

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Design und Synthese *Prodrug*-modifizierter
Nukleotidanaloga für die Immunstimulation und Krebstherapie**

Simon Veth

aus

München, Deutschland

2022

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 24.08.2022

Simon Veth

Dissertation eingereicht am: 30.05.2022

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachterin: Dr. Sabine Schneider

Mündliche Prüfung am: 15.07.2022

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder auf Konferenzen vorgestellt.

Publikationen

Simon Veth*, Adrian Fuchs*, Dilara Özdemir*, Clemens Dialer, David J. Drexler, Fabian Knechtel, Gregor Witte, Karl-Peter Hopfner, Thomas Carell, and Evelyn Ploetz, *ChemBioChem* **2022**, 23, e202200005.

Konferenzbeiträge

Poster „High yielding total synthesis of 2’3’-cGAMP”, 09/2019: **Nucleic Acid Immunity in Health and Disease**, Ascona, Schweiz.

Weitere Publikationen

Rory C. Mykura*, Simon Veth*, Ana Varela*, Lydia Dewis, Joshua J. Farndon, Eddie L. Myers, and Varinder K. Aggarwal, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 14677-14686.

*Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

„Wer hohe Türme bauen will, muss lange beim Fundament verweilen.“
Anton Bruckner

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* für die Betreuung meiner Master- und Doktorarbeit danken. In den letzten vier Jahren hatte ich die Möglichkeit, unter Deiner Anleitung an herausfordernden Themenstellungen zu arbeiten und genoss dabei stets Dein Vertrauen in meine Arbeit. Das von Dir geschaffene Arbeitsumfeld erlaubte mir kreative Freiheit und ließ keine Wünsche offen. Selbst bei Rückschlägen oder unvorhergesehenen Richtungswechseln bei der Verwirklichung der Projekte hast Du mir gezeigt, stets die positiven Seiten daran zu erkennen.

Dr. Sabine Schneider danke ich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission danke ich herzlich für ihre Zeit, sich mit meiner Prüfung zu beschäftigen.

Bei *Dr. Markus Müller* möchte ich mich für die Beantwortung unzähliger Fragen, tatkräftigem Beistand bei der Behebung technischer Defekte und dem schier unermüdlichen Einsatz für eine Forschungsgruppe dieser Größenordnung bedanken.

Frau *Slava Gärtner* sei an dieser Stelle für ihre Hilfsbereitschaft und die Durchführung aller bürokratischen Aufgaben gedankt.

Für einen reibungslosen Laboralltag trug die Arbeit von *Kerstin Kurz* entscheidend bei. Hierfür bedanke ich mich recht herzlich.

Im Rahmen dieser Arbeit durfte ich mit zahlreichen, wissenschaftsbegeisterten Personen in Kollaborationen zusammenarbeiten. An dieser Stelle sei daher *Dr. Clemens Dialer, Dr. David Drexler, Fabian Knechtel, Adrian Fuchs, Dr. Evelyn Plötz* und *Dr. Gregor Witte* gedankt.

Für das gewissenhafte und zügige Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich vielmals bei *Tina Aumer, Johann de Graaff, Corinna Sommermann* und *Dilara Özdemir*.

Während meiner Zeit in der Gruppe habe ich mich sehr gefreut, einige Forschungsarbeiten betreuen zu dürfen. In chronologischer Reihenfolge eures Mitwirkens sei *Andrea Kretz, Charlotte Fischer, Carla Walla, Tobias Kernmayr, Andrea Kopp, Felix Böhm, Manuel Münch* und *Irene Cid* gedankt. Vielen Dank dafür, dass ihr einen entscheidenden Teil zu dieser Arbeit beigetragen habt. Ich wünsche euch viel Spaß und Erfolg auf euren weiteren Wegen.

Ein großer Dank gilt meinen Laborkollegen aus F4.012. Während meiner Masterarbeit wurde ich herzlich von *Dr. Clemens Dialer, Dr. Michael Stadlmeier, Dr. Hidenori Okamura* und *Dr. Bastien Viverge* aufgenommen – ihr habt mich stets zu neuen Ansätzen inspiriert. In den darauffolgenden Jahren fand ein vollständiger Personalwechsel statt und mit *Jonas Feldmann, Johann de Graaff, Felix Müller, Dr. Florian Schelter* und *Stefan Wiedemann* wurden die besonderen Umstände einer globalen Pandemie bestritten. Es war auf jeden Fall eine wahrlich außergewöhnliche Zeit und nichts kann eure gute Laune trüben. Ich erinnere mich mit einem Lächeln auf den Lippen an die gemeinsamen Mittagspausen, die Ausflüge und so manch schräge Geschichte aus dem Laboralltag.

