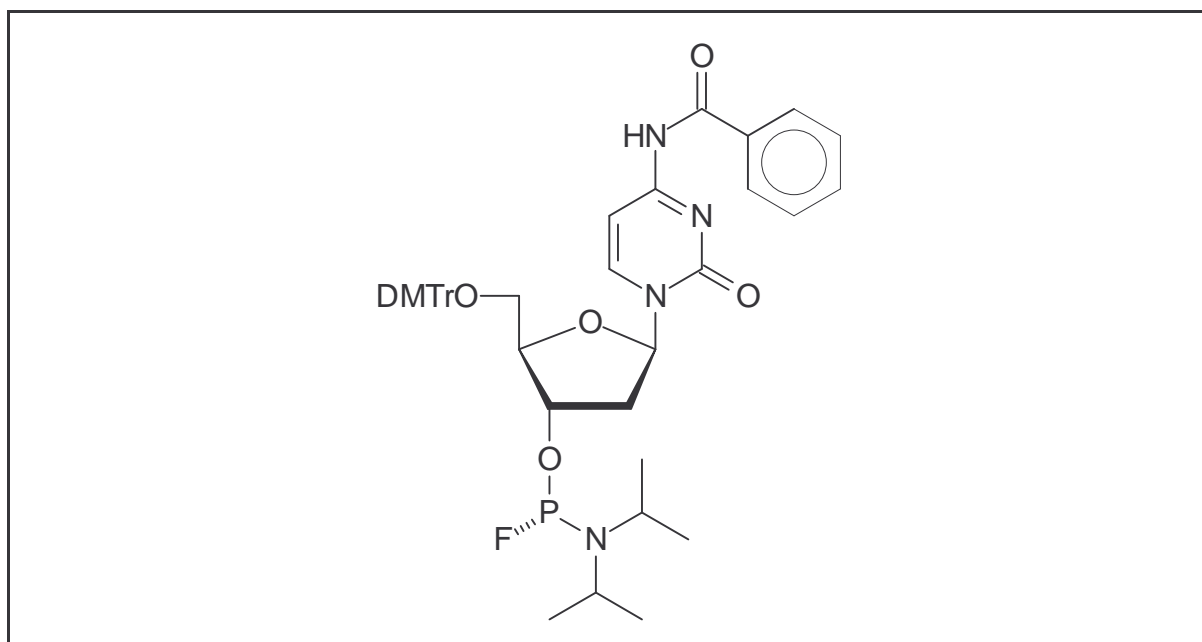
DC: R_f (Dichlormethan/Aceton 10:1) = 0,37 für beide Diastereomere

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,81 für beide Diastereomere

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 902,8

***N*⁴-Benzoyl-3'-*O*-[(*N,N*-diisopropylamino-fluoro)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin 69a/b**

Literatur: Dabkowski, 1995a; Dabkowski, 1995b



C₄₃H₄₈FN₄O₇P [782,85]

In einem ausgeheizten 100 ml Schlenckkolben wurden unter Argon 2,85 g (3,2 mmol) über Phosphorpentoxid getrocknetes N^4 -Benzoyl-3'- O -{[N,N -diisopropylamino- O -(4-nitrophenyl)]-phosphin}-5'- O -(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin **67a/b** eingewogen und in 70 ml trockenem THF gelöst. Unter Gelbfärbung durch substituiertes p -Nitrophenolat wurden 4,0 ml (4,0 mmol) einer 1 M-Lösung von TBAF in THF innerhalb von 20 min zugetropft. Nach 10 min bildete sich ein Niederschlag von Tetrabutylammonium- p -nitrophenolat. Nach zweistündigem Rühren bei RT wurde der Niederschlag mit Hilfe einer Schlenckfritte unter Argon abgetrennt. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer abdestilliert und das rohe Phosphoramidit durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 3 % bis 10 % Aceton in Dichlormethan aufgereinigt.

Ausbeute: 1,81 g (2,31 mmol, 73 %) weißer Schaum

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 8.73 (b, je 1 H, N-H), 8.34 und 8.32 (2d, je 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = \text{je } 5.8 \text{ Hz}$, H-6), 7.90-7.88 (m, je 2 H, ortho-H-Benzoyl), 7.61-7.21 (m, je 9 H, DMTr-arom. und m, je 3 H, meta- und para-H Benzoyl und 2d, je 1 H, H-5), 6.88-6.85 (m, je 4 H, DMTr-arom.), 6.41 (wt, je 1 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3 \text{ Hz}$, H-1'), 4.78-4.72 (m, je 1 H, H-3'), 4.25 und 4.20 (2m, je 1 H, H-4'), 3.80 (s, je 6 H, 2 x O-CH_3), 3.68-3.58 (m, je 2 H, 2 x CH-Isopropyl), 3.54-3.43 (m, je 2 H, H-5' und H-5''), 2.83-2.76 (m, je 1 H, H-2'), 2.40-2.33 (m, je 1 H, H-2''), 1.23, 1.21, 1.19, 1.14 (4d, je 12 H, $^3J_{\text{H,H}} = \text{je } 6.8 \text{ Hz}$, 4 x CH_3 -Isopropyl)

$^{13}\text{C-NMR}$: 100.6 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 166.6 (C=O-Benzoyl), 162.0 (C-4), 158.7 und 158.6 (2 x para-C-DMTr), 154.6 (C-2), 144.5 (C-DMTr), 144.1 und 144.0 (C-6), 135.4 und 135.3, 135.2 und 135.1 (2 x C-DMTr), 133.2 und 133.0 (C-Benzoyl und para-C-Benzoyl), 130.0-127.0 (13 x C-arom.), 113.3 (4 x meta-C-DMTr), 96.4 (C-5), 87.1 und 87.0 (O-C-DMTr), 86.8 und 86.7 (C-1'), 85.8 und 85.4 (C-4'), 72.8, 72.7 und 72.6, 72.5 (C-3'), 62.0 und 61.8 (C-5'), 55.2 (2 x O-CH_3), 44.2 und 44.1 (2 x CH-Isopropyl), 41.0 und 40.9 (C-2'), 24.5 und 24.4 (4 x CH_3 -Isopropyl)

$^{31}\text{P-NMR}$: 162.0 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: 155.9 (d, $^1J_{\text{P,F}} = 1116.1 \text{ Hz}$)
155.7 (d, $^1J_{\text{P,F}} = 1120.1 \text{ Hz}$)
zwei Diastereomere im Verhältnis 2 : 3

^{19}F -NMR: 235.3 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: - 76.2 (d, $^1J_{\text{P,F}} = 1115.8$ Hz)
 - 76.9 (d, $^1J_{\text{P,F}} = 1119.7$ Hz)
 zwei Diastereomere im Verhältnis 2 : 3

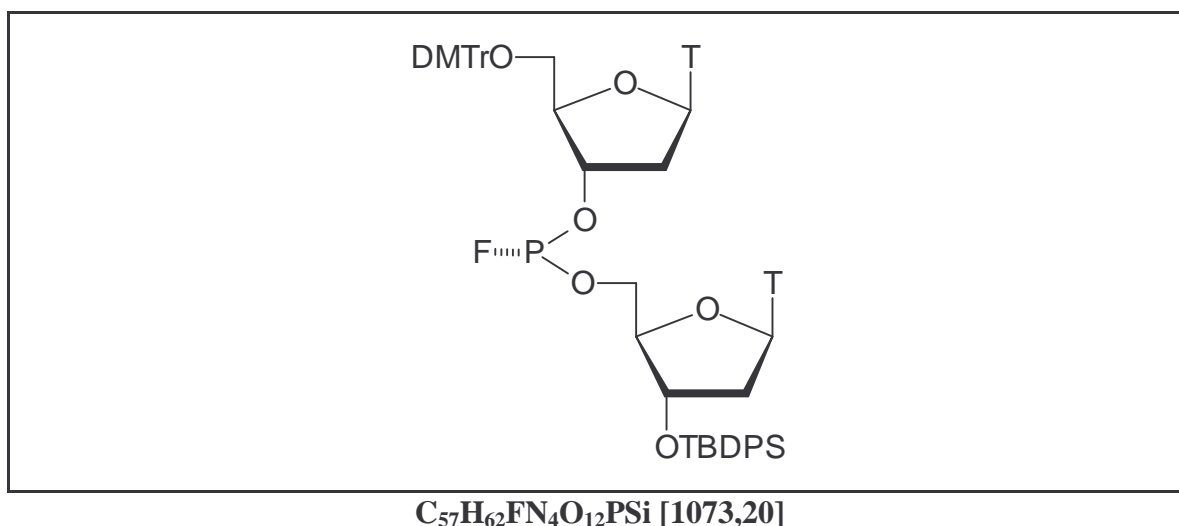
DC: R_f (Dichlormethan/Aceton 10:1) = 0,28 für beide Diastereomere

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,81 für beide Diastereomere

ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 783,7

(Rp/Sp)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-O-(tert-butylidiphenylsilyl)-thymidin phosphorfluoridit 70a/b

Literatur: Dahl, 1987; Dabkowski, 1995b; Dabkowski, 1995c; Dabkowski, 1997



In einem ausgeheizten 10 ml Schlenckkolben wurden 69 mg (100 μmol) 3'-O-[(*N,N*-Diisopropylamino-fluoro)-phosphin]-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **68a/b** und 50 mg (105 μmol) 3'-O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-thymidin **34** eingewogen und über Nacht über Phosphorpentoxid im Exsikkator im Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon wurden die Nucleosidbausteine in 1 ml trockenem Acetonitril gelöst. Unter Rühren wurden 12,7 μl (100 μmol) Trimethylsilylchlorid zugetropft. Zuerst wurde eine schwache Orangefärbung beobachtet. Dann bildete sich ein weißer Niederschlag und die Orangefärbung verschwand wieder. Es wurde 1,5 h bei RT gerührt. Danach wurde der Ansatz zu einem weißen Schaum eingengt. Die Aufreinigung des Rohprodukts

erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 5 % bis 20 % Aceton in Dichlormethan.

Ausbeute: 70 mg (65 μ mol, 65 %) weißer Schaum

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CD_3CN , δ in ppm: 7.64-7.21 (m, je 9 H, DMTr-arom. und m, je 10 H, TBDPS-arom. und 2s, je 2 H, 2 x H-6), 6.83-6.80 (m, je 4 H, DMTr-arom.), 6.22 (m, je 1 H, H-1'), 6.17 (m, je 1 H, H-1'), 4.99 (m, je 1 H, H-3'), 4.49 (m, je 1 H, H-3'), 4.05-3.94 (m, je 1 H, H-4' und 1 H, H-4'), 3.84-3.77 (m, je 1 H, H-5' und 1 H, H-4'), 3.72 (s, je 6 H, 2 x O- CH_3), 3.64-3.60 (m, je 1 H, H-5''), 3.27-3.12 (m, je 2 H, H-5' und H-5''), 2.32-2.17 (m, je 3 H, H-2' und H-2' und H-2''), 1.83-1.77 (m, je 1 H, H-2''), 1.93 (s, je 3 H, CH_3 -Thymin), 1.72 (s, je 3 H, CH_3 -Thymin), 1.06 (s, je 9 H, *tert*-Butyl-TBDPS)

$^{31}\text{P-NMR}$: 162.0 MHz, CD_3CN , δ in ppm: 133.3 (d, $^1J_{\text{P,F}} = 1215.6$ Hz) - slow isomer
132.1 (d, $^1J_{\text{P,F}} = 1213.8$ Hz) - fast isomer
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

DC: R_f (Dichlormethan/Aceton 5:1) = 0,24 für beide Diastereomere

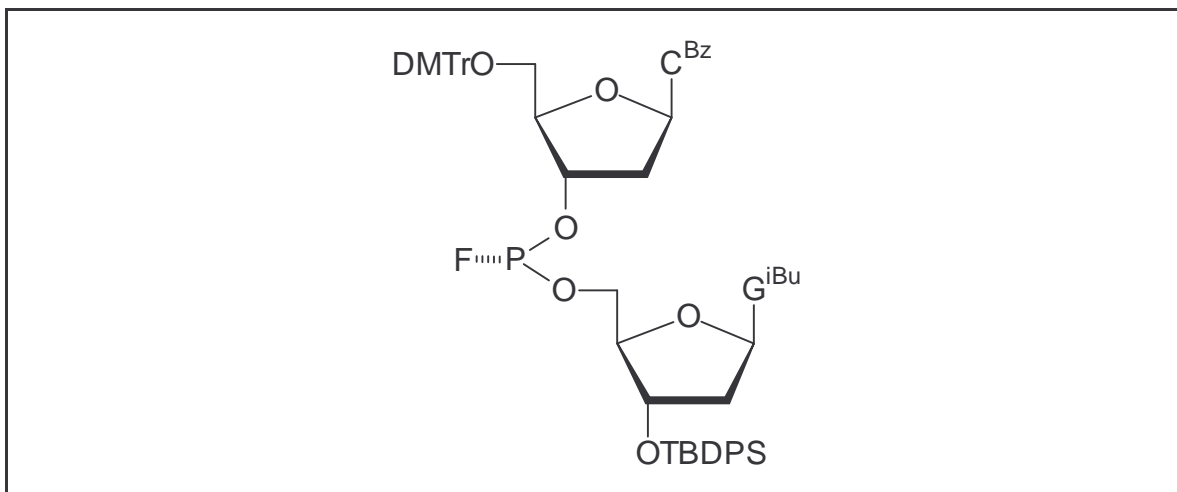
ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 1073,8

Durch Oxidation mit einer 3M-Lösung von TBHP in Isooctan (Rao, 1993) wurde das fünfwertige (**Rp/Sp**)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin phosphorfluoridat **72a/b** erhalten.

$^{31}\text{P-NMR}$: 162.0 MHz, CDCl_3 , δ in ppm: - 10.2 (d, $^1J_{\text{P,F}} = 982.5$ Hz)
- 10.6 (d, $^1J_{\text{P,F}} = 989.5$ Hz)
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

(Rp/Sp)-*N*⁴-Benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidylyl-(3'→5')-*N*²-benzoyl-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin phosphorfluoridit 71a/b

Literatur: Dahl, 1987; Dabkowski, 1995b; Dabkowski, 1995c; Dabkowski, 1997



In einem ausgeheizten 10 ml Schlenckkolben wurden 78 mg (100 μ mol) *N*⁴-Benzoyl-3'-*O*-[(*N,N*-diisopropylamino-fluoro)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidin 69a/b und 60 mg (105 μ mol) *N*²-Isobutyryl-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin 43 eingewogen und über Nacht über Phosphorpentoxid im Exsikkator im Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach dem Belüften mit Argon wurden die Nucleosidbausteine in 1 ml trockenem Acetonitril gelöst. Unter Rühren wurden 12,7 μ l (100 μ mol) Trimethylsilylchlorid zugegeben. Eine schwache Orangefärbung verschwand nach dem Ausfällen eines weißen Niederschlages wieder. Es wurde 1,5 h bei RT gerührt. Danach wurde der Ansatz zu einem weißen Schaum eingengt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 5 % bis 50 % Aceton in Dichlormethan.

Ausbeute: 80 mg (64 μ mol, 64 %) weißer Schaum

¹H-NMR: 400 MHz, CD₃CN, δ in ppm: 8.28 und 8.23 (2d, je 1 H, ³J_{H,H} = je 7.5 Hz, H-6), 7.93-7.88 (m, je 2 H, ortho-H-Benzoyl), 7.69-7.14 (m, je 9 H, DMTr-arom. und m, je 10 H, TBDPS-arom. und m, 3 H, meta- und para-H-Benzoyl und s, je 1 H, H-8 und s, je 1

H, H-5), 6.88-6.82 (m, je 4 H, DMTr-arom.), 6.22 (m, je 1 H, H-1'), 6.14 (m, je 1 H, H-1'), 4.96 (m, je 1 H, H-3'), 4.49 (m, je 1 H, H-3'), 4.14 (m, je 1 H, H-4'), 3.88-3.82 (m, je 2 H, H-5' und H-4'), 3.70 (s, je 6 H, 2 x O-CH₃), 3.55-3.51 (m, je 1 H, H-5''), 3.37-3.21 (m, je 2 H, H-5' und H-5''), 2.83-2.75 (m, je 2 H, H-2' und m, je 1 H, CH-Isobutyryl), 2.64-2.53 (m, je 1 H, H-2'), 2.47-2.28 (m, je 2 H, 2 x H-2''), 1.14 und 1.13 (2d, je 6 H, ³J_{H,H} = je 6.7 Hz, 2 x CH₃-Isobutyryl), 1.03 (2s, je 9 H, *tert*-Butyl-TBDPS)

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CD₃CN, δ in ppm: 132.8 (d, ¹J_{P,F} = 1213.7 Hz)
132.1 (d, ¹J_{P,F} = 1216.5 Hz)
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

DC: R_f (Dichlormethan/Aceton 10:1) = 0,25 für beide Diastereomere

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0,81 für beide Diastereomere

ESI-MS [M+H]⁺: m/z 1257,8

Durch Oxidation mit einer 3M-Lösung von TBHP in Isooctan (Rao, 1993) wurde das fünfwertige (**Rp/Sp**)-*N*⁴-Benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidylyl-(3'→5')-*N*²-benzoyl-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin phosphorfluoridat **73a/b** erhalten.

³¹P-NMR: 162.0 MHz, CD₃CN, δ in ppm: - 9.8 (d, ¹J_{P,F} = 988.5 Hz)
- 9.9 (d, ¹J_{P,F} = 978.0 Hz)
zwei Diastereomere im Verhältnis 1 : 1

12.3 Synthese von Oligonukleotiden

Oligonukleotidsynthesen wurden nach der Phosphoramiditmethode (vgl. Beaucage, 1981; Sinha, 1983; McBride, 1983; Gait, 1984; Caruthers, 1985; Caruthers, 1987; Eckstein, 1991; Beaucage, 1992; Beaucage, 1993) an Syntheseautomaten durchgeführt. Für die DNA-Synthesen stand ein Gerät der Fa. PerSeptive Biosystems (Modell Expedite 8905) zur Verfügung. Mit diesem Gerät bestand die Möglichkeit, die Abspaltung der Dimethoxytritylgruppen über einen „Trityl-Monitor“ zu quantifizieren und damit die Effizienz der einzelnen Kupplungsschritte zu überprüfen. Vor Synthesebeginn wurden jeweils 100 mM Lösungen der neu hergestellten Phosphoramidite in trockenem Acetonitril (Amidite Diluent) bereit. Das Phosphoramidit des Cholesterolderivats **32a/b** war in reinem Acetonitril schlecht löslich. Es wurde in einem Teil trockenem Dichlormethan gelöst und mit zwei Teilen Acetonitril versetzt. Um Verstopfungen der Leitungen und Ventile des Syntheseautomaten durch Partikel in der Lösung zu vermeiden, wurden die Lösungen der Amidite über einen Filter (0,45 µl; Roth Nr. 0081) gegeben. Die Oligonukleotide wurden mit Standardreagenzien der Fa. PerSeptive Biosystems und Synthesesyklen der Hersteller im 1 µmol Maßstab dargestellt. Dazu wurden vorgefertigte Säulen der Fa. PerSeptive Biosystems mit 500 Å CPG Trägermaterial, die das erste Nukleosid tragen, eingesetzt. Zur Synthese 3'-Fluoreszein gelabelter Oligonukleotide wurden 25 mg eines CPG-Materials der Fa. Glen Research (Cat. No.: 20-2963-xx) in eine Synthesensäule eingewogen. Dieses Material trägt als ersten Baustein lediglich den Fluoreszenzfarbstoff. Für alle modifizierten Phosphoramidite wurden die Kupplungszeiten von 30 auf 300 Sekunden verlängert. Alle Synthesen wurden unter Verbleib der endständigen Dimethoxytritylgruppe (DMTr-ON) - sofern vorhanden - durchgeführt. Die RNA-Synthesen wurden an einem Gerät der Fa. Eppendorf (Modell D300+) unter Standardbedingungen durchgeführt.

12.3.1 Trägerabspaltung und Entschützen der Oligonukleotide

Standardbedingungen: Die Methoden der Abspaltung der Oligonukleotide vom CPG-Trägermaterial und der Entschützung waren abhängig von der Art der Modifikationen. Der Großteil der in dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide konnte durch Inkubation mit konz. Ammoniaklösung für 24 h bei RT entschützt werden. Hierzu wurde die Synthesensäule aufgebrochen, das Trägermaterial in ein verschließbares Glasgefäß überführt und mit 600 µl konz. Ammoniaklösung versetzt. Nach 24 h wurde durch Filtration (0,45 µl; Roth

Nr. 0081) das Trägermaterial entfernt. Die Ammoniaklösung wurde in der SpeedVac abgezogen, konnte aber auch direkt bei Verwendung von POROS R3-Material der Aufreinigung durch RP-HPLC zugeführt werden. Bei Fluoreszein gelabelten Oligonukleotiden ist auf Lichtausschluß zu achten.

Benzylphosphonate: Am Phosphatrückgrat mit der Benzylgruppe modifizierte Oligonukleotide sind aufgrund des Verlusts negativer Ladung Nukleophilen leichter zugänglich und daher basenlabiler als Phosphodiester oder Phosphorothioate. Benzylphosphonate wurden zunächst mit konz. Ammoniaklösung in 1 h vom Träger abgespalten, das Trägermaterial abfiltriert und die Ammoniaklösung an der SpeedVac abgezogen. Die Schutzgruppen der exozyklischen Aminogruppen wurden nach einer Vorschrift von Hogrefe (Hogrefe, 1993) abgespalten. Dazu wurde der Rückstand mit 500 µl einer frisch bereiteten Mischung aus Wasser/Ethanol/Acetonitril/Ethylendiamin (5 : 47,5 : 47,5 : 100) versetzt und unter Lichtausschluß bei RT inkubiert. Löste sich das rohe Oligonukleotid nicht vollständig, mußte der Wasseranteil erhöht werden. Nach 3 h war die Entschützung quantitativ und es wurde mit 450 µl Essigsäure vorsichtig neutralisiert, um einen unerwünschten Verlust der Dimethoxytritylgruppe zu verhindern. Diese Lösung konnte in zwei Portionen direkt durch semipräparative RP-HPLC aufgereinigt werden. Später zeigte sich, daß Benzylphosphonate ebenfalls durch Inkubation mit konz. Ammoniaklösung für 24 h bei RT ohne Ausbeuteverlust gegenüber der Methode von Hogrefe entschützt werden konnten.

Gallensäure-gelabelte Oligonukleotide: Am 5'-Ende Cholsäure-modifizierte Oligonukleotide mußten ebenfalls nach einer abgeänderten Methode entschützt werden, da die als Ester geschützte Carbonsäurefunktion der Cholsäure bei Behandlung mit Ammoniak zu unerwünschten Amidien führt. Die als Allylester geschützten Cholsäurederivate wurden aus diesem Grund an der festen Phase unter milden Bedingungen Pd-katalysiert gespalten. Zunächst wurde eine Lösung aus 18 mg (15 µmol) Tetrakis-(triphenylphosphin)palladium, 18 mg (69 µmol) Triphenylphosphin und 18 mg (133 µmol) Diethylammoniumhydrogencarbonat gelöst in 1,2 ml trockenem Dichlormethan bereit. Das Nukleophil Diethylammoniumhydrogencarbonat ließ sich leicht durch Einleiten von gasförmigem Kohlenstoffdioxid in Diethylamin darstellen (Hayakawa, 1993). Die Lösung wurde in eine Spritze aufgenommen und unter Licht- und Luftausschluß in die ungeöffnete Synthesäule, der eine zweite Spritze aufgesetzt war, eingeleitet. Auf diese Weise konnte die Reaktionslösung wechselweise durch die Synthesäule mit dem Trägermaterial geleitet werden. Nach 24 h

bei RT wurde die Säule mit 10 ml Dichlormethan, 10 ml Aceton und 10 ml Wasser gespült. Zur Entfernung von Palladiumresten wurde 30 min mit einer wäßrigen 0,1 M Lösung von Diethyldithiocarbamat inkubiert. Danach wurde mit 10 ml Wasser, 10 ml Aceton und 10 ml Dichlormethan gewaschen und das Trägermaterial durch Durchleiten von Argongas getrocknet. Die Synthesäule wurde aufgebrochen und die Abspaltung vom Träger und weitere Entschützung wie beschrieben mit konz. Ammoniaklösung vorgenommen. Die als Ethylester vorliegenden Taurocholsäurederivate wurden unter Standardbedingungen entschützt, da bei Sulfonsäureestern die Elektrophilie des α -Kohlenstoffatoms des Esters größer als die des Schwefels ist (Musicki, 1991).

12.3.2 Aufreinigung der Oligonukleotide

Die rohen Oligonukleotide wurden grundsätzlich mit Hilfe der RP-HPLC und je nach Art der Modifikation zusätzlich mit präparativer Gelelektrophorese aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurden die Verbindungen in Form ihrer Ammoniumsalze für die Massanalytik und als Natriumsalze für die biologischen Assays gefällt.

Aufreinigung durch semipräparative RP-HPLC

Zur semipräparativen RP-HPLC von Oligonukleotiden wurde ausschließlich POROS-R3 Material der Fa. PerSeptive Biosystems verwendet. Es bot den Vorteil, daß ammoniakalische- oder EDA-Lösungen direkt auf die Säule gespritzt werden konnten. Lediglich Hexamere wurden über LiChrospher RP 18 Material der Fa. Merck aufgetrennt. Das rohe Oligonukleotid einer 1 μ mol Synthese wurde zumeist in zwei Portionen aufgereinigt, um eine Überladung der Säule zu vermeiden. Die Lipophilie von Oligonukleotiden, die am 5'-Ende eine Dimethoxytrityl- oder Cholesterolgegruppe trugen, führte zu einer Retardierung des Produkts gegenüber den früher eluierenden Fehlsequenzen, die an ihrem 5'-Ende acetyliert waren. Der geringere lipophile Charakter von 5'-Cholsäure- und 5'-Taurocholsäuremodifizierten Oligonukleotiden verminderte die Retardierung zwischen Fehlsequenzen und Produkt. Deshalb wurden diese Derivate zweimal chromatographiert. Es wurden lineare Gradienten von 0 % auf 25 % Acetonitril in 0,1 M TEAA (pH = 7,0) in 25 Minuten bei einem Fluß von 5 ml/min verwendet (Tab. 12.1), wobei für die lipophilen Oligonukleotide auch steilere Gradienten möglich waren (0 % bis 35 % Acetonitril in 15 min). Die Produktfraktionen wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockene eingengt. Die Detektion erfolgte bei 274 nm und bei Fluoreszenz markierten Oligonukleotiden zusätzlich bei 494 nm.

*Gradient A:**Gradient B:*

Zeit [min]	% TEAA	% ACN	[ml/min]	Zeit [min]	% TEAA	% ACN	[ml/min]
0,0	100	0	5,0	0,0	100	0	5,0
5,0	100	0	5,0	5,0	100	0	5,0
30,0	75	25	5,0	20,0	65	35	5,0
30,1	0	100	5,0	20,1	0	100	5,0
35,0	0	100	5,0	25,0	0	100	5,0
35,1	100	0	5,0	25,1	100	0	5,0
40,0	100	0	5,0	30,0	100	0	5,0

Tabelle 12.1: Gradienten für die Aufreinigung von Oligonukleotiden; Gradient A für 5'-Chol- oder Taurocholsäure modifizierte Oligonukleotide; Gradient B für 5'-DMTr oder Cholesterol modifizierte Oligonukleotide

Nach der Aufreinigung wurde die DMTr-Schutzgruppe falls vorhanden mit Essigsäure abgespalten. Dazu wurde die eingegangene Produktfraktion mit 500 µl 80 %iger wäßriger Essigsäure versetzt und unter gelegentlichem Schütteln 30 min bei RT inkubiert. Die Essigsäure wurde im Vakuum an der SpeedVac abgezogen und der Rückstand noch einmal mit 1 ml Wasser coevaporiert. Die Abtrennung der freien DMTr-Schutzgruppe erfolgte bei der anschließenden Ethanol-fällung.

Das nach der Phosphoramiditmethode am DNA-Synthesizer hergestellte CGCp_{Bn}GCG **60a/b** Hexamer wurde wie beschrieben aufgereinigt. Es liegt als Paar von Diastereomeren vor, die chromatographisch getrennt wurden. Die Trennung erfolgte analog den Methylphosphonaten (Schwarzer, 1997) mit einem isokratischen Eluenten von 13 % Acetonitril in 0,1 M TEAA (pH = 7,0) an LiChrospher RP 18 Material der Fa. Merck.

Fällen von Oligonukleotiden

Für biologische Assays: Die Hauptmenge des aufgereinigten und detritylierten Oligonukleotids wurde in 250 µl Wasser gelöst und mit 250 µl einer 2 M NaCl-Lösung versetzt. Durch die Zugabe von 1,5 ml Ethanol wurde das Oligonukleotid gefällt. Die unpolare Tritylgruppe blieb im Ethanol gelöst. Die Fällung wurde durch Kühlen auf -20 °C für 2 h vervollständigt. Das ausgefallene Produkt wurde bei 12000 rpm für 10 min in einer Kühlzentrifuge pelletiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Pellet wurde im Vakuum getrocknet, in 1000 µl Wasser aufgenommen und die Konzentration über eine OD₂₆₀-

Messung bestimmt. Das als Natriumsalz vorliegende Produkt wurde über analytische HPLC auf seine Reinheit überprüft.

Für die Massenspektrometrie: Ein Aliquot des reinen Oligonukleotids wurde in 100 μ l Wasser gelöst und mit 100 μ l einer 10 M Ammoniumacetat-Lösung versetzt. Gefällt wurde durch Zugabe von 800 μ l Ethanol. Das als Ammoniumsalz vorliegende Pellet wurde der massenspektrometrischen Analytik zugeführt.

Hexamere und kürzere Sequenzen ließen sich aufgrund ihrer besseren Löslichkeit in alkoholischen Lösungen nicht fällen.

Präparative Gelelektrophorese

3'-Fluoreszein und 5'-Gallensäure-modifizierte Antisense Oligonukleotide ließen sich durch RP-HPLC allein nicht ausreichend aufreinigen. Nach einer Vorreinigung durch RP-HPLC wurden produktthaltige Fraktionen durch präparative Polyacrylamid Gelelektrophorese weiter aufgereinigt. Auf diese Weise konnte der benötigte hohe Reinheitsgrad der Antisense Oligonukleotide für die Zellaufnahmetests und Tierexperimente erreicht werden. Folgende Lösungen und Puffer wurden zur Durchführung der Elektrophorese verwendet:

40 % Acrylamid-Stammlösung: 400 g Acrylamid und 20 g *N,N'*-Methylen-bis-acrylamid ergaben nach Lösen in 580 ml bidest. Wasser 1 l der Acrylamid-Stammlösung.

10 x Boratpuffer (10 x TBE): Die 10x konzentrierte Lösung wurde durch Auffüllen von 109 g TRIS, 55 g Borsäure und 7,5 g EDTA-Dinatriumsalz mit bidest. Wasser auf 1 l erhalten. Der pH lag zwischen 8,0 und 8,3. Zur Verwendung als Laufpuffer (1 x TBE) wurde die Lösung 1 : 10 verdünnt.

Die Elektrophorese wurde auf denaturierenden Polyacrylamidgelen der Größe 400 x 200 x 3 mm durchgeführt. Für die Farbstoff- und Gallensäure-gelabelten Oligonukleotide (17 mere) bewährten sich 16 %ige Gele mit 8 M Harnstoff. Zur Herstellung eines 16 % Gels wurden 120 g Harnstoff in 100 ml 40 % Acrylamid-Stammlösung, 25 ml 10 x Boratpuffer (10 x TBE) und 15 ml bidest. Wasser gelöst (ergibt 250 ml).

Die Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt und durch Einreiben mit einer 2 %igen Lösung von Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlorethan silanisiert. Die Gelkassette wurde zusammengesetzt und mit Agarosegel abgedichtet. Zu 250 ml der 16 %igen Acrylamidlösung wurden zum Starten der Polymerisation 125 mg APS und 100 μ l

TEMED zugesetzt. Die Lösung wurde blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen, der Kamm eingefügt und das Gel bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Die fertige Gelkassette wurde in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und für eine Stunde bei 300 V mit 1 x TBE als Laufpuffer equilibriert.

Die Oligonukleotide wurden in 150 μ l bidest. Wasser gelöst und mit 150 μ l gefärbter Formamidlösung (0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol in Formamid) versetzt. Die gefärbte Oligonukleotidlösung wurde für eine Minute auf 95 °C erwärmt, auf Eis gegeben und zu gleichen Anteilen in die drei Taschen aufgetragen. Je Elektrophorese wurden zwischen 50 OD und 80 OD vorgereinigtes Oligonukleotid aufgereinigt. Die Elektrophorese erfolgte bei 300 V für etwa 20 h. Dabei konnte die Laufhöhe des Produkts aufgrund seiner Fluoreszenz leicht verfolgt werden (Abb. 12.1).

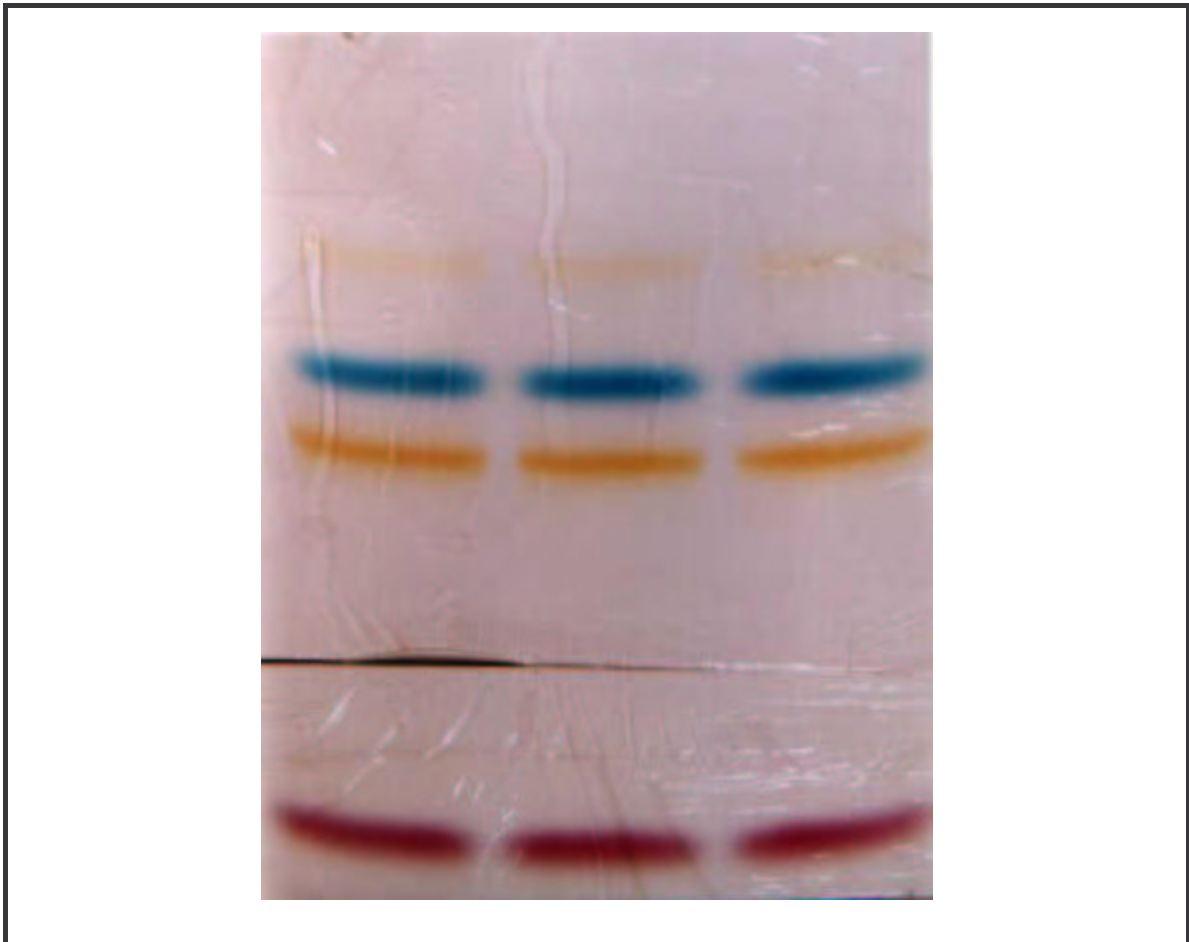


Abb. 12.1: Präparative Gelelektrophorese des Oligonukleotids tS-13FT (gelbe Bande)

Das von den Glasplatten gelöste Gel wurde auf eine mit Haushaltsfolie umwickelte, mit Fluoreszenzmarker beschichtete Kieselgelplatte gelegt und die Banden im UV-Licht bei 366 nm und 254 nm fotografiert (Abb. 12.1). Die Produktbande zeigte in allen Fällen die

stärkste UV-Aktivität bzw. Fluoreszenz. Zusätzlich wurde eine schwache, deutlich höher gelaufene sowie einige Banden unterhalb der Produktbande isoliert und charakterisiert.

Hierzu wurden die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in sterile 4 ml Greiner Caps überführt. Die Gelfragmente wurden mit einem Spatel zermahlen und mit 2 bis 3 ml 50 mM Ammoniumacetatlösung (pH = 7,0) unter zeitweiligem Schütteln über Nacht extrahiert. Der Gelbrei wurde bei Normaldruck auf eine grobe Fritte gegeben und zweimal mit je 2 ml 50 mM Ammoniumacetatlösung gewaschen. Polyacrylamidgelreste wurden durch Anzentrifugieren des Filtrats und vorsichtiges Dekantieren entfernt. Die stark Harnstoff-haltigen Lösungen wurden im Vakuum auf etwa 1,5 ml eingengt.

Die so gewonnene Oligonukleotidlösung wurde über eine mit Sephadex G 25 M gefüllte Säule (Pharmacia PD-10) nach Vorschrift entsalzt. Hierzu wurde die Säule mit 25 ml bidest. Wasser equilibriert. Danach wurde die Probe gelöst in 1,5 ml Wasser aufgetragen. Es wurde mit 1 ml Wasser nachgespült. Anschließend wurden drei produktthaltige Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen, wobei wiederum die Fluoreszenz des Produkts hilfreich war. Später eluierende Fraktionen enthielten den Harnstoff. Die spektralphotometrisch ermittelten Ausbeuten lagen jeweils bei etwa 20 % bezogen auf die auf das Gel aufgetragene, vorgereinigte Menge an Antisense Oligonukleotid. Eine alternativ mögliche Entsalzung durch Dialyse wurde wegen höherer Substanzverluste bei dieser Methode nicht durchgeführt.

12.4 Analytik der Oligonukleotide

12.4.1 Quantifizierung der Menge an Oligonukleotid in OD₂₆₀-Einheiten

Zur Bestimmung der OD₂₆₀-Einheiten wurde das aufgereinigte Oligonukleotid in 1000 µl Wasser gelöst. Der Lösung wurden 10 µl entnommen und in einer 10 mm Quarzküvette auf 1000 µl aufgefüllt. Am UV-Spektrometer wurde die Extinktion (Optische Dichte (OD); engl.: absorbance) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die gemessene Extinktion wurde mit dem Verdünnungsfaktor 100 multipliziert, um die Ausbeute an aufgereinigtem Oligonukleotid in OD₂₆₀-Einheiten zu erhalten. Die gemessene Extinktion läßt sich bei Kenntnis des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ in die Konzentration umrechnen.

12.4.2 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ in Oligonukleotiden

Der molare Extinktionskoeffizient ϵ eines Oligonukleotids kann aus der Summe der bekannten Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide bestimmt werden. Für Desoxyribonukleotide gilt der folgende Zusammenhang (Eckstein, 1991):

$$[12-1] \quad \epsilon = (8,8 \cdot nT + 7,3 \cdot nC + 11,7 \cdot nG + 15,4 \cdot nA) \cdot 0,9 \quad [1000 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}]$$

In Gleichung [12-1] bedeutet n die jeweilige Häufigkeit der Basen im Oligonukleotid. Durch den Faktor 0,9 wird der verringerten UV-Absorption aufgrund des Einflusses der Basenstapelungswechselwirkungen Rechnung getragen.

Eine genauere Methode zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ berücksichtigt die Wechselwirkungen der Chromophore mit ihren nächsten Nachbarn (engl.: nearest neighbour interaction). Danach ergibt sich der Extinktionskoeffizient nicht aus der Summe der Einzelnukleotide, sondern zeigt eine sequenzspezifische Abhängigkeit (Puglisi, 1989; Gray, 1995). Die Zahlenwerte für Mono- und Dinukleotide für DNA und RNA sind in Tabelle 12.2 angegeben. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ ergibt sich aus zweimal der Summe aller im Oligonukleotid vorkommenden Dimere minus der Summe aller Mononukleotide ohne die beiden endständigen Nukleotide (Gl. [12-2]):

$$[12-2] \quad \epsilon(\text{ACGT} \dots) = 2 [\epsilon(\text{AC}) + \epsilon(\text{CG}) + \epsilon(\text{GT}) + \dots] - [\epsilon(\text{C}) + \epsilon(\text{G}) + \epsilon(\text{T}) \dots]$$

Die mit beiden Methoden bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten gelten für einzelsträngige Oligonukleotide bei 25 °C. In Duplexen wie dem untersuchten, selbstkomplementären Hexamer oder Oligonukleotiden mit Sekundärstrukturneigung muß über den Schmelzpunkt gemessen und auf 25 °C extrapoliert werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Modifikationen wie Phosphorothioat- und Benzylphosphonateinheiten sowie die Steroidderivatisierung sollten nur einen geringen Einfluß auf die UV-Absorption bei 260 nm haben und wurden deshalb vernachlässigt.

Baustein	DNA	RNA	Baustein	DNA	RNA
A	15,34	15,34	CG	9,39	9,39
C	7,60	7,60	CT (CU)	7,66	8,37
G	12,16	12,16	GA	12,92	12,92
T (U)	8,70	10,21	GC	9,19	9,19
AA	13,65	13,65	GG	11,43	11,43
AC	10,67	10,67	GT (GU)	10,22	10,96
AG	12,79	12,79	TA (UA)	11,78	12,52
AT (AU)	11,42	12,14	TC (UC)	8,15	8,90
CA	10,67	10,67	TG (UG)	9,70	10,40
CC	7,52	7,52	TT (UU)	8,61	10,11

Tab. 12.2: Extinktionskoeffizienten für monomere und dimere Nukleotide nach Puglisi (1989) bzw. Gray (1995) bei 260 nm, 25 °C, pH = 7,0 und einer Ionenstärke von 0,1 M

Die Konzentration der Oligonukleotid-haltigen Lösung folgt aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz, wobei c die Konzentration in mol/l und d die Schichtdicke der Küvette sowie OD_{260} die dimensionslose Extinktion bei 260 nm bedeuten (Gl. [12-3] und [12-4]):

$$[12-3] \quad OD_{260} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$$[12-4] \quad c = OD_{260} / \epsilon \cdot d$$

12.4.3 Berechnung der Molekülmasse von Oligonukleotiden

Zur einfachen Berechnung der Molekülmasse von Oligonukleotiden werden diese formal in Fragmente zerlegt. Durch diese Vorgehensweise lassen sich sehr leicht verschiedene Modifikationen und Gegenionen berücksichtigen. Letztere führen in Massenspektren sehr häufig zu Begleitsignalen neben dem Moleküllion.

Die in dieser Arbeit in Oligonukleotide eingebauten Fragmente sind mit ihrer Summenformel und Masse in Tabelle 12.3 dargestellt. Die Masse eines Oligonukleotids ergibt sich aus der Summe der Massen der Nukleoside, der Phosphatrückgrat-Einheiten, der 3'- und 5'-Modifikationen sowie den Protonen an den Strangenden und möglichen Ge-

genionen. Die Masse des terminal beschwefelten, am 3'-Ende Fluoreszein- und am 5'-Ende Taurocholsäure markierten 17mer Antisense Oligonukleotids **tS-13FT** (5'-Taurocholsäure-Tp_sGp_sGp_sTGCACGGTCTAp_sCp_sGp_sA-Fluoreszein-3') ergibt sich somit zu:

$$[M] = 4 \times 240,216 + 3 \times 249,230 + 4 \times 225,205 + 6 \times 265,229 + 12 \times 62,972 + 6 \times 79,037 + 1 \times 535,598 + 1 \times 558,757 + 18 \times 1,008$$

$$[M] = \underline{6543,133}$$

Fragment	Summenformel	Molare Masse [g/mol]
dT (DNA)	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₅	240,216
dA (DNA)	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₃	249,230
dC (DNA)	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₄	225,205
dG (DNA)	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₄	265,229
rU (RNA)	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₆	242,189
rA (RNA)	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₄	265,229
rC (RNA)	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₅	241,204
rG (RNA)	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₅	281,229
Phosphodiester	O ₂ P	62,972
Phosphorothioat	OPS	79,037
Methylphosphonat	CH ₃ OP	62,008
Benzylphosphonat	C ₇ H ₇ OP	138,106
Fluoreszein	C ₂₈ H ₂₇ N ₂ O ₇ S	535,598
Cholesterol	C ₂₉ H ₄₉ O ₂	429,707
Cholsäure	C ₂₆ H ₄₃ O ₆	451,624
Taurocholsäure	C ₂₈ H ₄₈ NO ₈ S	558,757
H an den Strangenden	H ₂	2,016
H ⁺ als Gegenion	H	1,008
Na ⁺ als Gegenion	Na	22,990

Tabelle 12.3: Molekulare Massen in dieser Arbeit synthetisierter Oligonukleotid-Fragmente

12.4.4 Analytische RP-HPLC von Oligonukleotiden

Zur Überprüfung des Reinheitsgrads der aufgereinigten Antisense Oligonukleotide wurden etwa 0,1 bis 0,2 OD₂₆₀-Einheiten des Oligonukleotides in 20 µl Wasser gelöst. Für die analytische RP-HPLC wurde eine analytische Säule der Fa. Merck mit endgecaptem Purospher STAR RP 18 Material (3 µm) verwendet. Das Säulenmaterial wurde freundlicherweise von der Biospring GmbH zur Verfügung gestellt. Nach dem Aufspritzen der Probe wurde mit einer Flußrate von 1,0 ml/min und einem linearen Gradienten von 0 % bis 60 % Acetonitril in 0,1 M TEAA-Puffer (pH = 7,0) innerhalb von 20 Minuten chromatographiert (Gradient C). Die UV-Detektion erfolgte bei 260 nm. Bei Fluoreszein markierten Oligonukleotiden wurde zusätzlich am Fluoreszenzdetektor bei 494 nm analysiert.

Gradient C:

Zeit [min]	% TEAA	% ACN	[ml/min]
0,0	100	0	1,0
8,0	100	0	1,0
28,0	40	60	1,0
28,1	0	100	1,0
36,0	0	100	1,0
36,1	100	0	1,0
44,0	100	0	1,0

Tabelle 12.4: Gradient für die analytische RP-HPLC der synthetisierten Oligonukleotide

12.4.5 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Oligonukleotiden

Eine wichtige Methode zur Überprüfung der Reinheit der synthetisierten Oligonukleotide ist die analytische PAA-Gelelektrophorese. Für denaturierende analytische Polyacrylamid-gele wurden 8 ml einer 40 %igen Acrylamid-Stammlösung, 3 ml des 10 x Boratpuffers (10 x TBE-Puffer) und 9,6 g Harnstoff mit etwa 1,5 ml bidest. Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt (Ansetzen der Stammlösungen siehe Seite 268). Mit dieser Zusammensetzung erhielt man 16 %ige PAA-Gele, welche für die Analytik von 17mer Oligonukleotiden sehr gut geeignet waren. Nach vollständigem Lösen des Harnstoffs wurde die Polymerisation durch Zugabe von 15 µl TEMED und 150 µl einer 10 %igen, wäßrigen

APS-Lösung gestartet. Die Lösung wurde sofort blasenfrei zwischen zwei 10 x 10 cm große, silanisierte Glasplatten gegossen. Die Dicke der analytischen Gele betrug 0,75 mm. Mit den angegebenen Mengen konnten zwei Gele parallel gegossen werden.

Lyophilisierte Proben der Oligonukleotide (je 0,05 OD₂₆₀-Einheiten) wurden in 5 µl gefärbter Formamidlösung (0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol in Formamid) gelöst. Die Formamidlösungen wurden für 60 Sekunden im Wasserbad auf 95 °C erwärmt und mit Eis schockartig abgekühlt. Dadurch wurde eine mögliche Bildung von Sekundärstrukturen reduziert. Die Proben wurden in die Taschen des in die Elektrophoreseapparatur eingespannten Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V mit 1 x TBE als Laufpuffer. Nach 3 h wurde die Elektrophorese abgebrochen, die Gele von den Platten gelöst, auf eine mit Haushaltsfolie umwickelte, mit Fluoreszenzmarker beschichtete Kieselgelplatte gelegt und die Banden im UV-Licht bei 366 nm und 254 nm fotografiert (siehe Abb. 8.15 und 8.16). Anschließend wurden die Banden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

Silberfärbung: Zur Fixierung der Banden wurde das Gel in einer 20 %igen Trichloressigsäurelösung für 10 min geschwenkt. Anschließend wurde zweimal je fünf Minuten mit bidest. Wasser gewaschen. Nun wurde das Gel 20 min mit einer 0,1 %igen Silbernitratlösung behandelt und danach gut mit Wasser gewaschen. Das Gel wurde in einer Lösung aus 3,75 g Natriumcarbonat und 64 µl Formalinlösung bis zur gewünschten Schwarzfärbung der Banden entwickelt. Die Färbung wurde durch Einlegen in 1 %ige Essigsäure gestoppt. Zur Präparierung wurde das Gel über Nacht in 5 %iger Glycerinlösung aufbewahrt und nach Einlegen in Zellophanfolie getrocknet.

12.4.6 Massenspektrometrie

Die Entwicklung weicher Ionisationstechniken erlaubt es, Moleküle mit Molekülmassen von mehreren tausend Dalton unfragmentiert in die Gasphase zu überführen. Für Oligonukleotide ist die Massenspektrometrie deshalb eine wichtige, analytische Methode. Leicht lassen sich Länge, Basenzusammensetzung und der Einbau von Modifikationen in Oligonukleotide überprüfen. Falls die zu analysierende Substanz durch die Ionisierung nicht fragmentiert wird, kann auch über die Reinheit eine qualitative Aussage getroffen werden. Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide wurden hauptsächlich mit Hilfe der

Electrospray-Ionisationstechnik (ESI) charakterisiert (Edmonds, 1990). Diese Methode ist eine spezielle Form der Ionisation unter Atmosphärendruck. Die gelöste Probe wird durch eine Stahlkapillare, die unter einer hohen elektrischen Spannung steht, geleitet und an deren Spitze aufgrund des sich dort befindlichen starken elektrischen Feldes zerstäubt. Ein Stickstoffstrom führt zum Verlust anhaftender Lösungsmittelmoleküle. Während dieser Desolvatation werden die Ionen aus dem Bereich der Atmosphärendruckionenquelle in das Hochvakuum des Massenspektrometers extrahiert. Salze - speziell Natrium - bilden Addukte mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat und können den Ionisationsprozeß empfindlich stören. Durch Ammoniumacetat-Präzipitation kann dieses Problem umgangen werden (Stults, 1991). Ammonium dissoziiert im Vakuum zu H^+ und Ammoniak.

Die matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) wurde fast zeitgleich von Karas und Hillenkamp sowie Tanaka eingeführt (Karas, 1988; Tanaka, 1988). Bei dieser Methode wird der Analyt mit einer Matrix im Überschuß kokristallisiert und anschließend mit einem IR- oder UV-Laserpuls im Hochvakuum des Spektrometers beschossen. Häufig verwendete Matrixsubstanzen für Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm sind 2,4,6-Trihydroxyacetophenon oder 3-Hydroxypicolinsäure. Als gepulste Desorptions-/Ionisationsmethode wird MALDI häufig mit einem Flugzeit (engl.: time of flight, TOF) Massenspektrometer kombiniert, in dem alle Ionen in einem elektrischen Feld mit der gleichen Energie beschleunigt und gemäß ihres Masse-/Ladungsverhältnisses zeitgleich aufgetrennt werden. Die MALDI-Massenspektrometrie ist weniger empfindlich gegenüber Kontamination der Probe mit Salzen. Die Methode wurde trotzdem seltener zur Analytik eingesetzt, da die untersuchten DNA-Oligonukleotide häufig zur Depurinierung neigten. Hingegen lassen sich RNA-Proben aufgrund der Stabilisierung der glykosidischen Bindung durch die 2'-Hydroxylgruppe besser unfragmentiert analysieren (Lehmann, 1996).

12.5 Aufnahme von UV-Schmelzkurven

UV-Schmelzkurven wurden in einem UV-/VIS-Spektralphotometer Cary 1 der Firma Varian mit Peltier-gesteuertem, thermostatisierbarem Küvettenhalter gemessen. Als Puffer diente ein Phosphatpuffer der Zusammensetzung 140 mM Natriumchlorid und 10 mM Phosphat bei einem pH von 7,0. Damit entspricht die Salzkonzentration des Puffers ungefähr der des Blutserums. 100 ml des Natriumphosphatpuffers wurden durch Lösen von 207

mg (0,577 mmol) *di*-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, 66 mg (0,423 mmol) Natriumdihydrogenphosphat und 818 mg (14,0 mmol) Natriumchlorid in Wasser und Auffüllen auf 100 ml bereitet. Das verwendete Wasser wurde zuvor mit Diethylpyrocarbonat behandelt. Dazu wurde eine 0,1 %ige Lösung über Nacht stehen gelassen und anschließend 30 min autoklaviert. Der pH-Wert des Puffers wurde falls erforderlich mit Salzsäure oder Natriumhydroxid nachgestellt.

Für den Nullabgleich wurde die Proben- und die Referenzküvette mit der Schichtdicke 1 cm mit 1 ml des Phosphatpuffers gefüllt. Nach Einbringen der Küvetten in den Strahlengang wurde bei einer Wellenlänge von 350 nm der Nullabgleich durchgeführt. Zur Bestimmung der Schmelzpunkte der Antisense Oligonukleotide gegen ihre „target“-Sequenz wurden unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der Einzelstränge equimolare Lösungen von je 2 μ M hergestellt. Von den Stammlösungen der Oligonukleotide wurden hierzu Portionen von je 2 μ mol in Eppendorf-Caps in der SpeedVac zur Trockene eingeengt. Antisense- und „target“-Strang wurden in je 500 μ l Phosphatpuffer gelöst, innig miteinander vermischt und in die Probenküvette pipettiert. Für konzentrationsabhängige Messungen standen Quarzküvetten unterschiedlicher Schichtdicken (0,1 cm bis 1,0 cm) und unterschiedlicher Volumina (120 μ l bis 3 ml) zur Verfügung. Die gewünschte Konzentration wurde in diesen Fällen durch Verdünnen mit Phosphatpuffer eingestellt.