Des Weiteren danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und Geduld.

Abschließend möchte ich meiner Freundin *Kathi* danken. Du hast mir in allen Lebenslagen viel Kraft und Mut gegeben und hattest immer ein offenes Ohr für mich. Dafür bin ich dir unendlich dankbar. Ich freue mich darauf mit dir auch in Zukunft den gemeinsamen Weg zu gehen.

Inhaltsverzeichnis

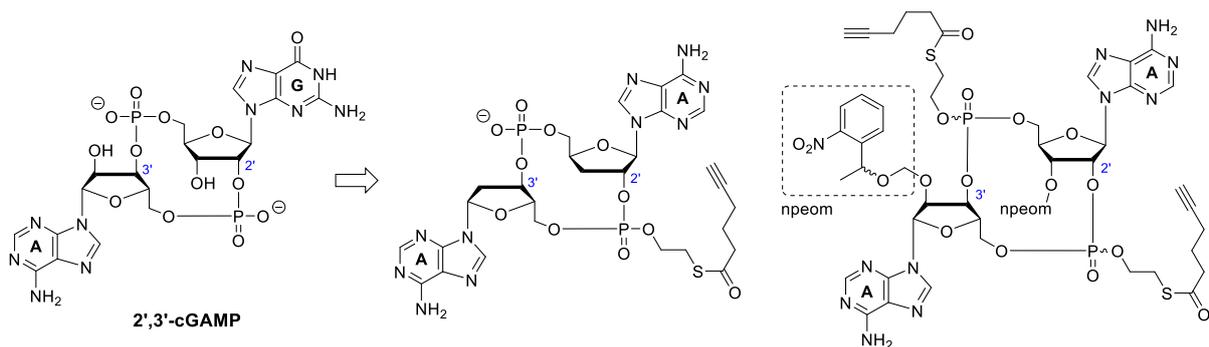
1	Zusammenfassung.....	III
2	Summary.....	V
3	Einleitung.....	1
3.1	Immunmodulation in der Krebstherapie.....	1
3.1.1	Immunsystem.....	1
3.1.2	cGAS-STING-Kaskade.....	2
3.1.3	Tumorimmunität in der Krebstherapie.....	8
3.1.4	cGAS-STING-Kaskade in der Krebsimmuntherapie.....	11
3.2	Akute myeloische Leukämie.....	14
3.2.1	Zytostatika zur Behandlung von AML.....	15
3.2.2	Hypomethylierende Cytidin-Analoga.....	15
3.3	<i>Prodrug</i> -Konzept.....	19
4	Zielsetzung.....	23
5	Resultate und Diskussion.....	25
5.1	cGAMP Analoga.....	25
5.1.1	Biologisch aktive zyklische Dinucleotide.....	25
5.1.2	<i>Prodrug</i> -Design und <i>Targeting</i> -Konzepte für cGAMP Analoga.....	30
5.1.3	Mono-SATE- <i>Prodrug</i> als Leitstruktur für ein Antibody-Drug-Conjugate.....	35
5.1.4	Photolabiles CDN- <i>Prodrug</i>	48
5.1.5	Ausblick zu CDN- <i>Prodrugs</i>	62
5.1.6	Synthese fluoreszenter cGAMP-Analoga.....	64
5.2	<i>Prodrugs</i> von cAzadC.....	71
5.2.1	Synthese von cAzadC- <i>Prodrugs</i>	72
5.2.2	Biologische Evaluierung der cAzadC- <i>Prodrugs</i>	79
5.2.3	Ausblick zu cAzadC- <i>Prodrugs</i>	82
6	Experimenteller Teil.....	83
6.1	Chemische Materialien und Methoden.....	83
6.2	Experimentelle Vorschriften zum mono-SATE- <i>Prodrug</i>	86
6.3	Experimentelle Vorschriften zum photolabilen CDN- <i>Prodrug</i>	104
6.4	Experimentelle Vorschriften zu biologisch aktiven CDNs.....	116
6.4.1	2',3'-cGAMP (1).....	116
6.4.2	2',3'-c-di-AMP (28).....	123
6.5	Experimentelle Vorschriften zu cAzadC- <i>Prodrugs</i>	129
6.5.1	ProTide.....	129