Vor Beginn der Messung wurden die Küvetten gut verschlossen, um Konzentrationsänderungen durch Verdampfen zu verhindern. In der nun folgenden „Denaturierungsrampe“ wurden die Küvetten für 10 min auf 80 °C erwärmt und danach in Schritten von 5 °C/min wieder renaturiert (Programm „denat.adl“). Die eigentliche Messung der Schmelzkurve erfolgte zumeist zwischen 20 °C und 80 °C, wobei um 0,5 °C/min erwärmt und alle 30 Sekunden die Extinktion zeitgleich bei 260 nm und 274 nm gemessen wurde (Programm „dna2hblk.adl“). Die gemessene Temperatur entsprach der Temperatur des Probenblocks des Spektrometers. Bei Messungen unter 20 °C wurde die Küvettenkammer mit Stickstoff gespült, um Kondensation von Luftfeuchtigkeit auf den Küvetten zu vermeiden. Nach beendeter Messung wurden die Daten automatisch aufgezeichnet und die Probe wieder auf 20 °C gekühlt. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Bestimmung der Schmelzpunkte aus den experimentell ermittelten Schmelzkurven erfolgte durch computerunterstützte Anpassung der Parameter nach Gleichung [12-5] (Miller, 1987; Frauendorf, 1993). Die nichtlineare Regression wurde mit Hilfe des Programms SigmaPlot 3.02 der Fa. Jandel Corporation durchgeführt. Die konstanten Faktoren

a und b entsprechen der Steigung der nach Basislinienkorrektur erhaltenen Geraden. Bei zusätzlicher Kenntnis des Werts für die Extinktion bei 80 °C ist es möglich, die Extinktionswerte der Einzelstränge bei 25 °C zu extrapolieren. Dies wiederum ist Voraussetzung für die Konzentrationsbestimmung nach Gleichung [12-2] und [12-4]. Gleichung [12-5] gilt streng genommen nur für unimolekulare Übergänge. Danach wäre nur die Bestimmung der Schmelzpunkte der in Kapitel 9.2.3 untersuchten Hairpinstrukturen erlaubt. Da Gleichung [12-5] aber den Kurvenverlauf bimolekularer Übergänge recht gut wiedergibt, wurden die Schmelzpunkte selbstkomplementärer CGCGCG-Hexamere und die Schmelzpunkte der Antisense Oligonukleotide mit ihren Zielsequenzen ebenfalls nach Gleichung [12-5] ermittelt. Bei bimolekularen Übergängen ist es jedoch nicht möglich, aus Gleichung [12-5] die Enthalpie des Übergangs ΔH korrekt zu bestimmen.

$$[12-5] \quad OD(T) = \frac{OD_{20}^0 + a \cdot T}{1 + \left[e^{\left(-\frac{\Delta H (T-T_m)}{R \cdot T_m^2} \right)} \right]^{-1}} + \frac{OD_{80}^0 + b \cdot T}{1 + \left[e^{\left(-\frac{\Delta H (T-T_m)}{R \cdot T_m^2} \right)} \right]}$$

Aus diesem Grunde wurden thermodynamische Parameter wie ΔG , ΔH und ΔS für nicht selbstkomplementäre, bimolekulare Übergänge über die Konzentrationsabhängigkeit des Schmelzpunkts nach Gleichung [12-6] bestimmt. Zur Herleitung von Gleichung [12-6] sei auf die Literatur verwiesen (Marky, 1987; Puglisi, 1989; Frauendorf, 1993; Schweitzer, 1998). Die Schmelzpunkte von selbstkomplementären CGCGCG-Hexameren wurden innerhalb eines Konzentrationsfensters von 350 μM bis hin zu etwa 2 μM durch stete Verdünnung der Proben und Vergrößern der Schichtdicke der Küvetten gemessen. Für selbstkomplementäre, bimolekulare Übergänge gilt Gleichung [12-7]. Die thermodynamischen Kenngrößen unimolekularer Übergänge können aufgrund der Konzentrationsunabhängigkeit der Schmelzpunkte mit dieser Methode nicht ermittelt werden.

$$[12-6] \quad 1 / T_m = (R / \Delta H) \cdot \ln c_t + (\Delta S - R \ln 4) / \Delta H$$

$$[12-7] \quad 1 / T_m = (R / \Delta H) \cdot \ln c_t + (\Delta S / \Delta H)$$

Trägt man den Kehrwert des Schmelzpunkts eines Oligonukleotid-Duplexes ($1 / T_m$) gegen den natürlichen Logarithmus der Gesamtstrangkonzentration ($\ln c_t$) auf, so erwartet man eine Gerade mit der Steigung ($R / \Delta H$) und dem Achsenabschnitt ($\Delta S / \Delta H$) für selbstkom-

plementäre, bimolekulare Übergänge. Aus der Steigung der Geraden erhält man ΔH und aus dem Ordinatenschnittpunkt ΔS (Marky, 1987; Puglisi, 1989).

12.6 CD-Spektroskopie von Oligonukleotiden

CD-Spektren von Oligonukleotiden wurden auf einem Jasco J-710 Spectropolarimeter aufgenommen, das mit einem thermostatisierten (Neslab RTE-100) Küvettenhalter ausgerüstet war. Für die Messungen wurden 1000 μl Quarzküvetten mit 10 mm Schichtdicke verwendet. Die maximale Extinktion (OD_{260}) der Proben lag etwa bei 1. Zum Auswerten der Spektren stand das Programm Standard Analysis, Version 1.33 (1995) der Fa. Jasco zur Verfügung. Folgende Geräteeinstellungen wurden verwendet: resolution 0,2 nm; scan speed 20 nm/min; response 4 sec und band width 1,0 nm. Es wurden jeweils fünf Spektren im Bereich von 210 nm bis 350 nm akkumuliert und gemittelt. Von den aufgenommenen Spektren wurde immer das unter gleichen Bedingungen aufgenommene Spektrum des Puffers subtrahiert.

Die aufgenommenen CD-Spektren dienen hauptsächlich der Untersuchung des in Kapitel 9.2.2 beschriebenen B \rightarrow Z-Übergangs bei CG Copolymeren. Hierzu war es erforderlich, den Salzgehalt des Phosphatpuffers von 140 mM Natriumchlorid auf 4 M Natriumchlorid zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurde eine Pufferlösung dieser Salzkonzentration bereitet. Analog der UV-Spektroskopie wurden die Proben vor jeder Messung für 10 min auf 80 °C erwärmt und anschließend in Schritten von 5 °C/min auf 20 °C abgekühlt, damit sich die native Struktur der modifizierten, selbstkomplementären Hexamere ausbilden konnte. Die Proben wurden bei 20 °C und 80 °C in Abhängigkeit der Wellenlänge vermessen.

Der Meßwert in der CD-Spektroskopie ist nicht die Extinktion OD_{260} , sondern die Elliptizität θ [mGrad]. Analog kann diese Größe bei bekannter Probenkonzentration c [mol/l] und bekannter Schichtdicke l [cm] in die molare Elliptizität $[\theta]$ umgerechnet werden. Es gilt Gleichung [12-8]. Den Zusammenhang zwischen der molaren Elliptizität $[\theta]$ und dem molaren Circular dichroismus $\Delta\epsilon$ verdeutlicht Gleichung [12-9]:

$$[12-8] \quad [\theta] = \theta / (10 \cdot c \cdot l)$$

$$[12-9] \quad \Delta\epsilon = \theta / 3298$$

13. Literaturverzeichnis

- Abb, J.;** *Ärztemerkblatt* des Deutschen Grünen Kreuzes, Ausgabe **1996**, Virushepatitiden
- Adams, S.P.;** Kavka, K.S.; Wykes, E.J.; Holder, S.B.; Galluppi, G.R.; Riftina, F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 661-663 Hindered dialkylamino nucleoside phosphite reagents on the synthesis of two DNA 51-mers
- Agarwal, K.L.;** Riftina, F.; *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6 (9)*, 3009-3024 Synthesis and enzymatic properties of deoxyribooligonucleotides containing methyl and phenylphosphonate linkages.
- Agrawal, S.;** Tamsamani, J.; Tang, J.Y.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88 (17)*, 7595-7599 Pharmacokinetics, biodistribution and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice
- Agrawal, S.;** Tamsamani, J.; Galbraith, W.; Tang, J.; *Clin. Pharmacokinet.* **1995**, *28 (1)*, 7-16 Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides
- Agrawal, S.;** Iyer, R.P.; *Pharmacol Ther.* **1997**, *76*, 151-160 Perspectives in antisense therapeutics
- Akhtar, S.;** Agrawal, S.; *TiPS* **1997**, *18*, 12-18 *In vivo* studies with antisense oligonucleotides
- Alberts, B.;** Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D.; VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim **1990**, Molekularbiologie der Zelle
- Alt, M.;** Renz, R.; Hofschneider, P.H.; Paumgartner, G.; Caselmann, W.H.; *Hepatology* **1995**, *22 (3)*, 707-717 Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides
- Alt, M.;** Renz, R.; Hofschneider, P.H.; Caselmann, W.H.; *Arch. Virol.* **1997**, *142*, 589-599 Core specific antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides as potent and specific inhibitors of hepatitis C viral translation

Alt, M.; Eisenhardt, S.; Serwe, M.; Renz, R.; Engels, J.W.; Caselmann, W.H.; *European Journal of Clinical Investigation* **1999**, 29 (10), 868-876 Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation

Avery, O.T.; MacLeod, C.M.; McCarty, M.; *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137-158 Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III

Baker, J.F.; Blickenstaff, R.T.; *J. Org. Chem.* **1975**, 40 (11), 1579-1586 Intramolecular catalysis. VIII. Effects on the acetylation of the 7 α -hydroxyl group of steroids. A ^1H nuclear magnetic resonance rate method

Baringhaus, K.-H.; Matter, H.; Stengelin, S.; Kramer, W.; *J. Lipid Res.* **1999**, 40, 1604-1617 Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na $^+$ /bile acid cotransporters of the rabbit. II. A reliable 3D QSAR pharmacophore model for the ileal Na $^+$ /bile acid cotransporter

Basu, S.; Wickstrom, E.; *Bioconjugate Chemistry* **1997**, 8, 481-488 Synthesis and characterization of a peptide nucleic acid conjugated to a D-peptide analog of insulin-like growth factor 1 for increased cellular uptake

Beaucage, S.L.; Caruthers, M.H.; *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22 (20), 1859-1862 Deoxynucleoside phosphoramidites - a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis

Beaucage, S.L.; Iyer, R.P.; *Tetrahedron* **1992**, 48, 2223-2311 Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach

Beaucage, S.L.; Iyer, R.P.; *Tetrahedron* **1993**, 49 (28), 6123-6194 The synthesis of modified oligonucleotides by the phosphoramidite approach and their applications

Beck, T.; *Pharmazeutische Zeitung* **1998**, 13, 11-18 Zur Anatomie des Menschen: Aufbau und Funktion der Leber

Beigelmann, L.; McSwiggen J.A.; Draper, K.G.; Gonzalez, C.; Jensen, K.; Karpeisky, A.M.; Modak, A.S.; Matulic-Adamic, J.; DiRenzo, A.B.; Haeberli, P.; Sweedler, D.; Tracz, D.; Grimm, S.; Wincott, F.E.; Thackray, V.G.; Usman, N.; *J. Biol. Chem.* **1995**, 270 (43), 25702-25708 Chemical modification of hammerhead ribozymes

Benimetskaya, L.; Berton, M.; Kolbanovsky, A.; Benimetsky, S.; Stein, C.A.; *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (13), 2648-2656 Formation of a G-tetrad and higher order structures correlates with biological activity of the RelA (NF-kappaB p65) antisense oligodeoxynucleotide.

Bennett, C.F.; *Biochemical Pharmacology* **1998**, *55*, 9-19 Antisense oligonucleotides: Is the glass half full or half empty?

Bergstrom, D.E.; Shum, P.W.; *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3953-3958 Synthesis and characterization of a new fluorine substituted nonionic dinucleoside phosphonate analogue, *P*-deoxy-*P*-(difluoromethyl)thymidylyl(3'→5')thymidine

Birikh, K.R.; Heaton, P.A.; Eckstein, F.; *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 1-16 The structure, function and application of the hammerhead ribozyme

Blake, K.R.; Murakami, A.; Spitz, S.A.; Glave, S.A.; Reddy, M.P.; Ts'o, P.O.P.; Miller, P.S.; *Biochemistry* **1985**, *24* (22), 6139-6145 Hybridization arrest of globin synthesis in rabbit reticulocyte lysates and cells by oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates

Bowe, C.L.; Mokhtarzadeh, L.; Venkatesan, P.; Babu, S.; Axelrod, H.R.; Sofia, M.J.; Karkarla, R.; Chan, T.Y.; Kim, J.S.; Lee, H.J.; Amidon, G.L.; Choe, S.Y.; Walker, S.; Kahne, D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12218-12223 Design of compounds that increase the absorption of polar molecules

Branch, A.D.; *TiBS* **1998**, *23*, 45-50 A good antisense molecule is hard to find

Brown, D.M.; Todd, A.R.; *J. Chem. Soc.* **1952**, 52-58 Nucleotides, part X. Some observations on structure and chemical behaviour of nucleic acids

Brown, E.L.; Belagaje, R.; Ryan, M.J.; Khorana, G; *Methods Enzymol.* **1979a**, *68*, 109-151 Chemical synthesis and cloning of a tyrosine tRNA gene

Brown, H.C.; Krishnamurthy, S.; *Tetrahedron* **1979b**, *35*, 567-607 Forty years of hydride reductions

Brown, E.A.; Zhang, H.; Ping, L.-H.; Lemon, S.M.; *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20* (19), 5041-5045 Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs

Brown-Driver, V.; Eto, T.; Lesnik, E.; Anderson, K.P.; Hanecak, R.C.; *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **1999**, 9, 145-154 Inhibition of translation of hepatitis C virus RNA by 2'-modified antisense oligonucleotides

Bukh, J.; Purcell, R.H.; Miller R.H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 4942-4946 Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus

Burlina, F.; Favre, A.; Fourrey, J.-L.; *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 5 (11), 1999-2010 Review article: Chemical engineering of RNase resistant and catalytically active hammerhead ribozymes

Callahan, L.; Han, F.-S.; Watt, W.; Duchamp, D.; Kézdy, F.J.; Agrarwal, K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 1617-1621 B- to Z-DNA transition probed by oligonucleotides containing methylphosphonates

Caruthers, M.H.; *Science* **1985**, 230, 281-285 Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses

Caruthers, M.H.; Barone, A.D.; Beaucage, S.L.; Dodds, D.R.; Fisher, E.F.; McBride, L.J.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J.-Y.; *Methods Enzymol.* **1987**, 154, 287-313 Chemical synthesis of deoxynucleotides by the phosphoramidite method

Caselmann, W.H.; Eisenhardt, S.; Alt, M.; *Intervirology* **1997**, 40, 394-399 Synthetic antisense oligodeoxynucleotides as potential drugs against hepatitis C

Caselmann, W.H.; Serwe, M.; Lehmann, T.; Ludwig, J.; Sproat, B.S.; Engels, J.W.; *World Journal of Gastroenterology* **2000**, 6 (5), 626-629 Design, delivery and efficacy testing of therapeutic nucleic acids used to inhibit hepatitis C virus gene expression *in vitro* and *in vivo*

Cech, T.R.; Zaug, A.J.; Grabowski, P.J.; *Cell* **1981**, 27, 487-496 *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence

Chargaff, E.; *Fed. Proc.* **1951**, 10, 654-659 Structure and function of nucleic acids as cell constituents

Choi, S.-K.; Goodnow, R.A.; Kalivretenos, A.; Chiles, G.W.; Fushiya, S.; Nakanishi, K.; *Tetrahedron* **1992**, *48* (23), 4793-4822 Synthesis of novel and photolabile philanthotoxin analogs: glutamate receptor antagonists

Choo, Q.-L.; Kuo, G.; Weiner, A.J.; Overby, L.R.; Bradley, D.W.; Houghton, M.; *Science* **1989**, *244*, 359-362 Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne Non-A, Non-B viral hepatitis genome

Choo, Q.-L.; Richman, K.H.; Han, J.H.; Berger, K.; Lee, C.; Dong, C.; Gallegos, C.; Coit, D.; Medina-Selby, A.; Barr, P.J.; Weiner, A.J.; Bradley, D.W.; Kuo, G.; Houghton, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2451-2455 Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus

Chow, T.Y.-K.; Juby, C.; Brousseau, R.; *Antisense Res. Dev.* **1994**, *4*, 81-86 Specific targeting of antisense oligonucleotides to neutrophils

Chu, M.; Mierzwa, R.; Truumees, I.; King, A.; Patel, M.; Berrie, R.; Hart, A.; Butkiewicz, N.; DasMahapatra, B.; Chan, T.-M.; Puar, M.S.; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (40), 7229-7232 Structure of Sch 68631: a new hepatitis C virus proteinase inhibitor from *Streptomyces* sp.

Cobb, J.E.; Johnson, M.R.; *Tetrahedron* **1991**, *47* (1), 21-30 Synthesis of 6-O-(2-aminoethyl)-D,L-myoinositol-1,2-cyclic phosphate: a model of a putative insulin second messenger

Cohen, J.; *Science* **1999**, *285*, 26-30 The scientific challenge of hepatitis C

Cohen, S.; Chang, A.; Boyer, H.; Helling, R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 3240-3244 Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*

Collins, D.J.; Rowley, L.E.; Swan, J.M.; *Aust. J. Chem.* **1974**, *27*, 831-839 Organophosphorus compounds. XII. A new synthesis of phosphindolines and phosphindoles

Conry-Cantilena, C.; *Tibtech* **1997**, *15*, 71-76 Hepatitis C virus diagnostics: technology, clinical applications and impacts

Cooper, R.G.; Etheridge, C.J.; Stewart, L.; Marshall, J.; Rudginsky, S.; Cheng, S.H.; Miller, A.D.; *Chem. Eur. J.* **1998**, *4* (1), 137-151 Polyamine analogues of 3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbamoyl]-cholesterol (DC-Chol) as agents for gene delivery

- Corey, D.R.;** *Tibtech* **1997**, *15*, 224-229 Peptide nucleic acids: Expanding the scope of nucleic acid recognition
- Corriu, R.J.P.;** Dutheil, J.-P.; Lanneau, G.F.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 101-103 Fluoride activation of nucleophilic displacement at tetrahedral phosphorus
- Corriu, R.J.P.;** Dutheil, J.-P.; Lanneau, G.F.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1060-1065 Silicon phosphorus analogies. Fluoride activation of nucleophilic displacement at the tetrahedral phosphorus: An example of nucleophilic assistance to nucleophilic substitution
- Corriu, R.J.P.;** Lanneau, G.F.; Leclercq, D.; *Tetrahedron* **1989**, *45* (7), 1959-1974 Silicon-phosphorus analogies. Nucleophilic catalysis in the alcoholysis of chlorophosphorus derivatives
- Cortese, F.;** *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 2532-2534 The synthesis of conjugated bile acids; IV. The bondi and mueller procedure
- Crick, F.H.C.;** *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, *12*, 138-163 On protein synthesis
- Crick, F.H.C.;** *Nature* **1970**, *227*, 561-563 Central dogma of molecular biology
- Crooke, S.T.;** Bennett, C.F.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996a**, *36*, 107-129 Progress in antisense oligonucleotide therapeutics
- Crooke, S.T.;** *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1996b**, *6*, 145-147 Proof of mechanism of antisense drugs
- Crooke, S.T.;** *Advances in Pharmacology* **1997**, *40*, 1-49 Advances in understanding the pharmacological properties of antisense oligonucleotides
- Crooke, S.T.;** *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1998a**, *8*, 115-122 An overview of progress in antisense therapeutics
- Crooke, S.T.;** *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1998b**, *8*, 133-134 Molecular mechanisms of antisense drugs: RNase H
- Dabkowski, W.;** Michalski, J.; Wasiak, J.; Cramer, F.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 817-820 A new general synthesis of organophosphorus P-F compounds via reaction of azolides of phosphorus acids with acyl fluorides: Novel route to 2-deoxynucleosidyl phosphorofluoridates and phosphorodifluoridates

Dabkowski, W.; Tworowska, I.; *Tetrahedron Lett.* **1995a**, 36 (7), 1095-1098 Synthesis of 2'-deoxynucleosid-3'-yl-*N,N*-diisopropylaminophosphorfluoridites. A new class of stable P^{III} nucleotides containing a P-F bond

Dabkowski, W.; Tworowska, I.; Michalski, J.; Cramer, F.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995b**, 1435-1436 Diastereoisomerically pure dinucleosidylphosphorfluoridites and their application in stereospecific synthesis of dinucleosidylphosphorfluoridothionates

Dabkowski, W.; Tworowska, I.; *Chemistry Letters* **1995c**, 727-728 First synthesis of nucleosidyl phosphorfluoridothioates and a convenient synthesis of nucleosidyl phosphorfluoridates

Dabkowski, W.; Tworowska, I.; Michalski, J.; Cramer, F.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1997**, 877-878 Trimethylchlorosilane: a novel activating reagent in nucleotide synthesis via the phosphoramidite route

Dahl, B.H.; Nielsen, J.; Dahl, O.; *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15 (4), 1729-1742 Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligonucleotide synthesis. I. Evidence for nucleophilic catalysis by tetrazole and rate variations with the phosphorus substituents

Dash, S.; Halim, A.-B.; Tsuji, H.; Hiramatsu, N.; Gerber, M.A.; *American Journal of Pathology* **1997**, 151 (2), 363-373 Transfection of HepG2 cells with infectious hepatitis C virus genome

Davis, G.L.; Balart, L.A.; Schiff E.R.; Lindsay, K.; Bodenheimer, H.C.; Perrillo, R.P.; Carey, W.; Jacobson, I.M.; Payne, J.; Dienstag, J.L.; VanThiel, D.H.; Tamburro, C.; Lefkowitz, J.; Albrecht, J.; Meschievitz, C.; Ortego, T.J.; Gibas, A.; *N. Engl. J. Med.* **1989**, 321 (22), 1501-1506 Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa

Davis, M.; *J. Chem. Soc.* **1962**, 178-181 The chemotherapy of schistosomiasis. Part V. Cholesteryl and choloyl derivatives of 4-amino-2-methoxyphenyl ethers

Dayal, B.; Bhojawala, J.; Rapole, K.R.; Pramanik, B.N.; Ertel, N.H.; Shefer, S.; Salen, G.; *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4 (6), 885-890 Chemical synthesis, structural analysis, and decomposition of *N*-nitroso bile acid conjugates

Dean, N.M.; Griffey, R.H.; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, 7, 229-233 Identification and characterization of second-generation antisense oligonucleotides

- DeClercq, E.;** Eckstein, F.; Sternbach, H.; Merigan, T.C.; *Virology* **1970**, 42, 421-428 The antiviral activity of thiophosphate-substituted polyribonucleotides *in vitro*
- DeLong, R.;** Stephenson, K.; Loftus, T.; Alahari, S.K.; Fisher, M.H.; Juliano, R.J.; *J. Pharm. Sci.* **1997**, 86, 762-764 Characterization of complexes of oligonucleotides with polyaminoamine starburst dendrimers and effects on intracellular delivery
- De Mesmaeker, A.;** Häner, R.; Martin, P.; Moser, H.E.; *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 366-374 Antisense oligonucleotides
- Dias, J.R.;** Ramachandra, R.; *Synthetic Communications* **1977**, 7 (4), 293-297 Studies directed toward synthesis of quassinoids - III. Selective hydrolysis of the 3 α -acetate functional group of cholic acid derivatives
- Di Bisceglie, A.M.;** Martin, P.; Kassianides, C.; Lisker-Melman, M.; Murray, L.; Waggoner, J.; Goodman, Z.; Banks, S.M.; Hoofnagle, J.H.; *N. Engl. J. Med.* **1989**, 321 (22), 1506-1510 Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C
- Di Bisceglie, A.M.;** Bacon, B.R.; *Spektrum der Wiss.* März **2000**, 28-34 Hepatitis C - Die stille Volksseuche
- Dickerson, R.E.;** *Spektrum der Wiss.* Februar **1984**, 78-95 Die Feinstruktur der DNA-Helix
- Drew, H.;** Takano, T.; Takano, S.; Itakura, K.; Dickerson, R.E.; *Nature* **1980**, 286, 567-573 High-salt d(CpGpCpG), a left-handed Z-DNA double helix
- Eckstein, F.;** *Angew. Chem.* **1983**, 95 (6), 431-447 Phosphorothioatanaloga von Nucleotiden - Werkzeuge zur Untersuchung biochemischer Prozesse
- Eckstein, F.;** *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 367-402 Nucleoside phosphorothioates
- Eckstein, F.;** Gish, G.; *TiBS* **1989**, 14, 97-100 Phosphorothioates in molecular biology
- Eckstein, F.;** IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo **1991** Oligonucleotides and analogues - a practical approach
- Eckstein, F.;** *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, 10, 117-121 Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: What is their origin and what is unique about them?

- Edmonds, C.G.;** Smith, R.D.; *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 412-431 Electrospray ionization mass spectrometry
- Eisenhardt, S.;** *Dissertation*, Frankfurt am Main **1996** Synthese und Anwendung Phosphatrückgrat-modifizierter Antisense Oligonucleotide gegen Hepatitis C Virus RNA
- Eisenhardt, S.;** Serwe, M.; Renz, R.; Engels, J.W.; Caselmann, W.H.; *Eur. J. Clin. Invest.* **1999**, *29*, 868-876 Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation
- Emmons, W.D.;** Ferris, A.F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2257 Metathetical reactions of silver salts in solution. II. The synthesis of alkyl sulfonates
- Engels, J.W.;** Jäger, A.; *Angew. Chem.* **1982a**, *94 (12)*, 931 Eine neue Synthese von Nucleosidmethylphosphonaten
- Engels, J.W.;** Jäger, A.; *Angew. Chem. Suppl.* **1982b**, 2010-2015 Eine neue Synthese von Nucleosidmethylphosphonaten
- Engels, J.W.;** *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991a**, *39 (1)*, 1250-1254 Krankheit - Fehler in der Informationsübertragung
- Engels, J.W.;** Löschner, T.; Frauendorf, A.; *Nucleosides & Nucleotides* **1991b**, *10 (1-3)*, 347-350 Diastereoselective synthesis of thymidine-methylphosphonate dimers
- Erlinger, S.;** *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **1996**, *11*, 575-579 Review Article: New insights into the mechanism of hepatic transport and bile secretion
- Fattal, E.;** Vauthier, C.; Aynie, I.; Nakada, Y.; Lambert, G.; Malvy, C.; Couvreur, P.; *J. Contr. Rel.* **1998**, *53*, 137-143 Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides
- Fearon, K.L.;** Hirschbein, B.L.; Chiu, C.-Y.; Quijano, M.R.; Zon, G.; *Ciba Foundation Symposium* **1997**, *209*, 19-37 Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: Large-scale synthesis and analysis, impurity characterization, and the effects of phosphorus stereochemistry
- Felgner, P.L.;** Gadek, T.R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringold, G.M.; Danielsen, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413-7417 Lipofec-tion: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure

- Fieser, L.F.;** Rajagopalan, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 3935-3938 Selective oxidation with N-bromosuccinimide I. Cholic acid
- Fieser, L.F.;** Herz, J.E.; Klohs, M.W.; Romero, M.A.; Utne, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3309-3313 Cationation (carbethoxylation) of steroid alcohols
- Fodor, S.P.A.;** Read, J.L.; Pirrung, M.C.; Stryer, L.; Lu, A.T.; Solas, D.; *Science* **1991**, *251*, 767-773 Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis
- Fodor, S.P.A.;** Rava, R.P.; Huang, X.C.; Pease, A.C.; Holmes, C.P.; Adams, C.L.; *Nature* **1993**, *364*, 555-556 Multiplexed biochemical assays with biological chips
- Forster, A.C.;** Symons, R.H.; *Cell* **1987**, *49*, 211-220 Self cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites
- Fraundorf, A.;** *Dissertation*, Frankfurt am Main **1993** Chemische Synthese und Charakterisierung von modifizierten Antisense-Oligonukleotiden mit und ohne Sekundärstruktur
- Freier, S.M.;** Altmann, K.-H.; *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (22), 4429-4443 The ups and downs of nucleic acid duplex stability: Structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes
- Gait, M.J.;** IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo **1984** Oligonucleotide synthesis - a practical approach
- Galynker, I.;** Still, W.C.; *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23* (43), 4461-4464 A simple method for tosylation with inversion
- Gao, H.;** Dias, J.R.; *Synthetic Communications* **1997**, *27* (5), 757-776 Synthesis of cyclocholates and derivatives
- Garegg, P.J.;** Lindh, I.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R.; *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4055-4058 Nucleoside-H-phosphonates
- Gat, Y.;** Lynn, D.G.; *Biopolymers* **1998**, *48*, 19-28 Reading DNA differently
- Giles, R.V.;** Ruddell, C.J.; Spiller, D.G.; Green, J.A.; Tidd, D.M.; *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23* (6), 954-961 Single base discrimination for ribonuclease H dependent antisense effects within human leukaemia cells

- Godard, G.;** Boutorine, A.S.; Saison-Behmoaras, E.; Hélène, C.; *Eur. J. Biochem.* **1995**, 232, 404-410 Antisense effects of cholesterol-oligodeoxynucleotide conjugates associated with poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles
- Goffeau, A.;** *et. al.;* *Science* **1996**, 274, 546-567 Life with 6000 genes
- Gold, L.;** Polisky, B.; Uhlenbeck, O.; Yarus, M.; *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 763-797 Diversity of oligonucleotide functions
- Goodchild, J.;** Agrawal, S.; Civeira, M.P.; Sarin, P.S.; Sun, D.; Zamecnik, P.C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5507-5511 Inhibition of human immunodeficiency virus replication by antisense oligodeoxynucleotides
- Gosh, M.K.;** Cohen, J.S.; *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **1992**, 12, 79-126 Oligodeoxynucleotides as antisense inhibitors of gene expression
- Goto, J.;** Sano, Y.; Chikai, T.; Nambara, T.; *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35 (11), 4562-4567 Synthesis of disulfates of unconjugated and conjugated bile acids
- Grand, R.;** Reichstein, T.; *Helv. Chim. Acta* **1945**, 28, 344-349 Über Gallensäuren und verwandte Stoffe: Derivate der Cholsäure
- Gray, D.M.;** Ratliff, R.L.; Vaughan, M.R.; *Methods Enzymol.* **1992**, 211, 389-406 Circular dichroism spectroscopy of DNA
- Gray, D.M.;** Hung, S.-H.; Johnson, K.H.; *Methods Enzymol.* **1995**, 246, 19-34 Absorption and circular dichroism spectroscopy of nucleic acid duplexes and triplexes
- Hagenbuch, B.;** Meier, P.J.; *Seminars in Liver Disease* **1996**, 16 (2), 129-136 Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes
- Hanecak, R.;** Brown-Driver, V.; Fox, M.C.; Azad, R.F.; Furusako, S.; Nozaki, C.; Ford, C.; Sasmor, H.; Anderson, K.P.; *J. Virol.* **1996**, 70 (8), 5203-5212 Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in transformed hepatocytes
- Hanessian, S.;** Lavalley, P.; *Can. J. Chem.* **1975**, 53, 2975-2977 The preparation and synthetic utility of *tert*-butyldiphenylsilyl ethers
- Hashmi, S.A.N.;** Kumar, A.; Katti, S.B.; *Nucleosides & Nucleotides* **1994**, 13 (5), 1039-1045 Synthesis and separation of dinucleoside phenylphosphonate diastereomers

Hayakawa, Y.; Uchiyama, M.; Kato, H.; Noyori, R.; *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26* (52), 6505-6508 Allyl protection of internucleotide linkage

Hayakawa, Y.; Hirose, M.; Noyori, R.; *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5551-5555 *O*-Allyl protection of guanine and thymine residues in oligodeoxyribonucleotides

Hayakawa, Y.; Kataoka, M.; Noyori, R.; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7996-7997 Benzimidazolium triflate as an efficient promoter for nucleotide synthesis via the phosphoramidite method

Hayashi, J.; Nakashima, K.; Noguchi, A.; Hirata, M.; Akazawa, K.; Kashiwagi, S.; *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **1992**, *3* (5), 305-309 Antiviral effect of interferon therapy for patients with chronic hepatitis C

Heidenreich, O.; Benseler, F.; Fahrenholz, A.; Eckstein, F.; *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (3), 2131-2138 High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-modified pyrimidine nucleosides and phosphorothioates

Helinski, J.; Dabkowski, W.; Michalski, J.; *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (37), 4981-4984 *N,N*-Diisopropyl-*O*-*p*-nitrophenyl-*P*-methylphosphonoamidite: novel difunctional P^{III} reagent in oligonucleoside methylphosphonate synthesis containing 4-nitrophenoxy group

Helinski, J.; Dabkowski, W.; Michalski, J.; *Tetrahedron Lett.* **1993a**, *34* (40), 6451-6454 New phosphitylating reagent in the nucleotide chemistry containing two 4-nitrophenoxy leaving groups. Remarkably fast and clean phosphitylations activated by DBU leading to thio- and seleno-oligonucleotides

Helinski, J.; Dabkowski, W.; Michalski, J.; *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **1993b**, *76*, 135-138 New phosphitylating reagents containing aryloxy leaving group. Applications in nucleotide chemistry

Hershey, A.D.; Chase, M.; *J. Gen. Physiol.* **1952**, *36*, 39-56 Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage

Hertel, K.J.; Pardi, A.; Uhlenbeck, O.C.; Koizumi, M.; Ohtsuka, E.; Uesugi, S.; Cedergren, R.; Eckstein, F.; Gerlach, W.L.; Hodgson, R.; Symons, R.H.; *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20* (12), 3252 Numbering system for the hammerhead

- Hjalt, T.;** Wagner, E.G.H.; *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20* (24), 6723-6732 The effect of loop size in antisense and target RNAs on the efficiency of antisense RNA control
- Höfle, G.;** Steglich, W.; *Synthesis* **1972**, 619-621 4-Dialkylaminopyridines as acylation catalysts; III. Acylation of sterically hindered alcohols
- Höfle, G.;** Steglich, W.; Vorbrüggen, H.; *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 602-615 4-Dialkylaminopyridine als hochwirksame Acylierungskatalysatoren
- Hofmann, F.;** Michaelis, M.; Rieger, M.A.; Hasselhorn, H.M.; Berthold, H.; *Gesundheitswesen* **1997**, *59*, 452-460 Zur arbeitsmedizinischen Bedeutung der Hepatitis C bei Beschäftigten im Gesundheitsdienst
- Hogrefe, R.I.;** Vaghefi, M.M.; Reynolds, M.A.; Young, K.M.; Arnold Jr., L.J.; *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21* (9), 2031-2038 Deprotection of methylphosphonate oligonucleotides using a novel one-pot procedure
- Hoke, G.D.;** Draper, K.; Freier, S.M.; Gonzalez, C.; Brown-Driver, V.; Zounes, M.C.; Ecker, D.J.; *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19* (20), 5743-5748 Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection
- Hollemann, A.F.;** Wiberg, E.; Wiberg, N.; Walter de Gruyter, Berlin, New York **1985** Lehrbuch der Anorganischen Chemie
- Honda, M.;** Brown, E.A.; Lemon, S.M.; *RNA* **1996**, *2*, 955-968 Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA
- Houghton, M.;** Weiner, A.; Han, J.; Kuo, G.; Choo, Q.-L.; *Hepatology* **1991**, *14* (2), 381-388 Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease
- Hughes, J.;** Astriab, A.; Yoo, H.; Alahari, S.; Liang, E.; Sergueev, D.; Ramsay Shaw, B.; Juliano, R.L.; *Methods Enzymol.* **2000**, *313*, 342-358 *In vitro* transport and delivery of antisense oligonucleotides
- Hunziker, J.;** Leumann, C.; in: Modern Synthetic Methods, Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel **1995**, *7* (5), 331-419 Nucleic acid analogues: Synthesis and properties

Iida, T.; Shinohara, T.; Momose, T.; Tamura, T.; Matsumoto, T.; Nambara, T.; Chang, F.C.; *Synthesis* **1986**, 998-1004 Potential bile acid metabolites; synthesis of stereoisomeric 3,7,12-trihydroxy-5 α -cholanic acids and related compounds

Itaya, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 8587-8591 Isolation and characterization of a second RNase H (RNase HII) of *Escherichia coli* K-12 encoded by the *rnhB* gene

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN); *Eur. J. Biochem.* **1983**, 131, 9-15 Abbreviations and symbols for the description of conformations of polynucleotide chains

Iyer, C.P.; Egan, W.; Regan, J.B.; Beaucage, S.L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1253-1254 3H-1,2-Benzodithiol-3-one 1,1 dioxide as an improved sulfurization reagent in the solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates

Jacob, F.; Monod, J.; *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 318-356 Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins

Jäger, J.A.; Turner, D.H.; Zuker, M.; *Methods in Enzymol.* **1989**, 183, 281-306 Predicting optimal and suboptimal secondary structure for RNA

Jager, A.; Levy, M.J.; Hecht, S.M.; *Biochemistry* **1988**, 27 (19), 7237-7246 Oligonucleotide N-alkylphosphoramidates: synthesis and binding properties to polynucleotides

Jansen, R.; Schummer, D.; Irschik, H.; Höfle, G.; *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 975-988 Chemical modification of sorangicin A and structure-activity relationship I: Carboxyl and hydroxyl group derivatives

Johnston, B.H.; *Methods in Enzymol.* **1992**, 211, 127-158 Generation and detection of Z-DNA

Juliano, R.L.; Alahari, S.; Yoo, H.; Kole, R.; Cho, M.; *Pharm. Res.* **1999**, 16 (4), 494-502 Antisense pharmacodynamics: Critical issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides

Kamisako, T.; Gabazza, E.C.; Ishihara, T.; Adachi, Y.; *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **1999**, 14, 405-412 Molecular aspects of organic compound transport across the plasma membrane of hepatocytes

Kan, L.S.; Cheng, D.M.; Miller, P.S.; Yano, J.; Ts'ó, P.O.P.; *Biochemistry* **1980**, *19*(10), 2122-2132 Proton nuclear magnetic resonance studies on dideoxyribonucleoside methylphosphonates

Kanaya, S.; Ikehara, M.; in *Nucleic Acids and Mol. Biol.* **1993**, Vol. 7, ed. by Eckstein, F. and Lilley, D.M.J.; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg; Structure and function of ribonuclease HI from *Escherichia coli*

Karas, M.; Hillenkamp, F.; *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301 Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons

Khorana, H.G.; *Fed. Proc.* **1965**, *24*, 1473-1487 Polynucleotide synthesis and the genetic code

Klebba, C.; Ottmann, O.G.; Scherr, M.; Pape, M.; Engels, J.W.; Grez, M.; Hoelzer, D.; Klein, S.A.; *Gene Therapy* **2000**, *7*, 408-416 Retrovirally expressed anti-HIV ribozymes confer a selective survival advantage on CD4⁺ T cells *in vitro*

Knowles, W.S.; Fried, J.; Elderfield, R.C.; *J. Org. Chem.* **1942**, *7*, 383-388 Studies on lactones related to the cardiac aglycones. IX. β -Substituted- $\Delta^{\alpha\beta}$ -butenolides of the norcholeane series

Kramer, W.; Wess, G.; Schubert, G.; Bickel, M.; Girbig, F.; Gutjahr, U.; Kowalewski, S.; Baringhaus, K.-H.; Enhsen, A.; Glombik, H.; Müllner, S.; Neckermann, G.; Schulz, S.; Petzinger, E.; *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (26), 18598-18604 Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids

Kramer, W.; Wess, G.; Neckermann, G.; Schubert, G.; Fink, J.; Girbig, F.; Gutjahr, U.; Kowalewski, S.; Baringhaus, K.-H.; Böger, G.; Enhsen, A.; Falk, E.; Friedrich, M.; Glombik, H.; Hoffmann, A.; Pittius, C.; Urmann, M.; *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (14), 10621-10627 Intestinal absorption of peptides by coupling to bile acids

Kramer, W.; Wess, G.; *Eur. J. Clin. Invest.* **1996**, *26*, 715-732 Bile acid transport systems as pharmaceutical targets

Kramer, W.; Wess, G.; Bewersdorf, U.; Corsiero, D.; Girbig, F.; Weyland, C.; Stengelin, S.; Enhsen, A.; Bock, K.; Kleine, H.; Le Dreau, M.-A.; Schäfer, H.-L.; *Eur. J. Biochem.*

1997a, 249, 456-464 Topological photoaffinity labeling of the rabbit ileal Na⁺/bile-salt-cotransport system

Kramer, W.; Wess, G.; Enhsen, A.; Falk, E.; Hoffmann, A.; Neckermann, G.; Schubert, G.; Urmann, M.; *Journal of Controlled Release* **1997b**, 46, 17-30 Modified bile acids as carriers for peptides and drugs

Kramer, W.; Stengelin, S.; Baringhaus, K.-H.; Enhsen, A.; Heuer, H.; Becker, W.; Corsiero, D.; Girbig, F.; Noll, R.; Weyland, C.; *J. Lip. Res.* **1999**, 40, 1604-1617 Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na⁺/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters

Kraus, G.A.; Wu, Y.; *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2922-2925 Hydrogen atom abstraction reactions in organic synthesis. A formal total synthesis of racemic podophyllotoxin

Krieg, A.M.; Tonkinson, J.; Matson, S.; Zhao, Q.; Saxon, M.; Zhang, L.-M.; Bhanja, U.; Yakubov, L.; Stein, C.A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 1048-1052 Modification of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides by a 5' cholesteryl moiety increases cellular association and improves efficacy

Krieg, A.M.; Matson, S.; Fisher, E.; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1996**, 6, 133-139 Oligonucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs

Lebedev, A.V.; Frauendorf, A.; Vyazovkina, E.V.; Engels, J.W.; *Tetrahedron* **1993**, 49 (5), 1043-1052 Determination and prediction of the absolute configuration of dinucleoside alkylphosphonates using conformational analysis and multivariate statistics

Lebedev, A.V.; Wickstrom, E.; *Perspectives in Drug Discovery and Design* **1996**, 4, 17-40 in: *Antisense Therapeutics: Progress and Prospects*, edited by G.L. Trainor, ESCOM, Leiden The chirality problem in P-substituted oligonucleotides

Lehmann, T.; *Diplomarbeit*, Frankfurt am Main **1995** Synthese und Eigenschaften von DNA-Dimeren mit P-F-Bindung

Lehmann, T.J.; Eisenhardt, S.; Engels, J.W.; *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, 16 (5&6), 815-820 Synthesis and characterization of phosphate-modified DNA-dimers with fluorine as an uncharged ligand

Lehmann, T.J.; Schwarzer, K.; Schweitzer, M.; Engels, J.W.; *Collection Symposium Series* **1999a**, 2, 302-305 Thermodynamic and CD-spectroscopic characterization of self-complementary methyl- and benzyl-modified d(CGcPcGCG)-hexamers

Lehmann, T.J.; Eisenhardt, S.; Engels, J.W.; *Nucleosides & Nucleotides* **1999b**, 18 (6&7), 1689-1691 Thermodynamic studies on hairpin forming antisense-oligodeoxynucleotides directed against hepatitis C virus RNA

Lehmann, T.J.; Serwe, M.; Caselmann, W.H.; Engels, J.W.; *Nucleosides & Nucleotides* **2001a**, 20 (4-7), 1343-1346 Design and Properties of Hepatitis C Virus Antisense Oligonucleotides for Liver Specific Drug Targeting

Lehmann, T.J.; Engels, J.W.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001b**, 9 (7), 1827-1835 Synthesis of bile acid phosphoramidites and their properties when 5'-tethered to antisense oligodeoxynucleotides against HCV

Lehmann, W.D.; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford **1996** Massenspektrometrie in der Biochemie

Leonetti, J.P.; Mechti, N.; Degols, G.; Gagnor, C.; Lebleu, B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 2702-2706 Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides

Lepoittevin, J.-P.; Benezra, C.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33 (27), 3875-3878 ¹³C-Enriched methyl alkanesulfonates: new lipophilic methylating agents for the identification of nucleophilic amino acids of proteins by NMR

Lesnik, E.A.; Guinosso, C.J.; Kawasaki, A.M.; Sasmor, H.; Zounes, M.; Cummins, L.L.; Ecker, D.J.; Cook, P.D.; Freier, S.M.; *Biochemistry* **1993**, 32 (30), 7832-7838 Oligodeoxynucleotides containing 2'-O-modified adenosine: Synthesis and effects on stability of DNA:RNA duplexes

Letsinger, R.L.; Finnan, J.L.; Heaver, G.A.; Lunsford, W.B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97 (11), 3278-3279 Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links

Letsinger, R.L.; Lunsford, W.B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 3655-3661 Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates

- Letsinger, R.L.;** Zhang, G.; Sun, D.K.; Ikeuchi, T.; Sarin, P.S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6553-6556 Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: Synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture
- Levine, A.J.;** Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York **1996** Viren - Diebe, Mörder und Piraten
- Levis, J.T.;** Butler, W.O.; Tseng, B.Y.; Ts' O, P.O.P.; *Antisense Res. Dev.* **1995**, *5*, 251-259 Cellular uptake of oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates
- Lieber, A.;** He, C.-Y.; Polyak, S.J.; Gretch, D.R.; Barr, D.; Kay, M.A.; *J. Virol.* **1996**, *70* (12), 8782-8791 Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes
- Lima, W.F.;** Brown-Driver, V.; Fox, M.; Hanecak, R.; Bruice, T.W.; *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (1), 626-638 Combinatorial screening and rational optimization for hybridization to folded hepatitis C virus RNA of oligonucleotides with biological antisense activity
- Lisboa, B.P.;** *J. Chromatog.* **1964**, *16*, 136-151 Characterization of Δ^4 -3-oxo-C₂₁-steroids on thin-layer chromatograms by *in situ* colour reactions
- Liu, M.;** Duncan Farrant, R.; Sweatman, B.C.; Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1995**, *113*, 251-256 Observation of separate *J*-resolved ¹H NMR spectra from CH, CH₂, and CH₃ groups using a maximum-quantum filter
- Lodish, H.;** Baltimore, D.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Darnell, J.; Übers. v. Träger, L.; De Gruyter **1996** Molekulare Zellbiologie
- Löschner, T.;** Engels, J. W.; *Tetrahedron Lett.* **1989a**, *30* (41), 5587-5590 One pot Rp-diastereoselective synthesis of dinucleoside methylphosphonates using methyldichlorophosphine
- Löschner, T.;** *Dissertation*, Frankfurt am Main **1989b** Nucleosid-Methylphosphonate: Diastereoselektive Synthese, Konfigurationsbestimmung und biologische Wirkung
- Löschner, T.;** Engels, J. W.; *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18* (17), 5083-5088 Diastereomeric dinucleoside-methylphosphonates: determination of configuration with the 2-D NMR ROESY technique

- Lohmann, V.;** Körner, F.; Koch, J.-O.; Herian, U.; Theilmann, L.; Bartenschlager, R.; *Science* **1999**, 285, 110-113 Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line
- Loke, S.L.;** Stein, C.A.; Zhang, X.H.; Mori, K.; Nakanishi, M.; Subasinghe, C.; Cohen, J.S.; Neckers, L.M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 3474-3478 Characterization of oligonucleotide transport into living cells
- MacKellar, C.;** Graham, D.; Will, D.W.; Burgess, S.; Brown, T.; *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20 (13), 3411-3417 Synthesis and physical properties of *anti*-HIV antisense oligonucleotides bearing terminal lipophilic groups
- Mag, M.;** Jahn, K.; Kretzschmar, G.; Peyman, A.; Uhlmann, E.; *Tetrahedron* **1996**, 52 (30), 10011-10024 Synthesis and duplex stability of oligodeoxynucleotides containing stereoregular or stereorandom octylphosphonate linkages
- Mag, M.;** Muth, J.; Jahn, K.; Peyman, A.; Kretzschmar, G.; Engels, J.W.; Uhlmann, E.; *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5 (12), 2213-2220 Synthesis and binding properties of oligodeoxynucleotides containing phenylphosphon(othio)ate linkages
- Manoharan, M.;** Johnson, L.K.; Bennett, C.F.; Vickers, T.A.; Ecker, D.J.; Cowser, L.M.; Freier, S.M.; Cook, P.D.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **1994**, 4 (8), 1053-1060 Cholic acid-oligonucleotide conjugates for antisense applications
- Manoharan, M.;** Tivel, K.L.; Andrade, L.K.; Mohan, V.; Condon, T.P.; Bennett, C.F.; Cook, P.D.; *Nucleosides & Nucleotides* **1995**, 14 (3-5), 969-973 Oligonucleotide conjugates: Alteration of the pharmacokinetic properties of antisense agents
- Marky, L.A.;** Breslauer, K.J.; *Methods Enzymol.* **1987**, 26, 1601-1620 Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves
- Maxam, A.M.;** Gilbert, W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 560-564 A new method of sequencing DNA
- McBride, L.J.;** Caruthers, M.H.; *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24 (3), 245-248 An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides

- Meier, P.J.;** *Am. J. Physiol.* **1995**, 269, G801-G812 Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile
- Mendel, G.;** *Verhandlungen des Naturforschenden Vereins in Brünn* **1866**, 3-47 Versuche über Pflanzenhybriden
- Meselson, M.;** Stahl, F.W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, 44, 671-682 The replication of DNA in *Escherichia coli*
- Miller, A.D.;** *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1862-1880 Kationische Liposomen für die Gentherapie
- Miller, M.;** Kirchhoff, W.; Schwarz, F.; Appella, E.; Chiu, Y.-Y.H.; Cohen, J.S.; Sussman, J.; *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15 (9), 3877-3890 Conformational transitions of synthetic DNA sequences with inserted bases, related to the dodecamer d(CGCGAATTCGCG)
- Miller, P.S.;** Yano, J.; Yano, E.; Carroll, C.; Jayaraman, K.; Ts'ó, P.O.P.; *Biochemistry* **1979**, 18 (23), 5134-5143 Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates
- Miller, P.S.;** *BioTechnology* **1991**, 9, 358-362 Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents
- Miller, P.S.;** *Prog. in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.* **1996**, 52, 261-291 Development of antisense and antigene oligonucleotide analogs
- Milligan, J.F.;** Matteucci, M.D.; Martin, J.C.; *J. Med. Chem.* **1993**, 36 (14), 1925-1937 Current concepts in antisense drug design
- Milner, N.;** Mir, K.U.; Southern, E.M.; *Nature Biotechnology* **1997**, 15, 537-541 Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays
- Misiura, K.;** Pietrasiak, D.; Stec, W.J.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 613-614 Dithymidyl-3',5'-phosphorofluoridates: new synthesis and stability under solvolytic conditions
- Mizutani, T.;** Kato, N.; Hirota, M.; Sugiyama, K.; Murakami, A.; Shimotohno, K.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 212 (3), 906-911 Inhibition of hepatitis C virus replication by antisense oligonucleotide in culture cells

Modrow, S.; Falke, D.; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York
1997 Molekulare Virologie

Morsman, H.; Steiger, M.; Reichstein, T.; *Helv. Chim. Acta* **1936**, 20, 3-16 Abbau der
Cholsäure zu 3,7,12-Trioxo-pregnan-20-on

Moser, H.E.; Dervan, P.B.; *Science* **1987**, 238, 645-650 Sequence-specific cleavage of
double helical DNA by triple helix formation

Müller, H.M.; Pfaff, E.; Goeser, T.; Kallinowski, B.; Solbach, C.; Theilmann, L.; *Journal
of General Virology* **1993**, 74, 669-676 Peripheral blood leukocytes serve as a possible
extrahepatic site for hepatitis C virus replication

Müller, M.; Jansen, P.L.M.; *Am. J. Physiol.* **1997**, 272, G1285-G1303 Molecular aspects
of hepatobiliary transport

Musicki, B.; Widlanski, T.S.; *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 (10), 1267-1270 Synthesis of
nucleoside sulfonates and sulfones

Mutschler, E.; Schäfer-Korting, M.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
1996 Arzneimittelwirkungen

Narang, S.A.; Brousseau, R.; Hsiung, H.M.; Michniewicz, J.J.; *Methods Enzymol.* **1980**,
65, 610-620 Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the modified triester method

Narang, S.A.; *Tetrahedron* **1983**, 39, 3-22 DNA Synthesis
Nature Biotechnology **1997**, 15, 519-524 Antisense '97: A round table on the state of the
industry

Nielsen, J.; Brill, W.K.-D.; Caruthers, M.H.; *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29 (24), 2911-2914
Synthesis and characterization of dinucleoside phosphorothioates

Nielsen, P.E.; Egholm, M.; Berg, R.H.; Buchardt, O.; *Science* **1991**, 254, 1497-1500 Se-
quence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted
polyamide

Ninomiya, S.; Kohda, K.; Kawazoe, Y.; *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32 (4), 1326-1332 Stu-
dies on chemical carcinogenes and mutagenes. XXV. Chemoselectivity of alkyl sulfonates
toward 4-(p-nitrobenzyl)pyridine (NBP) in phosphate buffer

- Nirenberg, M.W.;** Matthaei, J.H.; Jones, O.W.; Martin, R.G.; Barondes, S.H.; *Fed. Proc.* **1963**, *22*, 55-61 Approximation of genetic code via cell-free protein synthesis directed by template RNA
- Niwa, T.;** Koshiyama, T.; Goto, J.; Nambara, T.; *Steroids* **1992**, *57*, 522-529 Synthesis of N-acetylglucosamides of unconjugated and conjugated bile acids
- Norman, A.;** *Arkiv för Kemi* **1955**, *8* (32), 331-342 Preparation of conjugated bile acids using mixed carboxylic acid anhydrides
- Ogilvie, K.K.;** *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 3799-3807 The *tert*-butyldimethylsilyl group as a protecting group in deoxynucleosides
- Padmapriya, A.A.;** Just, G.; Lewis, N.G.; *Synthetic Communications* **1985**, *15* (12), 1057-1062 A new method for the esterification of sulphonic acids
- Pagels, P.;** *Dissertation*, Gießen **1999** Synthese von Gallensäure-Oligonukleotid-Konjugaten und Charakterisierung der hepatischen Aufnahme und Elimination
- Pappo, R.;** Allen, D.S.; Lemieux, R.U.; Johnson, W.S.; *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 478-479 Osmium tetroxide-catalyzed periodate oxidation of olefinic bonds
- Patel, D.J.;** Suri, A.K.; Jiang, F.; Jiang, L.; Fan, P.; Kumar, R.A.; Nonin, S.; *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 645-664 Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes
- Patzel, V.;** Steidl, U.; Kronenwett, R.; Haas, R.; Sczakiel, G.; *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* (22), 4328-4334 A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability
- Perbost, M.;** Hoshiko, T.; Morvan, F.; Swayze, E.; Griffey, R.H.; Sanghvi, Y.S.; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5150-5156 Synthesis of 5'-*O*-amino-2'-deoxypyrimidine and purine nucleosides: building-blocks for antisense oligonucleotides
- Petzinger, E.;** Nickau, L.; Horz, J.A.; Schulz, S.; Wess, G.; Enhsen, A.; Falk, E.; Baringhaus, K.-H.; Glombik, H.; Hoffmann, A.; Müllner, S.; Neckermann, G.; Kramer, W.; *Hepatology* **1995**, *22* (6), 1801-1811 Hepatobiliary transport of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors conjugated with bile acids

Petzinger, E.; Wickboldt, A.; Pagels, P.; Starke, D.; Kramer, W.; *Hepatology* **1999**, *30*, 1257-1268 Hepatobiliary transport of bile acid amino acid, bile acid peptide, and bile acid oligonucleotide conjugates in rats

Peyman, A.; Ryte, A.; Helsberg, M.; Kretzschmar, G.; Mag, M.; Uhlmann, E.; *Nucleosides & Nucleotides* **1995**, *14* (3-5), 1077-1081 Enhanced cellular uptake of G-rich oligonucleotides

Peyman, A.; Uhlmann, E.; *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1996**, *377*, 67-70 Minimally modified oligonucleotides - combination of end-capping and pyrimidine-protection

Peyman, A.; Helsberg, M.; Kretzschmar, G.; Mag, M.; Ryte, A.; Uhlmann, E.; *Antiviral Res.* **1997**, *33* (2), 135-139 Nuclease stability as dominant factor in the antiviral activity of oligonucleotides directed against HSV-1 IE110

Plattner, P.A.; Heusser, H.; *Helv. Chim. Acta* **1944**, *27*, 748-757 Über Steroide und Sexualhormone: Über Beziehungen zwischen Konstitution und optischer Drehung in der Cholsäure-Reihe

Primrose, S.B.; Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft **1990** Biotechnologie

Puglisi, J.D.; Tinoco, I.; *Methods in Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325 Absorbance melting curves of RNA

Rao, M.V.; Reese, C.B.; Schehlmann, V.; Sang Yu, P.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 43-55 Use of the 1-(2-fluorophenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl- (Fpmp) protecting group in the solid-phase synthesis of oligo- and poly-ribonucleotides

Rawls, R.L.; *Chemical & Engineering News* **1997**, 35-39 Optimistic about antisense

Reddy, M.P.; Farooqui, F.; Hanna, N.B.; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (48), 8691-8694 Elimination of transamination side product by the use of dC^{Ac} methylphosphonamidite in the synthesis of oligonucleoside methylphosphonates

Reed, M.W.; Adams, A.D.; Nelson, J.S.; Meyer, R.B.; *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2* (4), 217-225 Acridine- and cholesterol-derivatized solid supports for improved synthesis of 3'-modified oligonucleotides

Reynolds, J.E.; Kaminski, A.; Kettinen, H.J.; Grace, K.; Clarke, B.E.; Carroll, A.R.; Rowlands, D.J.; Jackson, R.J.; *The EMBO Journal* **1995**, *14* (23), 6010-6020 Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation

Rijnbrand R.; Bredenbeek, P.; van der Straaten, T.; Whetter, L.; Inchauspé, G.; Lemon, S.; Spaan, W.; *FEBS Letters* **1995**, *365*, 115-119 Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation

Rowley, L.E.; Swan, J.M.; *Aust. J. Chem.* **1974**, *27*, 801-813 Organophosphorus compounds. X. A new synthesis of 1,2,3,4-tetrahydrophosphinolines

Rump, E.T.; de Vruh, R.L.A.; Sliedregt, L.A.J.M.; Biessen, E.A.L.; van Berkel, T.J.C.; Bijsterbosch, M.K.; *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 341-349 Preparation of conjugates of oligodeoxynucleotides and lipid structures and their interaction with low-density lipoprotein

Ruffner, D.E.; Storme, G.D.; Uhlenbeck, O.C.; *Biochemistry* **1990**, *29*, 10695-10702 Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction

Saenger, W.; Springer Verlag, New York, Berlin **1984** Principles of nucleic acid structure

Saiki, R.K.; Scharf, S.J.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N.; *Science* **1985**, *230*, 1350-1354 Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia

Saito, I.; Miyamura, T.; Ohbayashi, A.; Harada, H.; Katayama, T.; Kikuchi, S.; Watanabe, Y.; Koi, S.; Onji, M.; Ohta, Y.; Choo, Q.-L.; Houghton, M.; Kuo, G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6547-6549 Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma

Sakamoto, N.; Wu, C.H.; Wu, G.Y.; *Journal of Clinical Investigation* **1996**, *98* (12), 2720-2728 Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes

Samstag, W.; Engels, J. W.; *Angew. Chem.* **1992**, *104* (10), 1367-1369 Stereoselektive Synthese phosphatmodifizierter DNA-Bausteine

Samstag, W.; *Dissertation*, Frankfurt am Main **1994** Synthese, Charakterisierung und Anwendung phosphatmodifizierter DNA-Analoga

Samstag, W.; Eisenhardt, S.; Offensperger, W.B.; Engels, J.W.; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1996**, *6*, 153-156 Synthesis and properties of new antisense oligodeoxynucleotides containing benzylphosphonate linkages

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 5463-5467 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors

Schaller, H.; Weimann, G.; Lerch, B.; Khorana, H.G.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3821-3827 Studies on polynucleotides. XXIV. The stepwise synthesis of specific deoxyribopolynucleotides (4). Protected derivatives of deoxyribonucleosides and new syntheses of deoxyribonucleoside-3' phosphates

Schell, P.; Engels, J.W.; *Tetrahedron Lett.* **1998a**, *39*, 8629-8632 Rp-Diastereoselective synthesis of dinucleoside methylphosphonates by the phosphoramidite approach

Schell, P.; *Dissertation*, Frankfurt am Main **1998b** Untersuchungen zur diastereoselektiven Synthese von Methylphosphonaten nach der Phosphoramiditmethode

Scherr, M.; Grez, M.; Ganser, A.; Engels, J.W.; *J. Biol. Chem.* **1997a**, *272* (22), 14304-14313 Specific hammerhead ribozyme-mediated cleavage of mutant N-ras mRNA *in vitro* and *ex vivo*

Scherr, M.; Klebba, C.; Häner, R.; Ganser, A.; Engels, J.W.; *Bioorg. & Med. Chem. Letters* **1997b**, *7* (13), 1791-1796 Synthesis and properties of hammerhead ribozymes stabilized against nucleases by different 2'-modifications: methoxyethoxy-, fluoro- and amino groups

Schlingensiepen, R.; Brysch, W.; Schlingensiepen, K.-H.; Blackwell Science, Berlin, Wien **1997** Antisense - from technology to therapy

Schröder, M.; *Chem. Rev.* **1980**, *80*, 187-213 Osmium tetroxide cis hydroxylation of unsaturated substrates

Schuler, G.D.; *et al.;* *Science* **1996**, *274*, 540-546 A gene map of the human genome

Schummer, D.; Irschik, H.; Höfle, G.; *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 293-304 Chemische Modifikation von Sorangicin A und Struktur-Wirkungs-Beziehung II: Derivate aus Reduktions-, Oxidations- und Umlagerungsreaktionen

Schwab, G.; Chavany, C.; Duroux, I.; Goubin, G.; Lebeau, J.; Helene, C.; Saison-Behmoaras, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10460-10464 Antisense oligonucleotides adsorbed to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles specifically inhibit mutated *Ha-ras*-mediated cell proliferation and tumorigenicity in nude mice

Schwarzer, K.; *Diplomarbeit*, Frankfurt am Main **1997** Synthese und Eigenschaften von diastereoselektiven Methylphosphonaten

Schweitzer, M.; *Dissertation*, Frankfurt am Main **1998** Synthese und Untersuchung chemisch modifizierter DNA am Beispiel der Oligonucleosid-Methylphosphonate

Scott, W.G.; Finch, J.T.; Klug, A.; *Cell* **1995**, *81*, 991-1002 The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for catalytic cleavage

Scott, W.G.; Murray, J.B.; Arnold, J.R.P.; Stoddard, B.L.; Klug, A.; *Science* **1996**, *274*, 2065-2069 Capturing the structure of a catalytic RNA intermediate: The hammerhead ribozyme

Sczakiel, G.; **2000**, schriftliche Mitteilung

Searle, M.S.; Williams, D.H.; *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2051-2056 On the stability of nucleic acid structures in solution: enthalpy-entropy compensations, internal rotations and reversibility

Seki, M.; Honda, Y.; *J. Biochem.* **1995**, *118* (6), 1199-1204 Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides capable of inhibiting hepatitis C virus gene expression: *in vitro* translation assay

Shimayama, T.; Nishikawa, S.; Taira, K.; *Biochemistry* **1995**, *34*, 3649-3654 Generality of the NUX rule: kinetic analysis of the results of systematic mutations in the trinucleotide at the cleavage site of hammerhead ribozymes

Shoji, Y.; Akhtar, S.; Periasamy, A.; Herman, B.; Juliano, R.L.; *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19* (20), 5543-5550 Mechanism of cellular uptake of modified oligodeoxynucleotides containing methylphosphonate linkages

Simmonds, P.; Holmes, E.C.; Cha, T.-A.; Chan, S.-W.; McOmish, F.; Irvine, B.; Beall, E.; Yap, P.L.; Kolberg, J.; Urdea, M.S.; *Journal of General Virology* **1993**, *74*, 2391-2399

Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region

Sinha, N.D.; Großbruchhaus, V.; Köster, H.; *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24 (9), 877-880 A new synthesis of oligodeoxynucleoside methylphosphonates on controlled pore glass polymer support using phosphite approach

Southern, E.M.; Case-Green, S.C.; Elder, J.K.; Johnson, M.; Mir, K.U.; Wang, L.; Williams, J.C.; *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22 (8), 1368-1373 Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids

Stahl, E.; Kaltenbach, U.; *J. Chromatog.* **1961**, 5, 351-355 Dünnschicht-Chromatographie: Spurenanalyse von Zuckergemischen auf Kieselgur G-Schichten

Stec, W.J.; Wilk, A.; *Angew. Chem.* **1994**, 106, 747-761 Stereokontrollierte Synthese von Oligonucleosidphosphorothioaten

Stein, C.A.; Subasinghe, C.; Shinozuka, K.; Cohen, J.S.; *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16 (8), 3209-3221 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides

Stein, C.A.; Pal, R.; DeVico, A.L.; Hoke, G.; Mumbauer, S.; Kinstler, O.; Sarngadharan, M.G.; Letsinger, R.L.; *Biochemistry* **1991**, 30 (9), 2439-2444 Mode of action of 5'-linked cholesteryl phosphorothioate oligodeoxynucleotides in inhibiting syncytia formation and infection by HIV-1 and HIV-2 *in vitro*

Stein, C.A.; Cheng, Y.-C.; *Science* **1993**, 261, 1004-1012 Antisense oligonucleotides as therapeutic agents - Is the bullet really magical?

Stein, C.A.; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1998**, 8, 129-132 How to design an antisense oligodeoxynucleotide experiment: A consensus approach

Stephenson, M.L.; Zamecnik, P.C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75 (1), 285-288 Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide

Stieger, B.; Meier, P.J.; *Current Opinion in Cell Biology* **1998**, 10, 462-467 Bile acid and xenobiotic transporters in liver

Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A.; *J. Org. Chem.* **1978**, 43 (14), 2923-2925 Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution

Stryer, L.; 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford **1996**
Biochemie

Stull, R.A.; Szoka, F.C.; *Pharm. Res.* **1995**, *12* (4), 465-483 Antigene, ribozyme and aptamer nucleic acid drugs: Progress and prospects

Stults, J.T.; Marsters, J.C.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 359-363 Improved electrospray ionization of oligodeoxynucleotides

Suchy, F.J.; Sippel, C.J.; Ananthanarayanan, M.; *FASEB J.* **1997**, *11*, 199-205 Bile acid transport across the hepatocyte canalicular membrane

Symons, R.H.; *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 641-671 Small catalytic RNAs

Szabó, T.; Stawinski, J.; *Tetrahedron* **1995**, *51* (14), 4145-4160 Synthesis and some conformational features of the 5'-deoxy-5'-methylphosphonate linked dimer, 5'-deoxy-5'-C-(phosphonomethyl)thymidin-3'-yl (thymidin-5'-yl)methylphosphonate [p(CH₂)Tp(CH₂)T]

Szoka, F.C.; *Nature Biotechnology* **1997**, *15*, 509 Many are probed, but few are chosen

Takamizawa, A.; Mori, C.; Fuke, I.; Manabe, S.; Murakami, S.; Fujita, J.; Onishi, E.; Andoh, T.; Yoshida, I.; Okayama, H.; *J. Virol.* **1991**, *65* (3), 1105-1113 Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers

Tanaka, K.; Waki, H.; Iod, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151-153 Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry

Tang, M.X.; Redemann, C.T.; Szoka, F.C.; *Bioconjugate Chemistry* **1996**, *7*, 703-714 *In vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers

Thierry, A.R.; Ditschilo, A.; *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20* (21), 5691-5698 Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity

Thomas, S.M.; Burke, J.; *Exp. Opin. Ther. Patents* **1997**, *7* (8), 813-819 Isis Pharmaceuticals: What is the sense in antisense?

Ti, G.S.; Gaffney, B.L.; Jones, R.A.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1316-1319 Transient protection: efficient one-flask syntheses of protected oligonucleosides

- Tomac, S.;** Sarkar, M.; Ratalainen, T.; Wittung, P.; Nielsen, P.E.; Norden, B.; Gräslund, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (24), 5544-5552 Ion effects on the stability and conformation of peptide nucleic acid complexes
- Toulmé, J.J.;** Le Tinévez, R.; Brossalina, E.; *Biochimie* **1996**, *78*, 663-673 Targeting RNA structures by antisense oligonucleotides
- Trujillo, J.I.;** Gopalan, A.S.; *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34* (46), 7355-7358 Facile esterification of sulfonic acids and carboxylic acids with triethylorthoacetate
- Tsukiyama-Kohara, K.;** Iizuka, N.; Kohara, M.; Nomoto, A.; *J. Virol.* **1992**, *66* (3), 1476-1483 Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA
- Uhlenbeck, O.C.;** *Nature* **1987**, *328*, 596-600 A small catalytic oligoribonucleotide
- Uhlmann, E.;** Engels, J.W.; *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (9), 1023-1026 Chemical 5'-phosphorylation of oligonucleotides valuable in automated synthesis
- Uhlmann, E.;** Peyman, A.; *Chem. Rev.* **1990**, *90* (4), 543-584 Antisense oligonucleotides: A new therapeutic principle
- Uhlmann, E.;** Ryte, A.; Peyman, A.; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 345-350 Studies on the mechanism of stabilization of partially phosphorothioated oligonucleotides against nucleolytic degradation
- Uhlmann, E.;** *Chemie in unserer Zeit* **1998a**, *3*, 150-160 Antisense-Oligonucleotide - ein universelles Therapieprinzip
- Uhlmann, E.;** Peyman, A.; Breipohl, G.; Will, D.W.; *Angew. Chem.* **1998b**, *110*, 2954-2983 PNAs: Synthetische Polyamidnucleinsäuren mit außergewöhnlichen Bindungseigenschaften
- Uhlmann, E.;** Peyman, A.; Ryte, A.; Schmidt, A.; Buddecke, E.; *Methods Enzymol.* **1999**, *313*, 268-284 Use of minimally modified antisense oligonucleotides for specific inhibition of gene expression
- van Doorn, L.-J.;** *Journal of Medical Virology* **1994**, *43*, 345-356 Review: Molecular biology of the hepatitis C virus

Vidalin, O.; Major, M.E.; Rayner, B.; Imbach, J.-L.; Trépo, C.; Inchauspé, G.; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1996**, *40* (10), 2337-2344 In vitro inhibition of hepatitis C virus gene expression by chemically modified antisense oligonucleotides

Vyazovkina, E.V.; Savchenko, E.V.; Lokhov, S.G.; Engels, J.W.; Wickstrom, E.; Lebedev, A.V.; *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (12), 2404-2409 Synthesis of specific diastereomers of a DNA methylphosphonate heptamer, d(CpCpApApApCpA), and stability of base pairing with the normal DNA octamer d(TpGpTpTpTpGpGpC)

Wakita, T.; Wands, J.R.; *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (19), 14205-14210 Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxynucleotides

Wakita, T.; Moradpour, D.; Tokushihge, K.; Wands, J.R.; *Journal of Medical Virology* **1999**, *57*, 217-222 Antiviral effects of antisense RNA on hepatitis C virus RNA translation and expression

Walder, R.Y.; Walder, J.A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5011-5015 Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides

Walker, S.; Sofia, M.J.; Kakarla, R.; Kogan, N.A.; Wierichs, L.; Longley, C.B.; Bruker, K.; Axelrod, H.R.; Midha, S.; Babu, S.; Kahne, D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1585-1590 Cationic facial amphiphiles: a promising class of transfection agents

Wang, A.H.-J.; Quigley, G.J.; Kolpak, F.J.; Crawford, J.L.; van Boom, J.H.; van der Marel, G.; Rich, A.; *Nature* **1979**, *262*, 680-686 Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution

Wang, C.; Sarnow, P.; Siddiqui, A.; *J. Virol.* **1993**, *67* (6), 3338-3344 Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism

Wang, C.; Sarnow, P.; Siddiqui, A.; *J. Virol.* **1994**, *68* (11), 7301-7307 A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA

Wang, C.; Le S.-Y.; Ali, N.; Siddiqui, A.; *RNA* **1995a**, *1*, 526-537 An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region

- Wang, C.;** Siddiqui, A.; *Curr. Top. Microbiol.* **1995b**, *203*, 99-115 Structure and function of the hepatitis C virus internal ribosome entry site
- Watson, J.D.;** Crick, F.H.C.; *Nature* **1953a**, *171*, 737-738 Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid
- Watson, J.D.;** Crick, F.H.C.; *Nature* **1953b**, *171*, 964-967 Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid
- Weber, M.;** *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **2000**, *48*, 18-23 Neue Techniken zum Gentransfer in Eukaryontenzellen
- Weintraub, H.M.;** *Spektrum der Wiss.* März **1990**, 70-77 Anti-Sense-DNA und -RNA: komplementäre Codes mit Sinn
- Wess, G.;** Kramer, W.; Bartmann, W.; Enhsen, A.; Glombik, H.; Müllner, S.; Bock, K.; Dries, A.; Kleine, H.; Schmitt, W.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33* (2), 195-198 Modified bile acids: preparation of 7 α ,12 α -Dihydroxy-3 β - and 7 α ,12 α -Dihydroxy-3 α -(2-hydroxyethoxy)-5 β -cholanic acid and their biological activity
- Wess, G.;** Kramer, W.; Enhsen, A.; Glombik, H.; Baringhaus, K.-H.; Bock, K.; Kleine, H.; Schmitt, W.; *Tetrahedron Lett.* **1993a**, *34* (5), 817-818 Preparation of 3 α - and 3 β -(ω -Aminoalkoxy)-7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholanoic acid esters: versatile shuttles for drug targeting
- Wess, G.;** Kramer, W.; Schubert, G.; Enhsen, A.; Baringhaus, K.-H.; Glombik, H.; Müllner, S.; Bock, K.; Kleine, H.; John, M.; Neckermann, G.; Hoffmann, A.; *Tetrahedron Lett.* **1993b**, *34* (5), 819-822 Synthesis of bile acid-drug conjugates: Potential drug-shuttles for liver specific targeting
- Wess, G.;** Enhsen, A.; Kramer, W.; *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1995**, *43* (10), 1047-1055 Gallensäuren: Wiederentdeckt
- Widmer, U.;** *Synthesis* **1983**, *43* (10), 135-136 A convenient synthesis of *t*-butyl esters
- Wieland, H.;** Kapitel, W.; *Z. physiol. Chem.* **1932**, *212*, 269-277 Untersuchungen über die Konstitution der Gallensäuren: Über die Acetylierung der Cholsäure und über einige Umwandlungen ihrer acetylierten Derivate

Wollborn, U.; Leibfritz, D.; *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 1237-1239 Untersuchung des stereochemischen Einflusses von Substituenten in 3-Stellung von Cholsäurederivaten mit Hilfe von 1D- und 2D-NMR-Methoden

Wyman, T.B.; Nicol, F.; Zelphati, O.; Scaria, P.V.; Plank, C.; Szoka, F.C.; *Biochemistry* **1997**, *36*, 3008-3017 Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes membranes

Yamada, N.; Tanihara, K.; Takada, A.; Yorihuzi, T.; Tsutsumi, M.; Shimomura, H.; Tsuji, T.; Date, T.; *Virology* **1996**, *223*, 255-261 Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome

Zamecnik, P.C.; Stephenson, M.L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75* (1), 280-284 Inhibition of Rous sarcoma virus RNA replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide

Zeuzem, S.; Roth, W.K.; Herrmann, G.; *Zeitung für Gastroenterology* **1995**, *33*, 117-132 Virushepatitis C

Zhang, H.; Hanecak, R.; Brown-Driver, V.; Azad, R.; Conklin, B.; Fox, M.C.; Anderson, K.P.; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, *43* (2), 347-353 Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant

Zhao, Q.; Matson, S.; Herrera, C.J.; Fisher, E.; Yu, H.; Krieg, A.M.; *Antisense Res. Dev.* **1993**, *3*, 53-66 Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides

Zobel, H.P.; Kreuter, J.; Werner, D.; Noe, C.R.; Kumel, G.; Zimmer, A.; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 483-493 Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotides

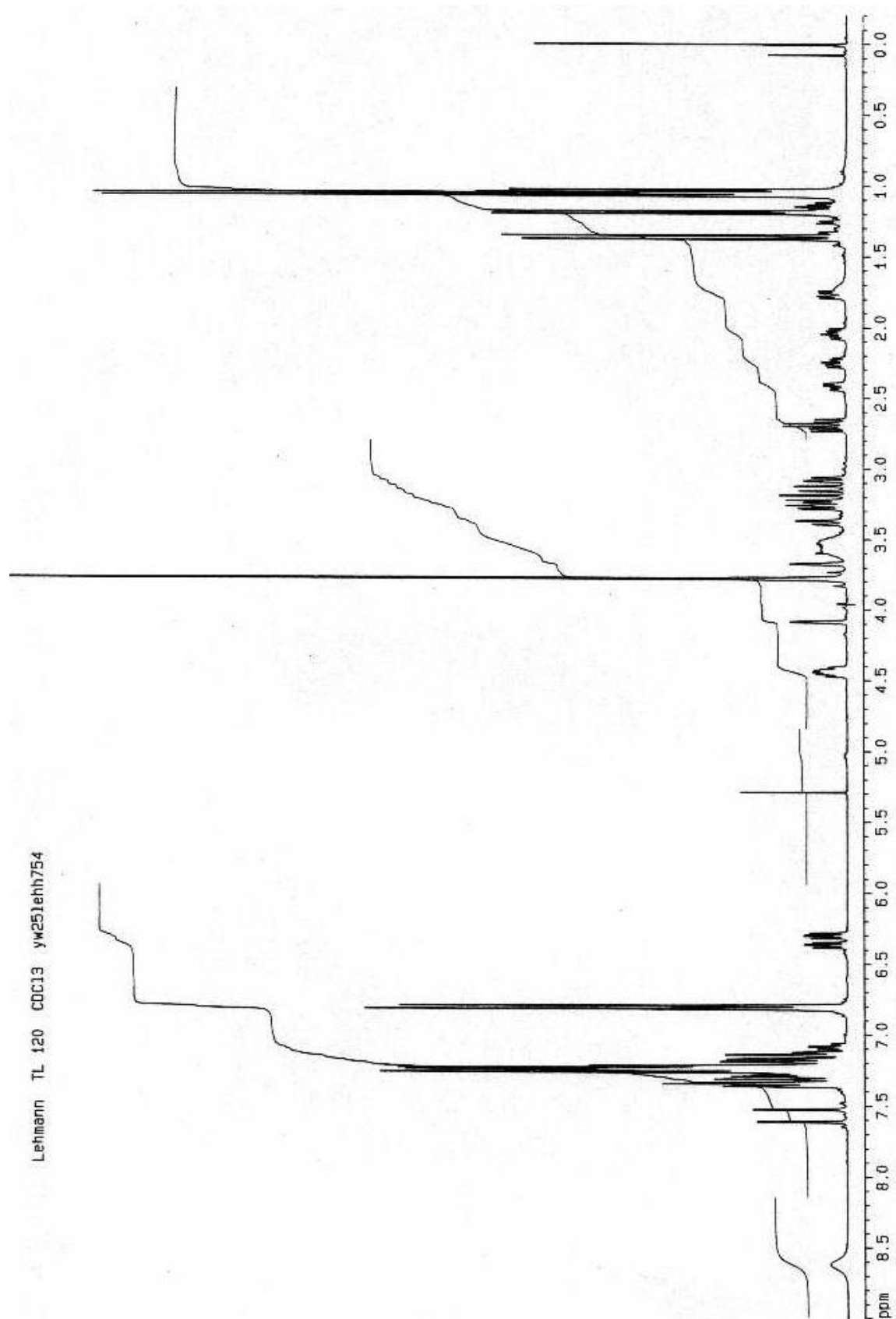
14. Anhang

14.1 Abbildungen ausgewählter NMR- und Massenspektren

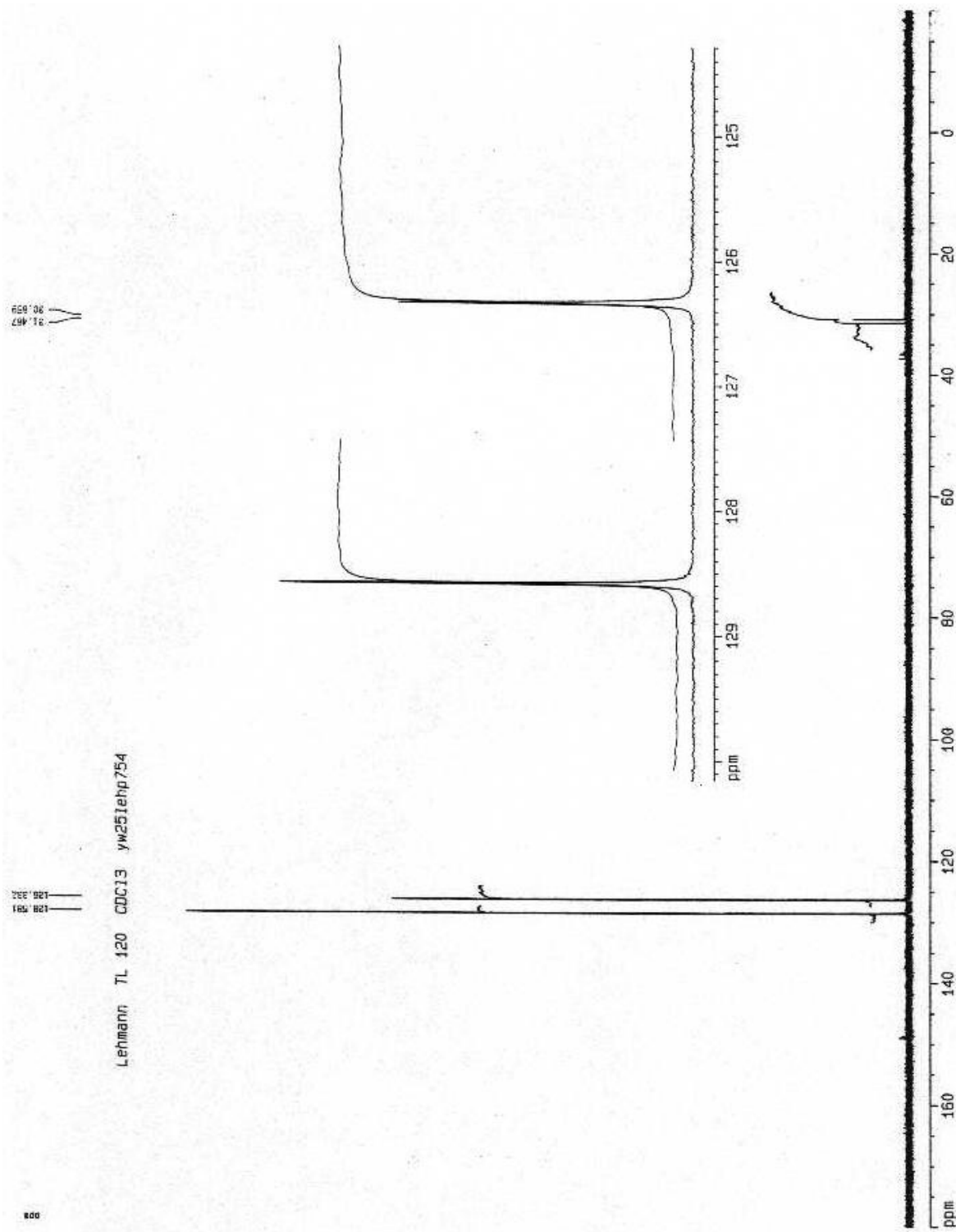
- (1) ^1H -NMR-Spektrum von 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **49a/b**
- (2) ^{31}P -NMR-Spektrum von 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **49a/b**
- (3) ^1H -NMR-Spektrum von *N*⁶-Benzoyl-3'-*O*-[(benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenosin **50a/b**
- (4) ^{31}P -NMR-Spektrum von *N*⁶-Benzoyl-3'-*O*-[(benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenosin **50a/b**
- (5) ^1H -NMR-Spektrum von 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **51a/b**
- (6) ^{31}P -NMR-Spektrum von 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **51a/b**
- (7) ^1H -NMR-Spektrum von 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin **52a/b**
- (8) ^{31}P -NMR-Spektrum von 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin **52a/b**
- (9) ^1H -NMR-Spektrum von ^{31}P -Hochfeld-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin benzylphosphonat **54a**
- (10) ^{31}P -NMR-Spektrum von ^{31}P -Hochfeld-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin benzylphosphonat **54a**
- (11) ^{31}P -NMR-Spektrum von ^{31}P -Tieffeld-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidylyl-(3'→5')-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin benzylphosphonat **54b**

-
- (12) ESI-Massenspektrum von fast-d(CGCp_{Bn}GCG) **60a**
- (13) ESI-Massenspektrum von slow-d(CGCp_{Bn}GCG) **60b**
- (14) ¹H-NMR-Spektrum von 3α-(2-Hydroxyethoxy)-7α,12α-dihydroxycholsäureallylester **21**
- (15) ¹H,¹H-COSY-Spektrum von 3α-(2-Hydroxyethoxy)-7α,12α-dihydroxycholsäureallylester **21**
- (16) HSQC-Spektrum von 3α-(2-Hydroxyethoxy)-7α,12α-dihydroxycholsäureallylester **21**
- (17) ¹H-NMR-Spektrum von 3α-(2-Hydroxyethoxy)-7α,12α-dihydroxytaurocholsäureethylester **26**
- (18) ³¹P-NMR-Spektrum von 3α-(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy-7α,12α-dihydroxycholsäureallylester **22a/b**
- (19) ³¹P-NMR-Spektrum von 3α-(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy-7α,12α-diacetyltaurocholsäureethylester **27a/b**
- (20) ³¹P-NMR-Spektrum von 3β-[(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy]-cholesterol **32a/b**
- (21) ESI-Massenspektrum von 5′ - Y - T°G°C°TGCACGGTCTA°C°G°A - 3′ **tS-13KY**
(Molpeak)
- (22) ESI-Massenspektrum von 5′ - Y - T°G°C°TGCACGGTCTA°C°G°A - 3′ **tS-13KY**
(mehrfach geladene Oligonukleotide)
- (23) ³¹P-NMR-Spektrum von (Rp/Sp)-5′-*O*-(4,4′-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-(3′→5′)-3′-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin phosphorfluoridit **70a/b**
- (24) ³¹P-NMR-Spektrum von (Rp/Sp)-*N*⁴-Benzoyl-5′-*O*-(4,4′-dimethoxytriphenylmethyl)-2′-desoxycytidyl-(3′→5′)-*N*²-benzoyl-3′-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2′-desoxyguanosin phosphorfluoridit **71a/b**

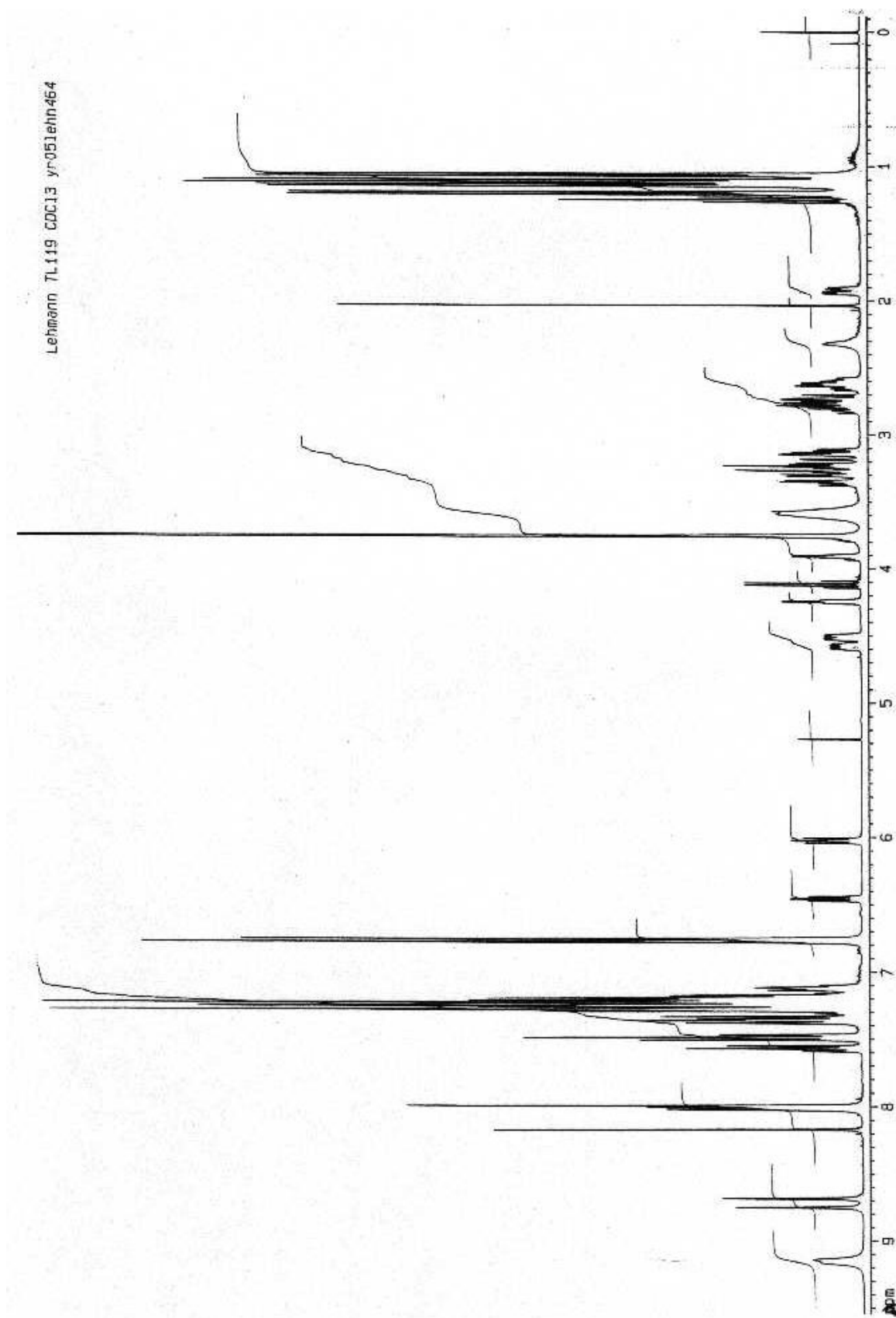
- (1) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **49a/b**



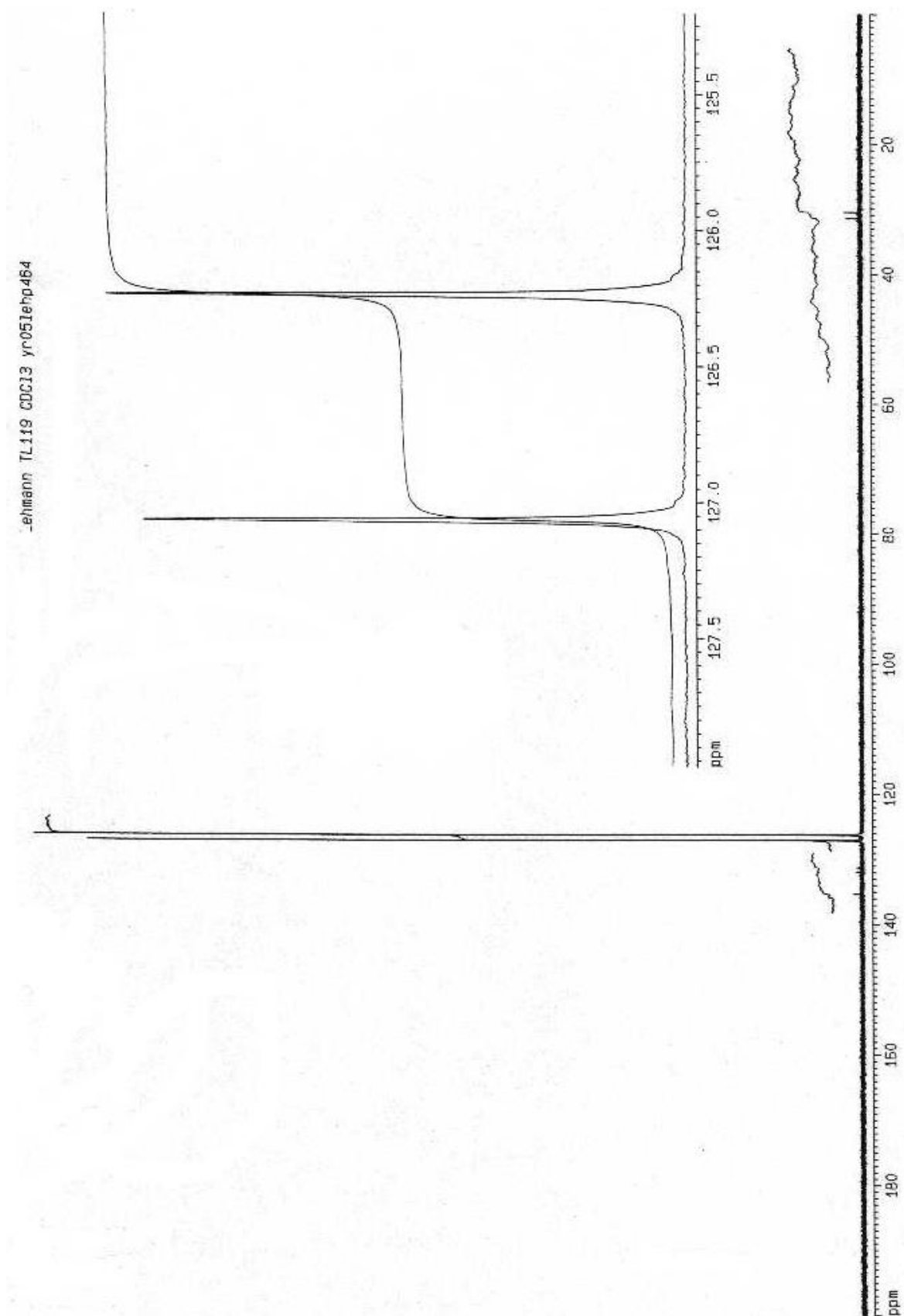
- (2) ^{31}P -NMR-Spektrum von 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-
(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **49a/b**



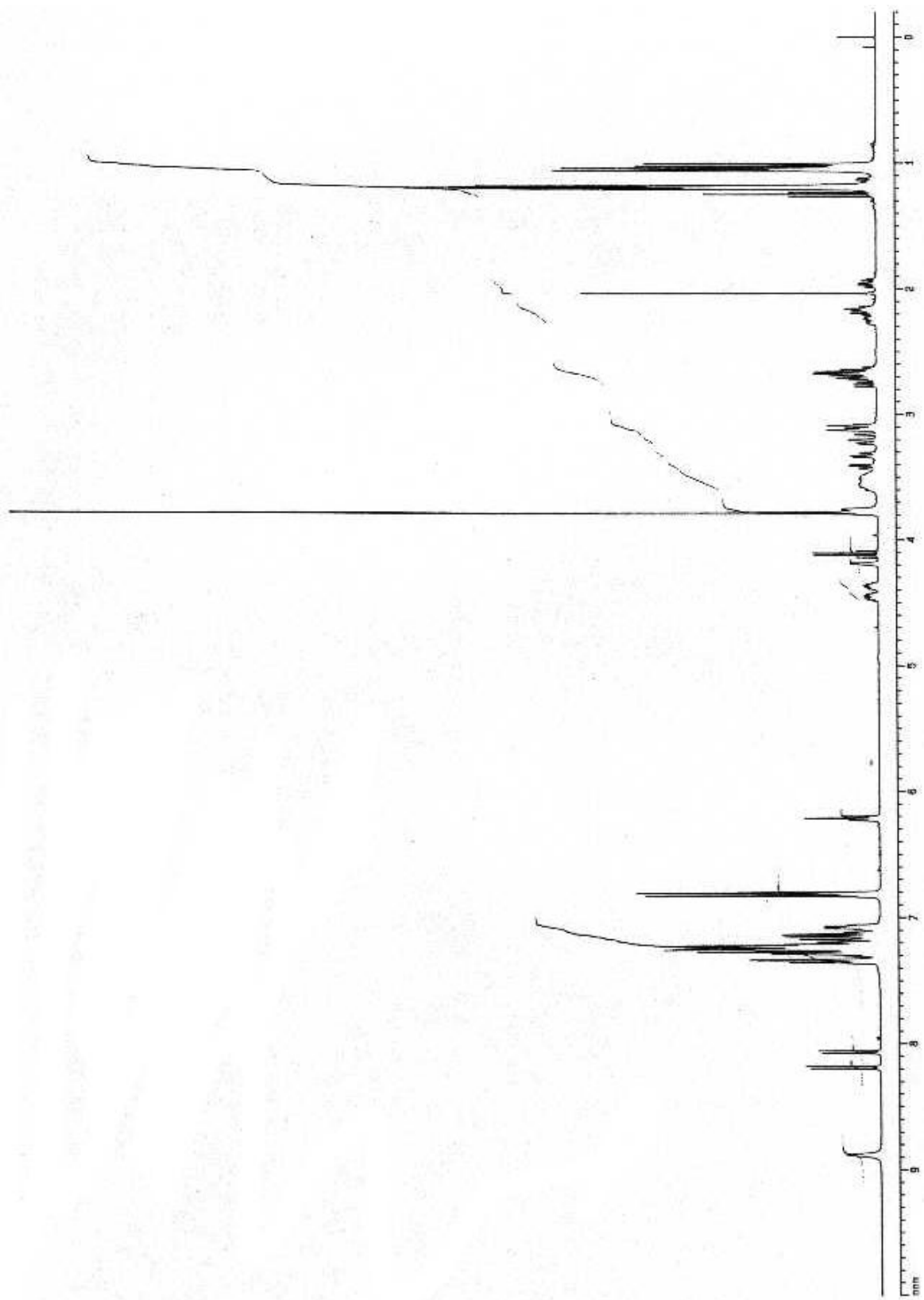
- (3) ^1H -NMR-Spektrum von N^6 -Benzoyl-3'- O -[(benzyl- N,N -diisopropylamino)phosphin]-5'- O -(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenosin **50a/b**



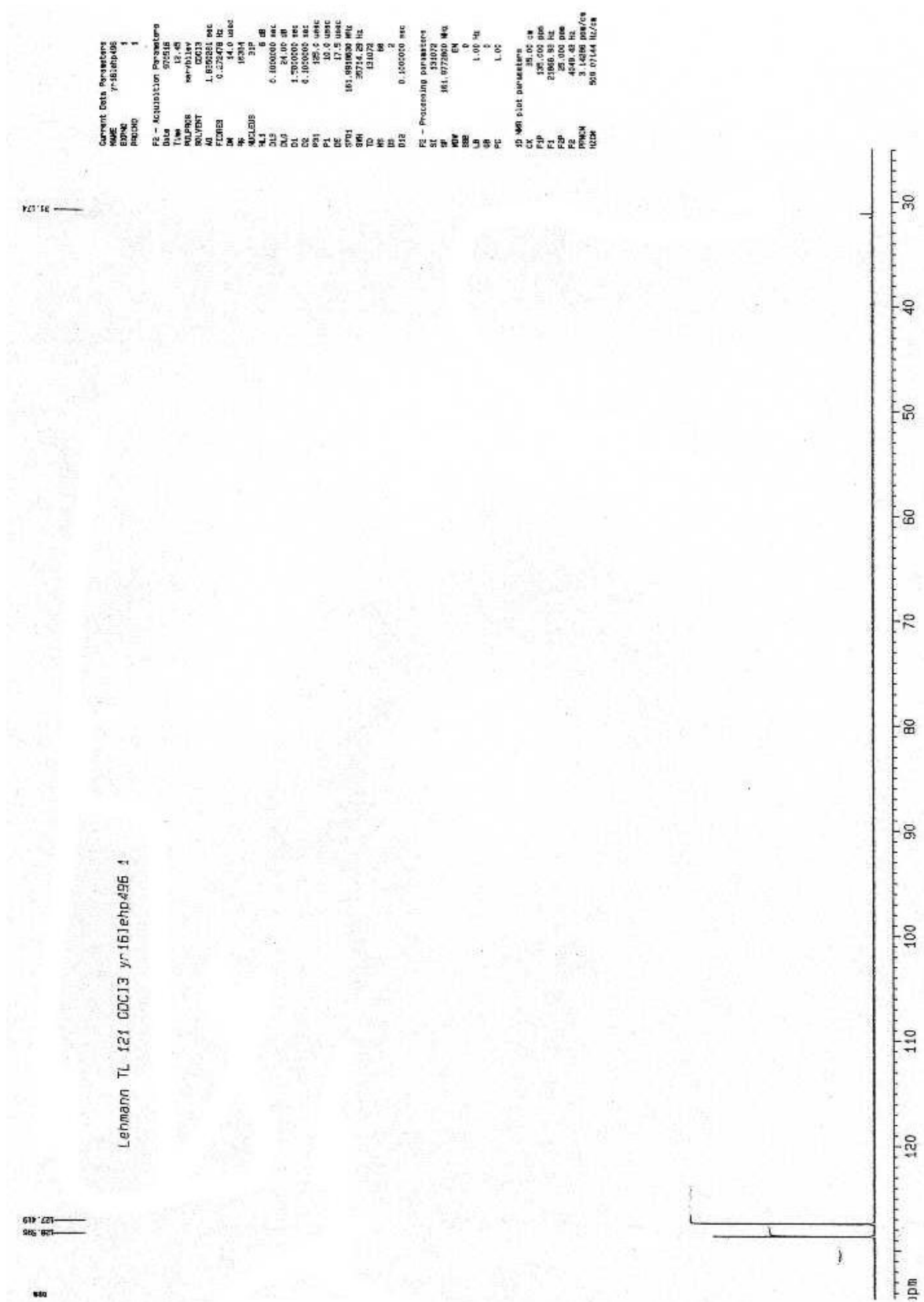
- (4) ^{31}P -NMR-Spektrum von N^6 -Benzoyl-3'- O -[(benzyl- N,N -diisopropylamino)-phosphin]-5'- O -(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenosin **50a/b**



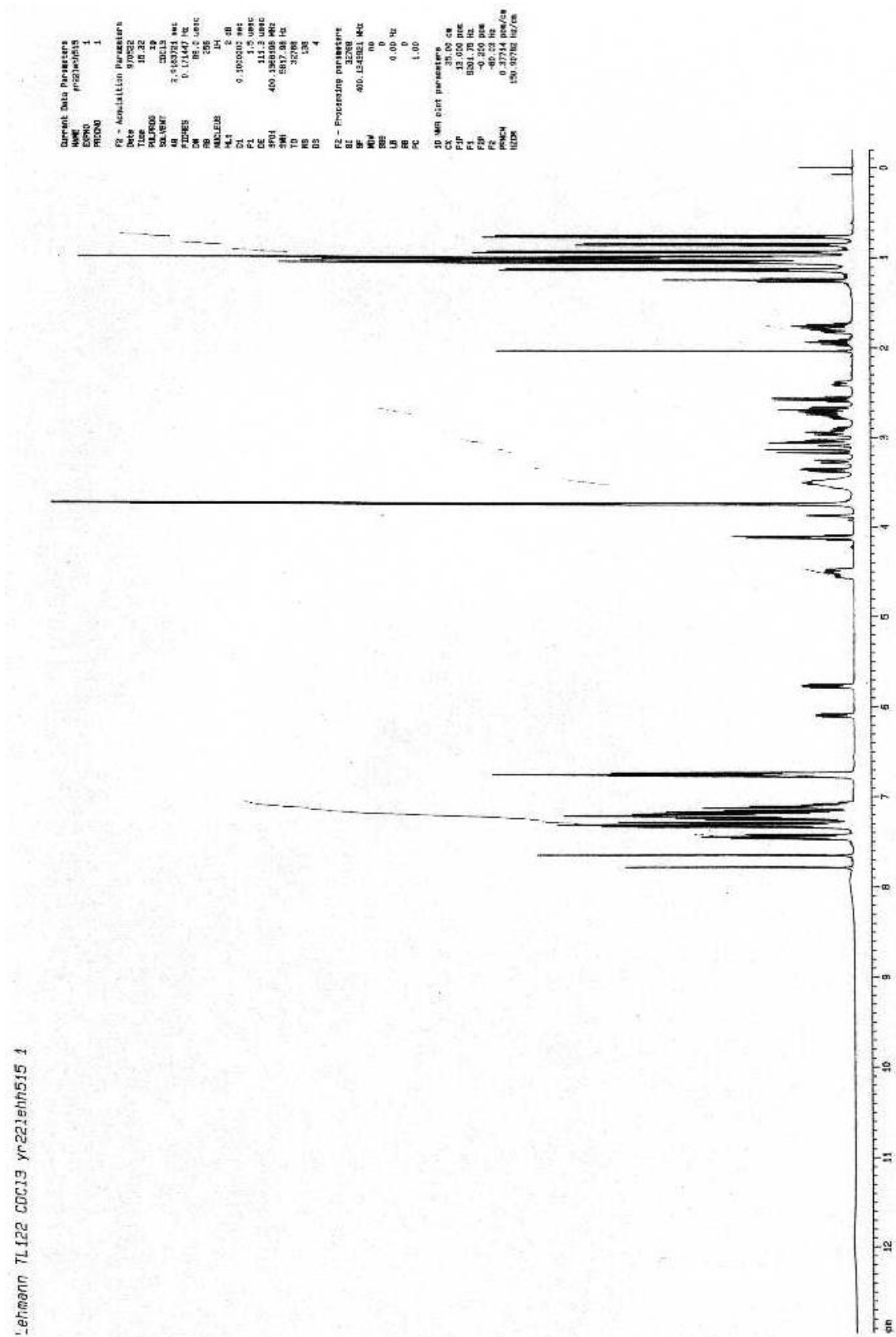
- (5) ^1H -NMR-Spektrum von 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-
(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)- *N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **51a/b**



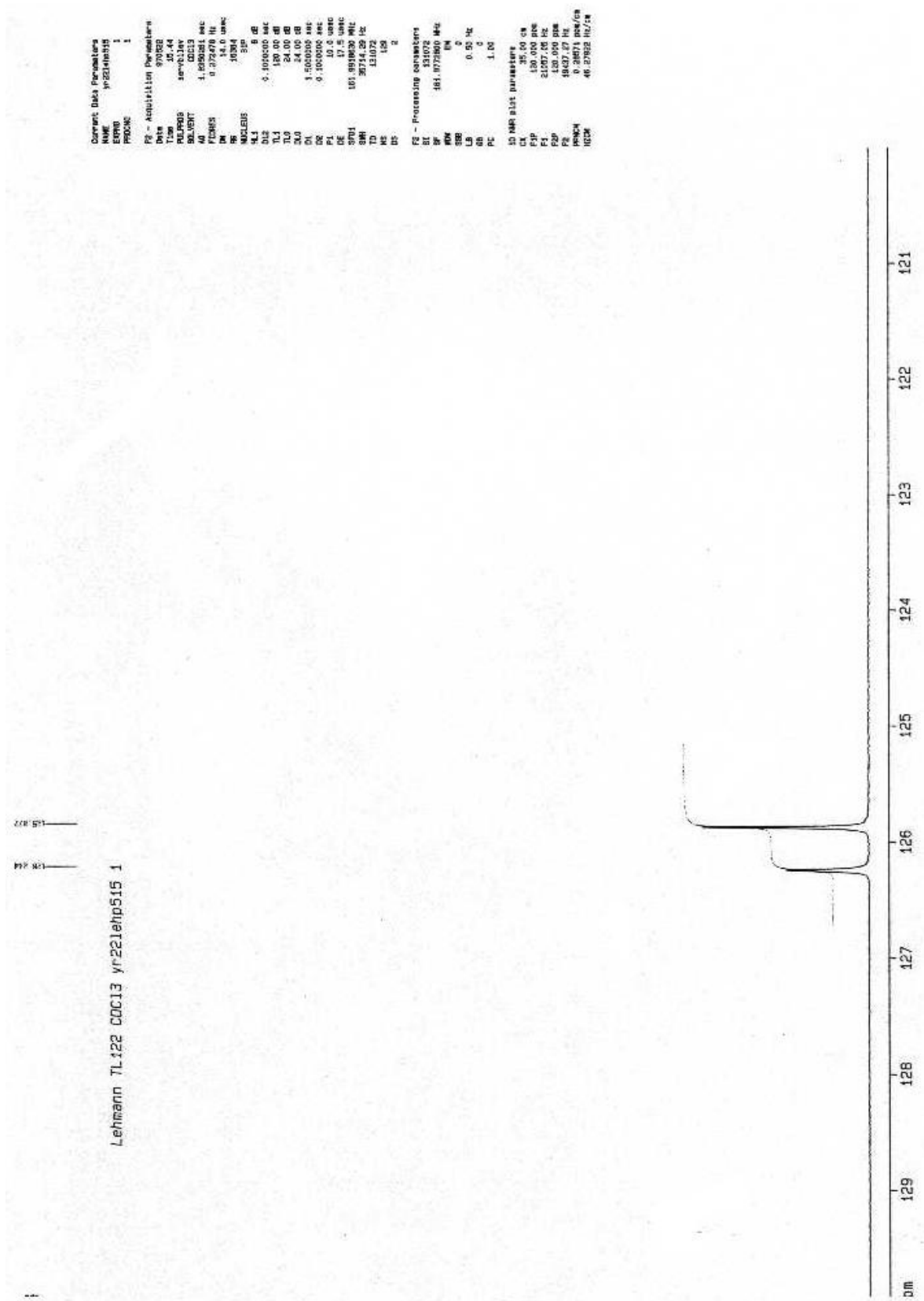
- (6) ^{31}P -NMR-Spektrum von 3'-O-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)- *N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **51a/b**



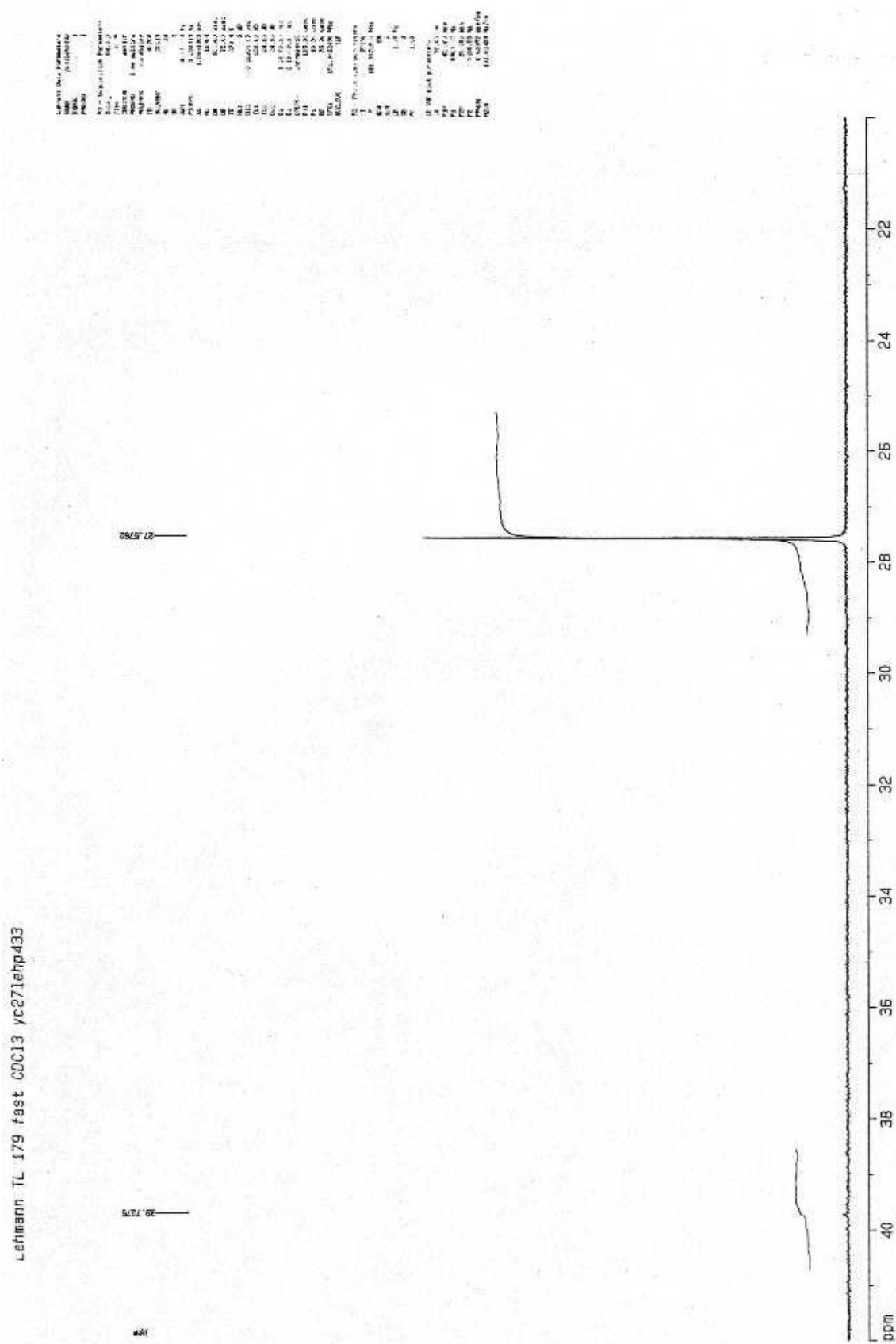
- (7) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 3'-*O*-[(Benzyl-*N,N*-diisopropylamino)-phosphin]-5'-*O*-
(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin **52a/b**



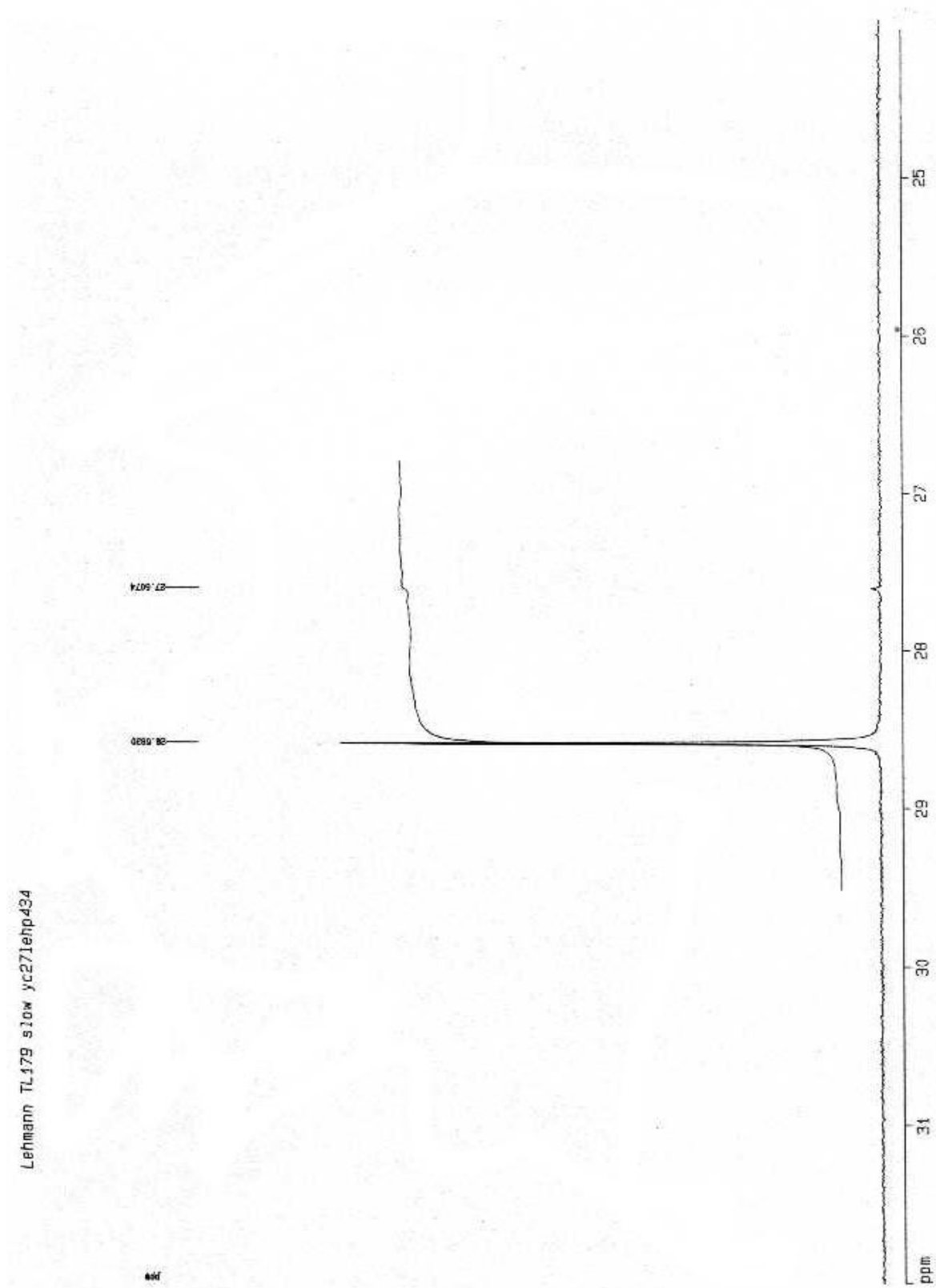
- (8) ^{31}P -NMR-Spektrum von 3'-O-[(Benzyl-N,N-diisopropylamino)-phosphin]-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-N²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin **52a/b**

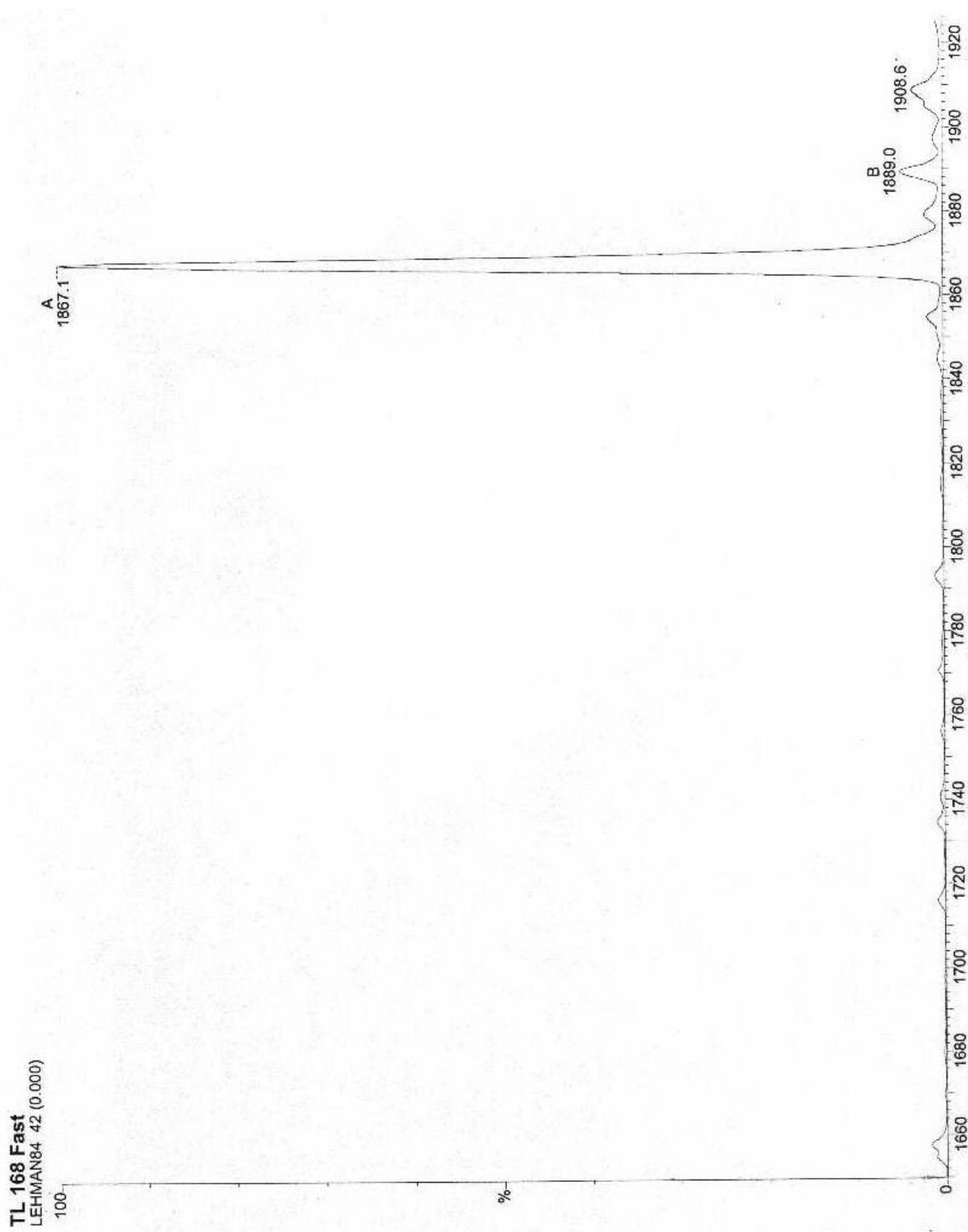


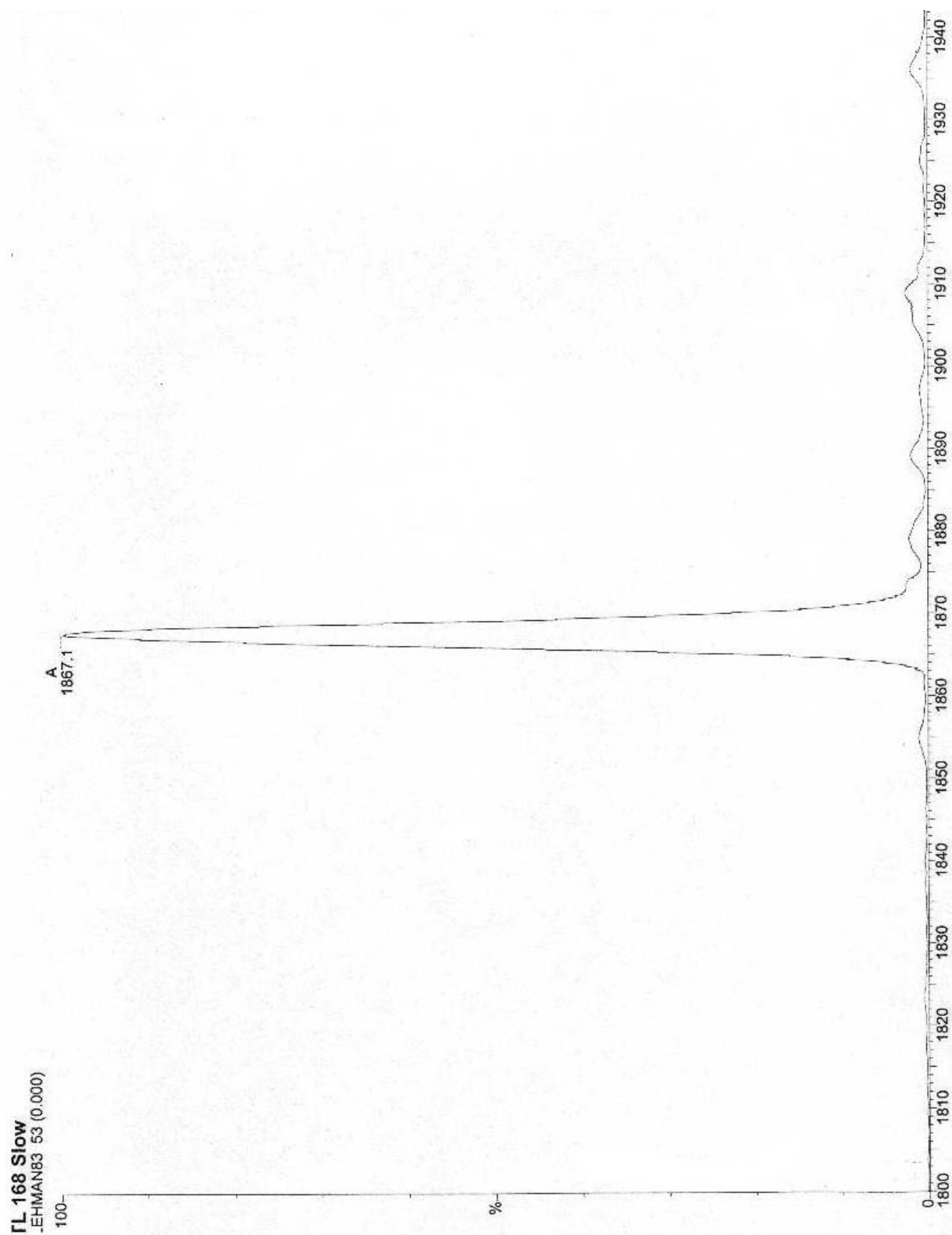
- (10) ^{31}P -NMR-Spektrum von ^{31}P -Hochfeld-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-(3'→5')-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin benzylphosphonat **54a**



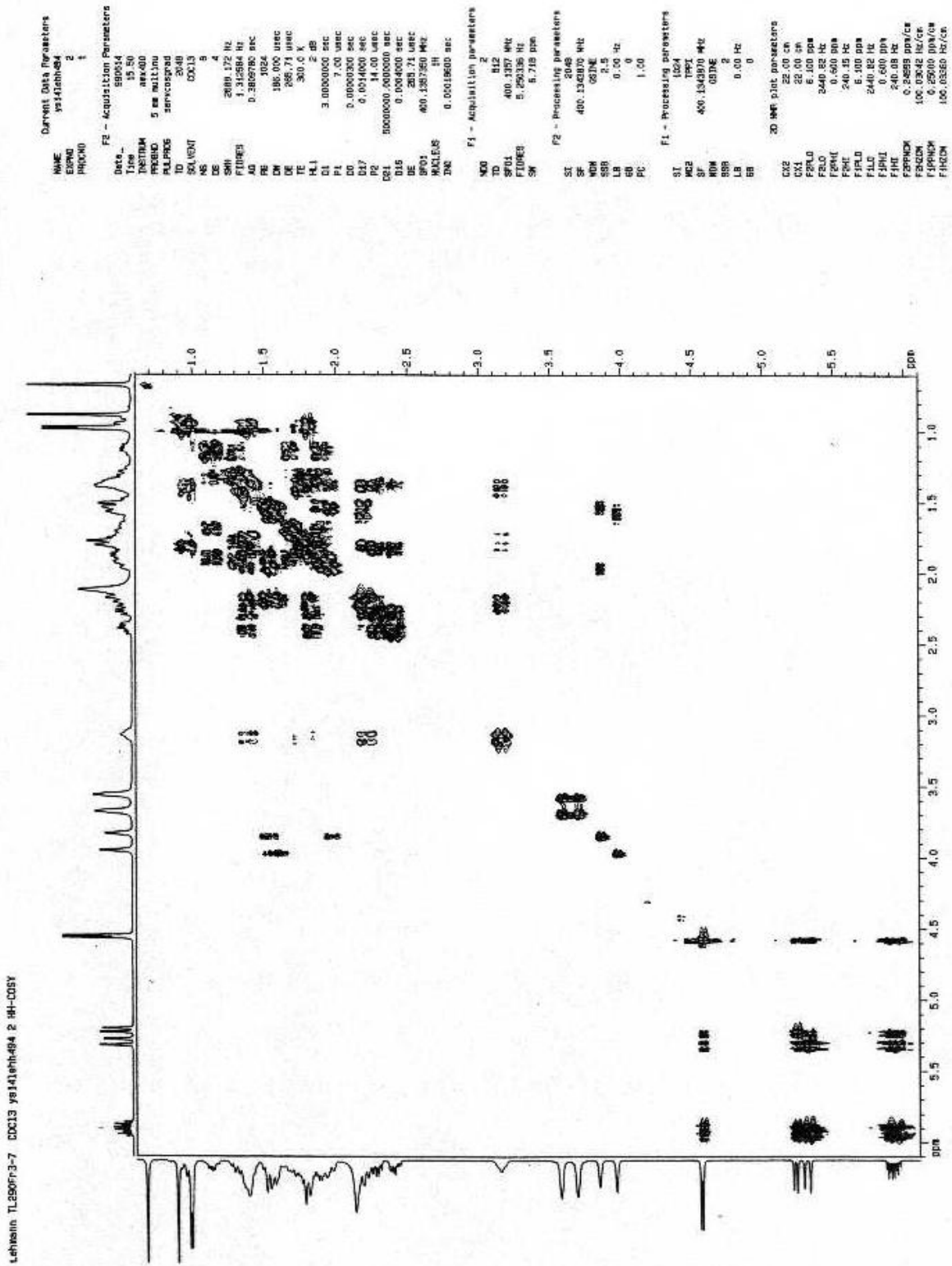
- (11) ^{31}P -NMR-Spektrum von ^{31}P -Tiefeld-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-(3'→5')-3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin benzylphosphonat **54b**



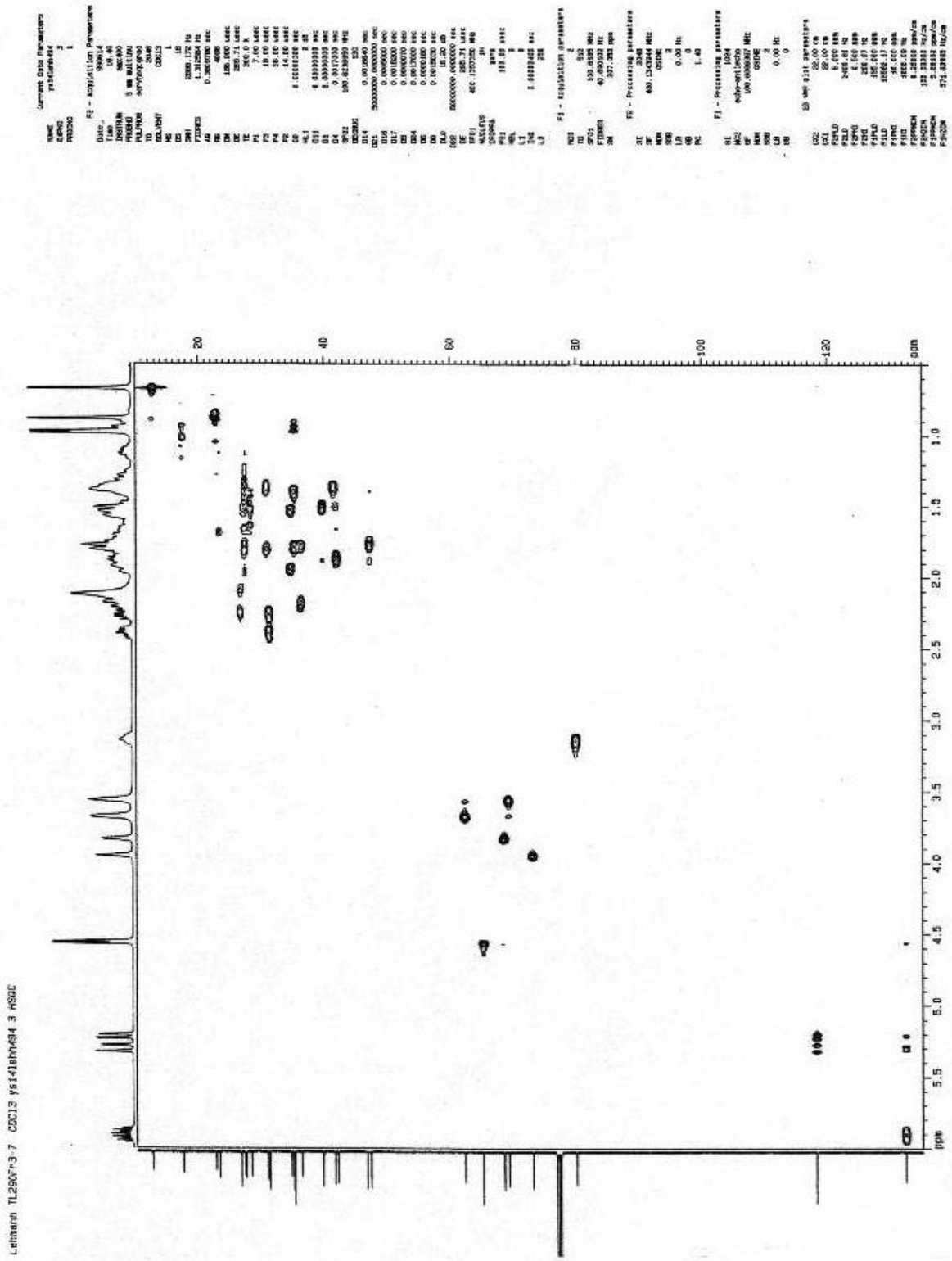
(12) ESI-Massenspektrum von fast-d(CGCp_{Bn}GCG) **60a**

(13) ESI-Massenspektrum von slow-d(CGCp_{Bn}GCG) **60b**

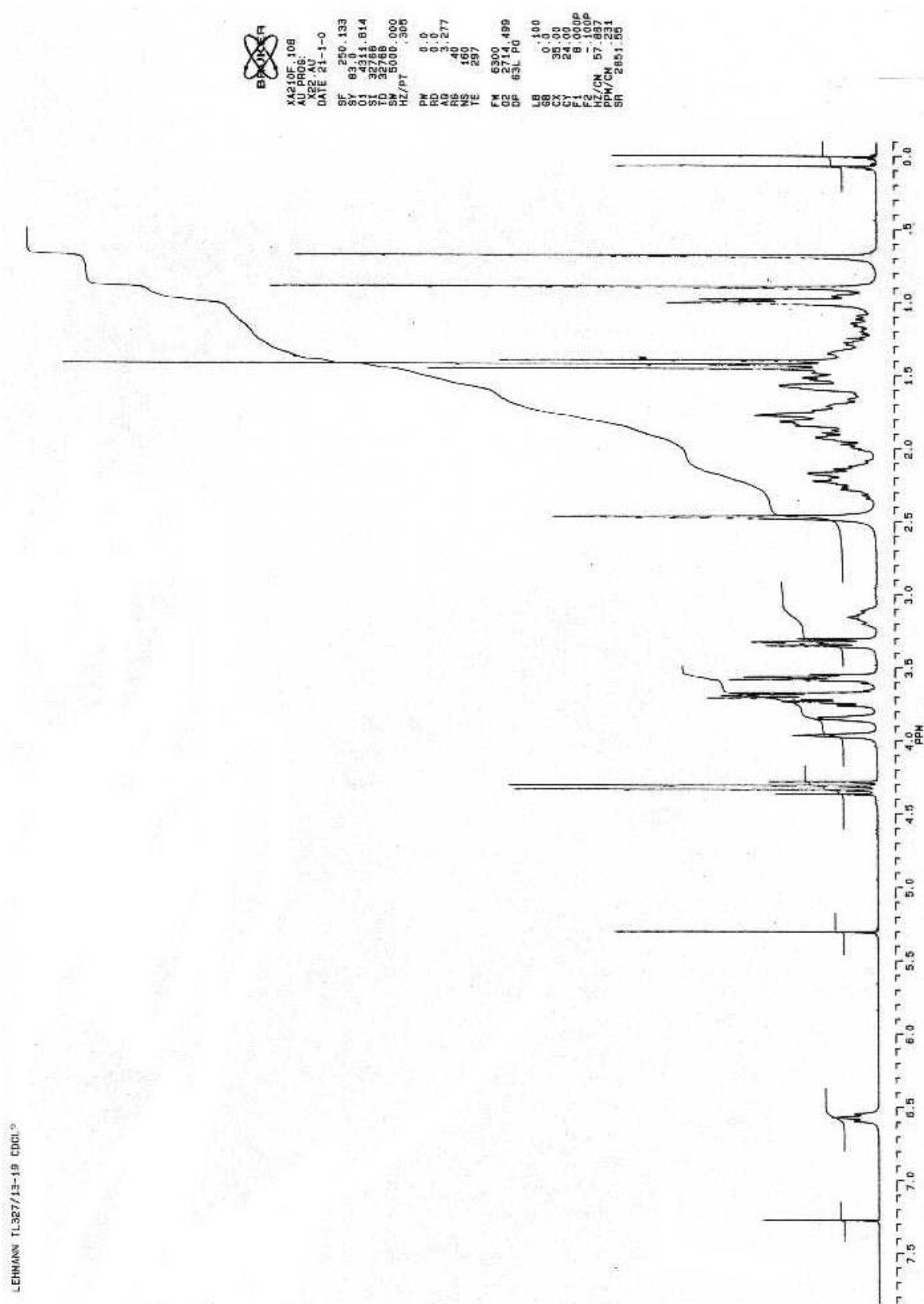
(15) $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von 3α -(2-Hydroxyethoxy)- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxycholsäureallylester 21



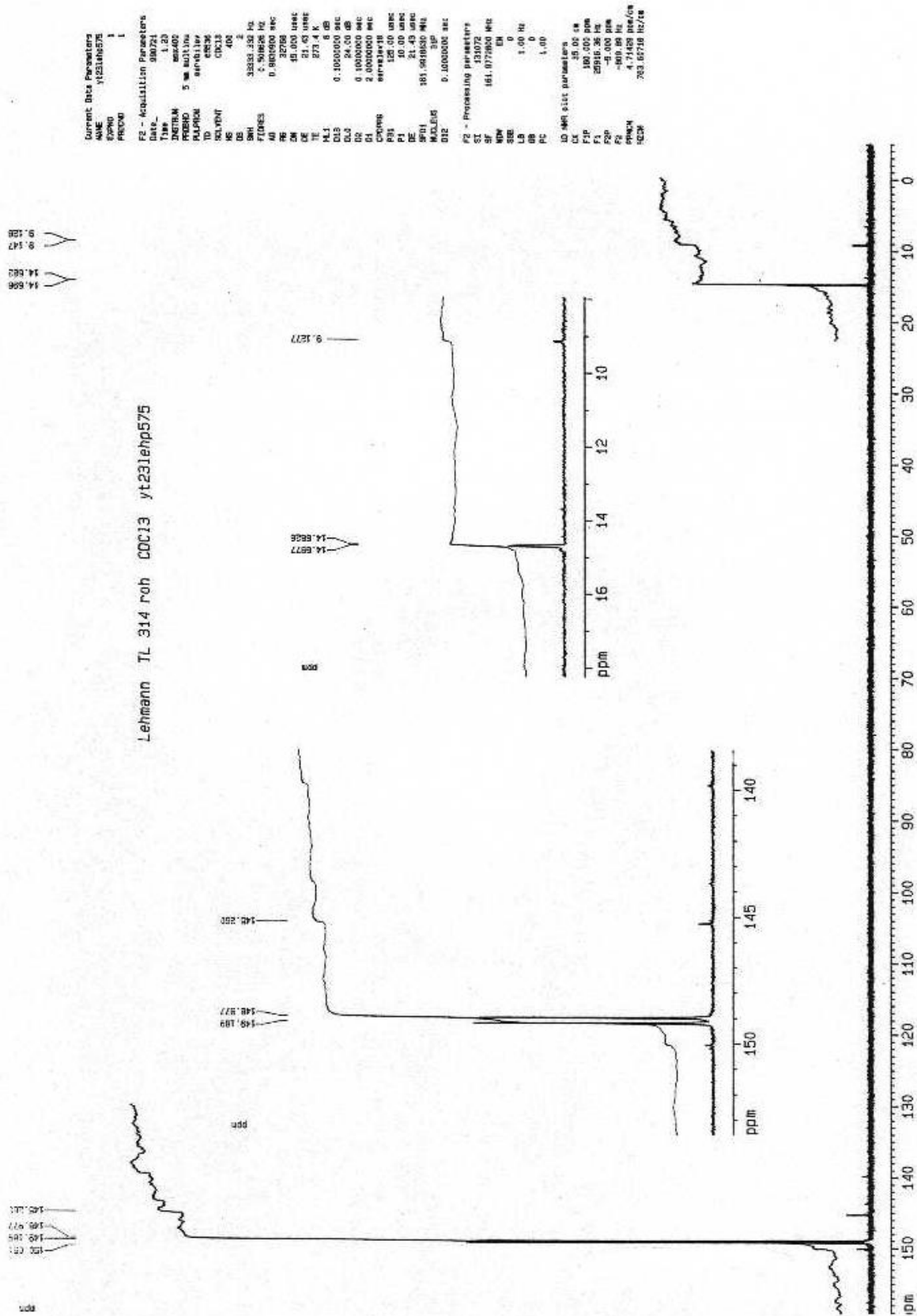
(16) HSQC-Spektrum von 3 α -(2-Hydroxyethoxy)-7 α ,12 α -dihydroxycholsäure-allylester **21**



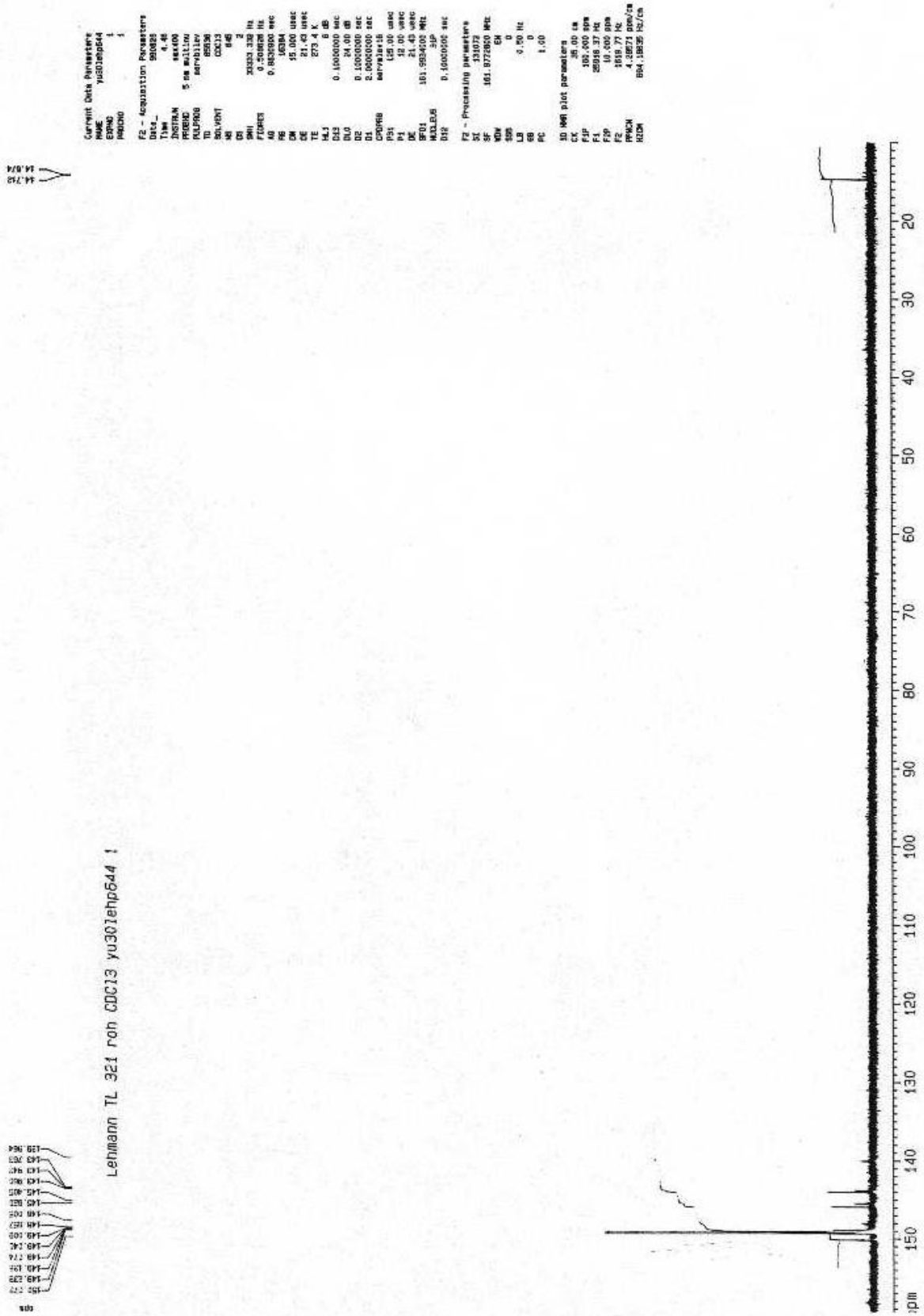
(17) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 3α -(2-Hydroxyethoxy)- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxytaurocholsäureethylester **26**



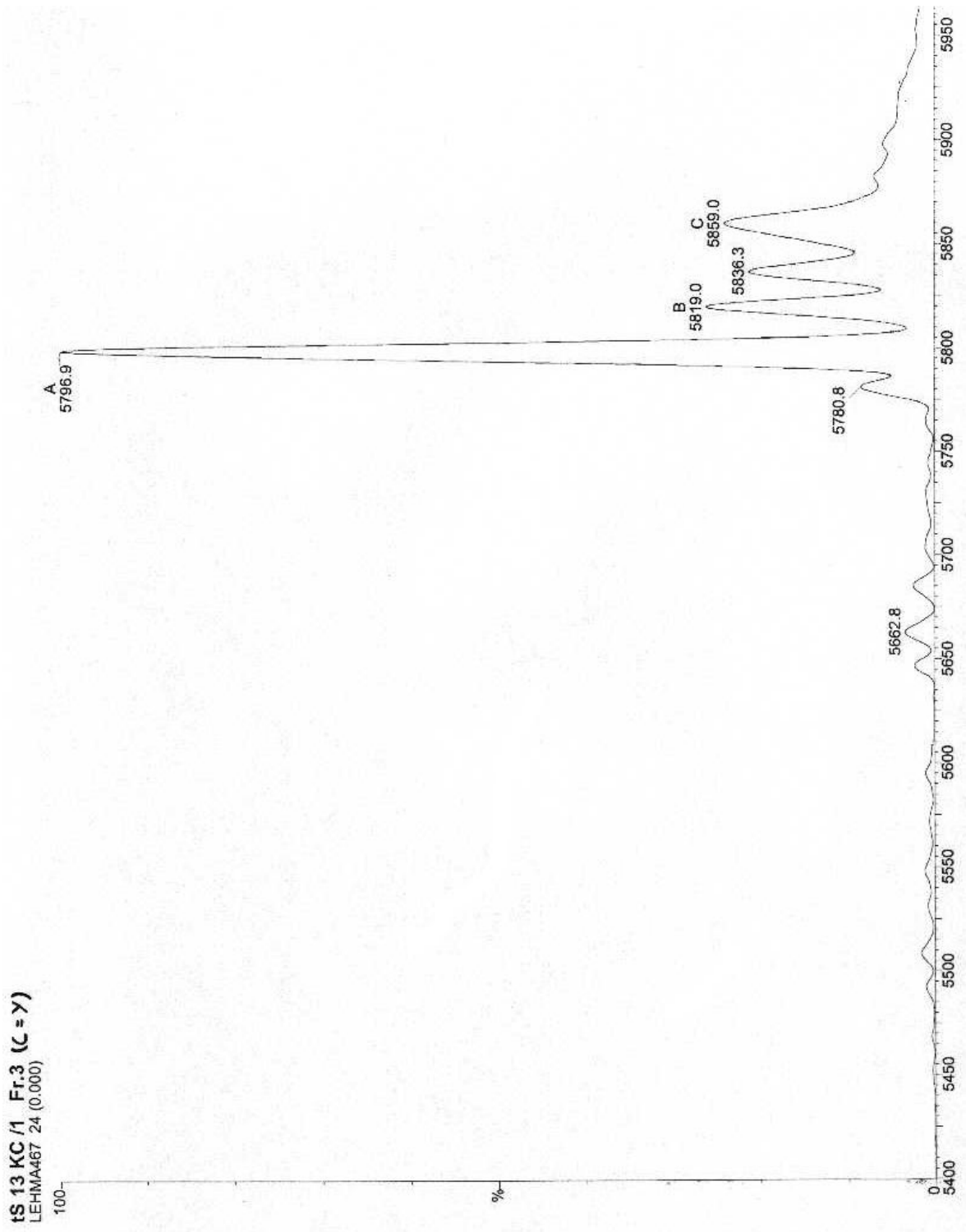
(18) ^{31}P -NMR-Spektrum von 3α -(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxycholsäureallylester **22a/b**



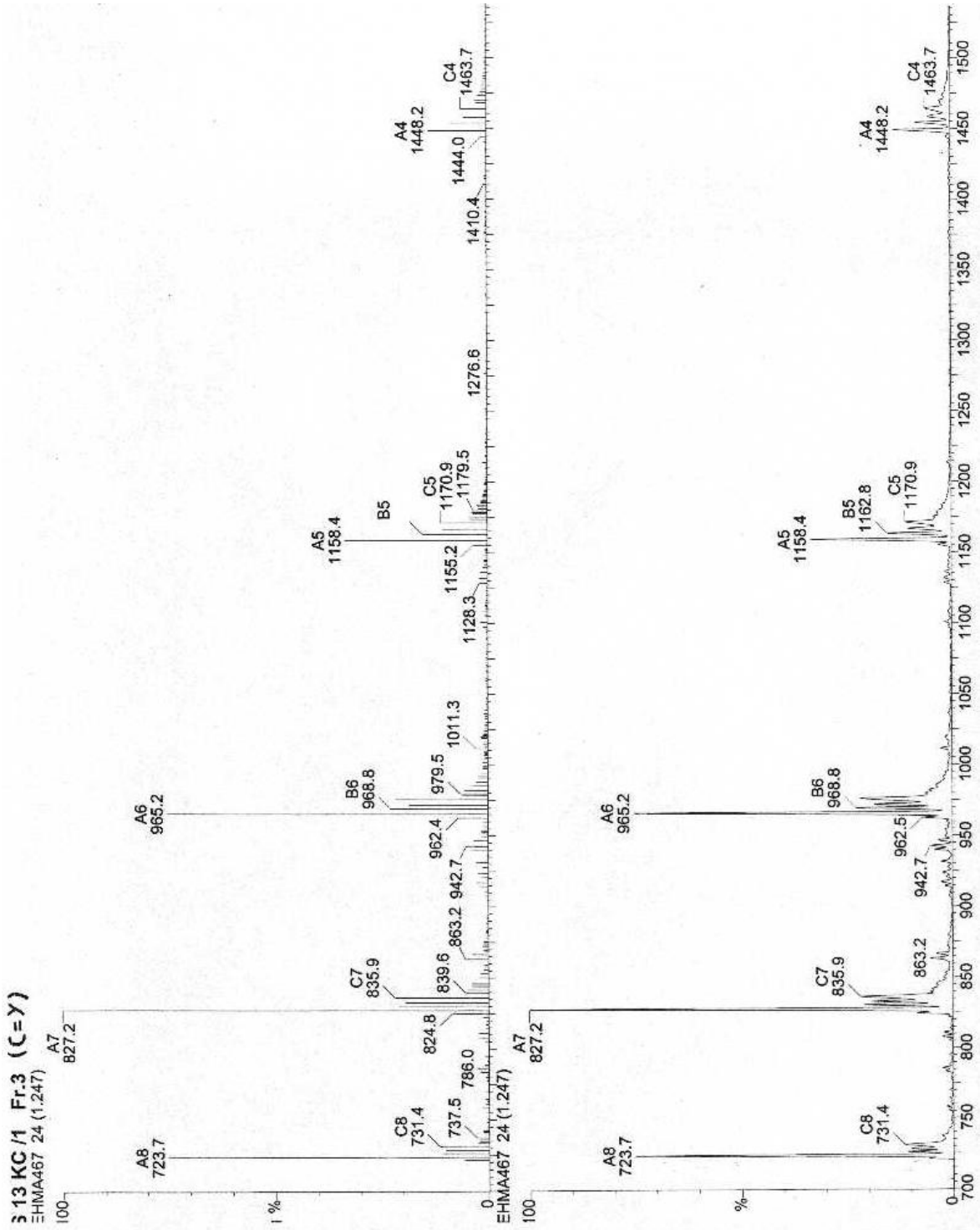
(19) ^{31}P -NMR-Spektrum von 3α -(2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylamino-phosphin)-ethoxy- $7\alpha,12\alpha$ -diacetyltaurocholsäureethylester **27a/b**



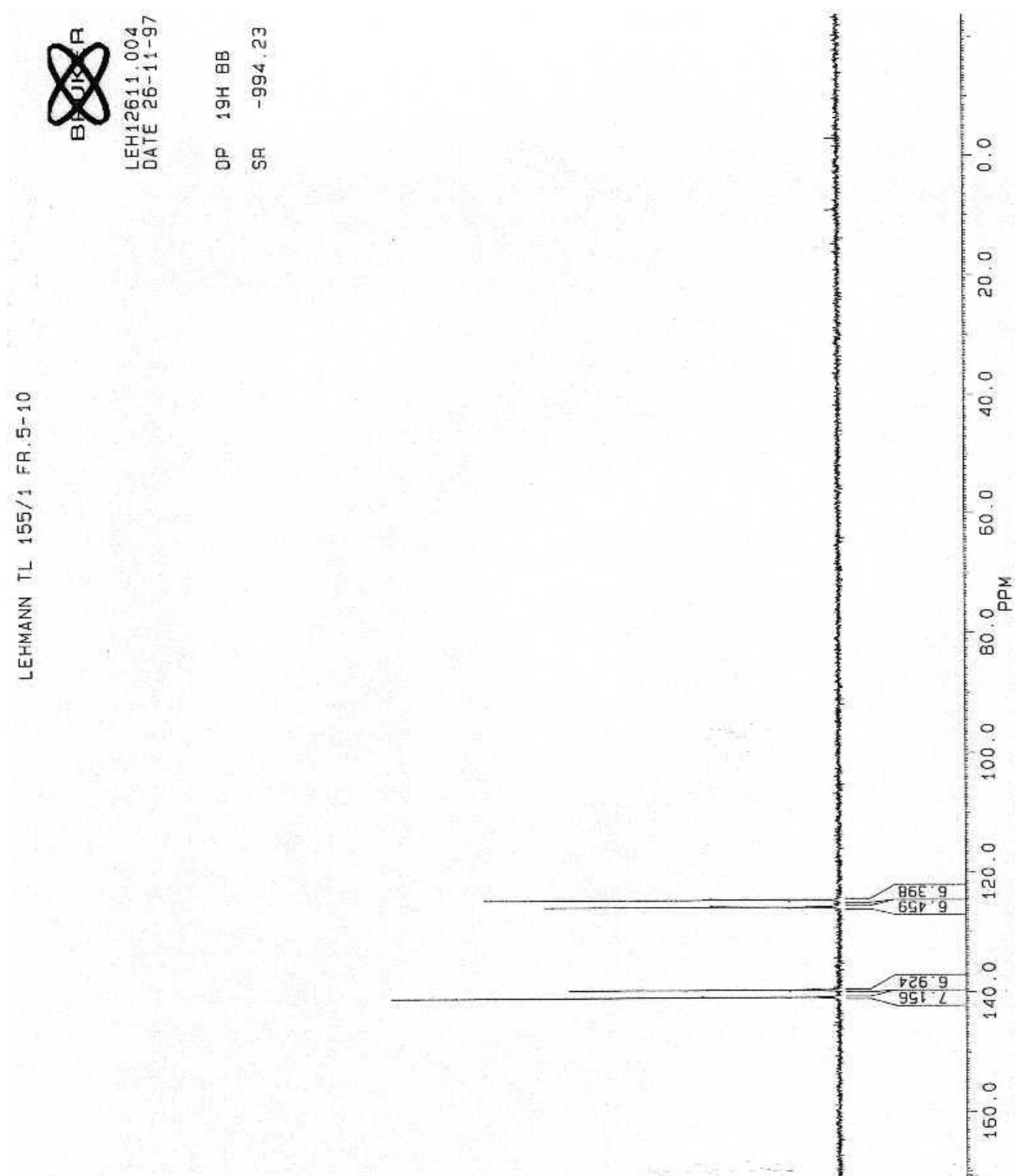
(21) ESI-Massenspektrum von 5' - Y - T°G°C°TGCACGGTCTA°C°G°A - 3' tS-13KY
(Molpeak)



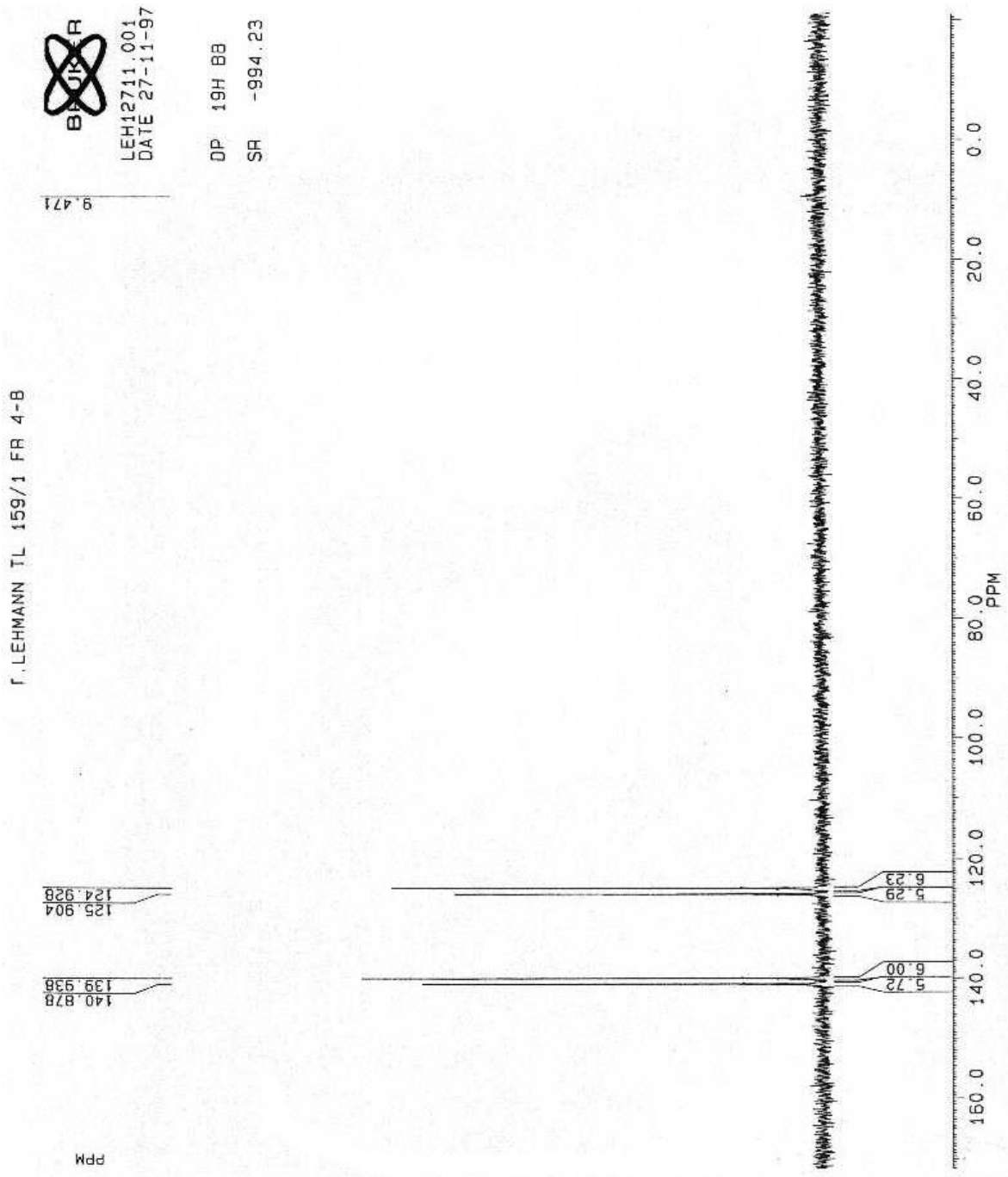
(22) ESI-Massenspektrum von 5' - Y - T°G°C°TGCACGGTCTA°C°G°A - 3' tS-13KY
 (mehrfach geladene Oligonukleotide)



- (23) ^{31}P -NMR-Spektrum von (Rp/Sp)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-(3'→5')-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin phosphorfluoridit **70a/b**



- (24) ^{31}P -NMR-Spektrum von (Rp/Sp)- N^4 -Benzoyl-5'- O -(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxycytidyl-(3'→5')- N^2 -benzoyl-3'- O -(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin phosphorfluoridit **71a/b**



14.2 Abkürzungen und Symbole

α	Bruchteil der Oligonukleotide im geordneten Zustand
A	Adenin, Adenosin
A ^{Bz}	N ⁶ -Benzoyl-adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACG	Acycloguanosin
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxydisulfat
äq.	Äquivalente
arom.	aromatische Protonen
AS	Aminosäure
AZT	Azidothymidin
B	Base (im Sinne von Nukleobase)
b	breites Signal
Bn	Benzyl
BSA	Benzolsulfonsäure
Bz	Benzoyl
C	Cytosin, Cytidin
C	Core
C ^{Bz}	N ⁴ -Benzoyl-cytosin
ca.	circa
CD	Circular Dichroismus
CMV	Cytomegalievirus
COSY	korrelierte Spektroskopie (engl.: correlated spectroscopy)
CPG	controlled pore glass (engl.)
c _t	totale Strangkonzentration
δ	chemische Verschiebung
d	Dalton
d	Dichte in g/ml

d	Dublett
d	Desoxyribo
d	Schichtdicke
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dublett
$\Delta\epsilon$	molarer Circular dichroismus
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ΔG	Freie Energie
ΔH	Enthalpie
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	Diisopropylethylamin (Hünigs Base)
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- d_6	Dimethylsulfoxid sechsfach deuteriert
DMTr	Dimethoxytriphenylmethyl, Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ΔS	Entropie
E	Extinktion
E	envelope
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
ESI(-)	Elektrospray-Ionisation im negativen Modus
ESI(+)	Elektrospray-Ionisation im positiven Modus
et al.	et alii (und andere)

F	Fluor Modifikation
F	3'-Fluoreszein Modifikation
Fa.	Firma
FC	Flashchromatographie
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
G	Guanin, Guanosin
G ^{iBu}	N ² -Isobutyryl-guanin
g	Gramm
h	Heptett
h	Stunden
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	menschliches Immunschwächevirus (engl.: human immunodeficiency virus)
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (engl.)
HUGO	Human Genome Organization
Hz	Hertz
IRES	interne, ribosomale Angriffsstelle (engl.: internal ribosomal entry site)
J	Kopplungskonstante in der NMR-Spektroskopie
K	Gleichgewichtskonstante
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
kd	kilo-Dalton
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge

LDL	Lipoprotein geringer Dichte (engl.: low density lipoprotein)
Lit.	Literatur
ln	natürlicher Logarithmus
Lsg.	Lösung
M	molar (mol/l)
m	Masse
m	Multipllett
MALDI	Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation (engl.: matrix assisted laser desorption/ionization)
max.	maximal
Me	Methyl-Modifikation
MHz	Megahertz
min.	Minute
mmol	Millimol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl der Nukleotide (in einem Oligonukleotid)
n	Molekularität des Übergangs
NCR	nicht codierende Region (engl.: non coding region)
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonance)
Nr.	Nummer
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm, Extinktion bei 260 nm
ODN	Oligodesoxynukleotid
ORF	offener Leserahmen (engl.: open reading frame)
Ψ	pseudo Triplet
p	modifizierte Phosphodiesterbindung
p.a.	pro analysi
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PNA	Peptid-Nukleinsäure
ppm	parts per million
PPY	4-Pyrrolidinopyridin
θ	Elliptizität
$[\theta]$	molare Elliptizität
q	Quartett
R	universelle Gaskonstante
r	ribo
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (engl.)
R_p	R-Konfiguration an einem Phosphoratom (CIP-Nomenklatur)
RP	Umkehrphase
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
s	Sekunde
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt
S_p	S-Konfiguration an einem Phosphoratom (CIP-Nomenklatur)
T	Thymin, Thymidin
T	Temperatur
t	terminale Modifikation in einem Oligonukleotid
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl

TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
techn.	Technisch
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
<i>tert</i>	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
T _m	Schmelztemperatur (engl.: melting temperature)
TMS	Trimethylsilyl
TOF	Flugzeit (engl.: time of flight)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil, Uridin
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
X	Cholesterol Modifikation
Y	Cholsäure Modifikation
Z	Taurocholsäure Modifikation
z	Elementarladung

14.3 Publikationen und Poster

a) Publikationen

Lehmann, T.J.; Eisenhardt, S.; Engels, J.W.; *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, 16 (5&6), 815-820 Synthesis and characterization of phosphate-modified DNA-dimers with fluorine as an uncharged ligand

Lehmann, T.J.; Eisenhardt, S.; Engels, J.W.; *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, 18 (6&7), 1689-1691 Thermodynamic studies on hairpin forming antisense-oligodeoxynucleotides directed against hepatitis C virus RNA

Lehmann, T.J.; Schwarzer, K.; Schweitzer, M.; Engels, J.W.; *Collection Symposium Series* **1999**, 2, 302-305 Thermodynamic and CD-spectroscopic characterization of self-complementary methyl- and benzyl-modified d(CGCpGCG)-hexamers

Caselmann, W.H.; Serwe, M.; Lehmann, T.; Ludwig, J.; Sproat, B.S.; Engels, J.W.; *World Journal of Gastroenterology* **2000**, 6 (5), 626-629 Design, delivery and efficacy of therapeutic nucleic acids used to inhibit hepatitis C virus gene expression *in vitro* and *in vivo*

Lehmann, T.J.; Serwe, M.; Caselmann, W.H.; Engels, J.W.; *Nucleosides & Nucleotides* **2001a**, 20 (4-7), 1343-1346 Design and properties of hepatitis C virus antisense oligonucleotides for liver specific drug targeting

Lehmann, T.J.; Engels, J.W.; *Bioorg. Med. Chem.* **2001b**, 9 (7), 1827-1835 Synthesis of bile acid phosphoramidites and their properties when 5'-tethered to antisense oligodeoxynucleotides against HCV

b) Posterpräsentationen

23. - 26. November 1996: Modern Views of Nucleic Acid Structure, Sequence Analysis, Interactions and Functions, 4th Swedish-German Symposium, Reisenburg Castle, Deutschland

Poster: „Synthesis and characterization of phosphate-modified DNA-dimers with fluorine as an uncharged and p-dimethylaminophenyl as a cationic group“

06. - 10. September 1998: Nucleosides, Nucleotides, and Their Biological Applications, XIII International Round Table, Montpellier, Frankreich

Poster: „Minimal phosphorothioate and benzyl-modified antisense-oligonucleotides inhibit hepatitis C virus RNA in an *in vitro* and *in vivo* translation assay“

04. - 09. September 1999: Chemistry of Nucleic Acid Components, XIth Symposium, Spindleruv Mlýn, Tschechische Republik

Poster: „Thermodynamic and CD-spectroscopic characterization of methyl- and benzyl-modified d(CGCpGCG)-hexamers“

10. - 14. September 2000: Nucleosides, Nucleotides, and Their Biological Applications, XIV International Round Table, San Francisco, USA

Poster: „Synthesis and properties of bile acid coupled antisense oligodeoxynucleotides to inhibit hepatitis C virus gene expression“

Curriculum Vitae

Thomas Lehmann

* 11.03.1968 in Frankfurt am Main

Schulausbildung

1974 - 1978	Grundschule Nord in Oberursel/Taunus
1978 - 1987	Kaiserin-Friedrich-Gymnasium in Bad Homburg v.d.H.
06/1987	Abitur

Wehrdienst

07/1987 - 09/1988	15 Monate Grundwehrdienst als Transportsoldat in Herborn
-------------------	--

Berufsausbildung

09/1988 - 02/1991	Ausbildung zum Chemielaboranten bei der Hoechst AG in Frankfurt am Main
-------------------	--

Hochschulstudium

04/1991	Immatrikulation für den Studiengang Chemie-Diplom an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
12/1995	Abschluß des Studiums mit dem Grad des Diplom-Chemikers Durchschnittsnote: 1,1
Diplomarbeit	Synthese und Eigenschaften von DNA-Dimeren mit P-F-Bindung
01/1996 - 09/1996	Mitarbeit beim BMBF Wettbewerb „BioRegio“ in der BioRegion Rhein-Main, Koordinationsbüro Frankfurt
seit 10/1996	Anfertigung der Dissertation am Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt in der Arbeitsgruppe von Prof. J.W. Engels