6.5.2	CycloSal.....	132
6.5.3	Lock-In-CycloSal.....	135
7	Abkürzungsverzeichnis	141
8	Literaturverzeichnis.....	145

1 Zusammenfassung

Die cGAS-STING-Kaskade ist ein wichtiger Signalweg des angeborenen Immunsystems von Metazoa. Dieser dient der Erkennung des Gefahrensignals cytosolisch vorliegender DNA, welche aus eindringenden Pathogenen (Fremd-DNA) als auch beschädigten Zellkernen oder Mitochondrien (Eigen-DNA) stammen kann. Der *second messenger* 2',3'-cGAMP nimmt dabei eine zentrale Rolle bei der Signalweitergabe nach Erkennung intrazellulärer DNA durch cGAS zum STING-Rezeptor ein. In Folge der Aktivierung von STING wird eine Signalkaskade ausgelöst, die in der Expression immunstimulierender Proteine wie Interferonen und Zytokinen resultiert. Als Konsequenz dieser Entdeckungen herrscht ein reges, pharmazeutisches Interesse an der Erforschung von Modulatoren für die cGAS-STING-Kaskade. So verspricht die Anwendung von STING Agonisten die Aktivierung des Immunsystems gegen Krebszellen, aber auch neue Möglichkeiten bei der Bekämpfung viraler und bakterieller Infektionen. Die pharmakokinetischen Eigenschaften des zyklischen Dinukleotids 2',3'-cGAMP sind nicht für die Anwendung als Arzneimittel geeignet. Ein wesentlicher Grund hierfür ist die unter physiologischen Bedingungen zweifach negativ geladene Struktur und die daraus resultierende schlechte Permeation von Zellmembranen. Darüber hinaus ist insbesondere für die Krebsimmuntherapie ein möglichst zelltypspezifisches *Targeting* von Interesse um unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren.

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation wurden daher *Prodrug*-Derivate von 2',3'-cGAMP-Analoga entworfen und synthetisiert. Diese besitzen das gängige *Prodrug*-Motiv *S*-Acyl-2-thioethyl (SATE), welches dahingehend weiterentwickelt wurde, dass es ein terminales Alkin aufweist. Dies erlaubt an einem späten Zeitpunkt der Synthese durch Click-Chemie Modifikationen einzuführen, die für Untersuchungen zu zelltypspezifischem *Targeting* geeignet sind. Neben der Synthese wurden in Kollaboration mit *Dilara Özdemir* die biologische Aktivität sowie in Kollaboration mit *David Drexler* (*Hopfner* Gruppe) Untersuchungen zum *Targeting* durchgeführt.

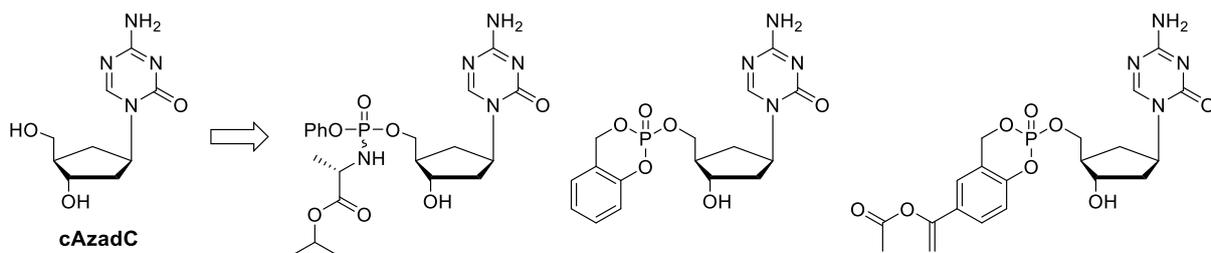


Die Anwendung des *Prodrug*-Konzepts ist bei therapeutisch relevanten Nukleosid-Analoga eine häufig verwendete Herangehensweise zur Verbesserung pharmakokinetischer Eigenschaften. Dies liegt neben Verbesserungen der Zellpermeabilität vor allem darin begründet, dass modifizierte Nukleosid-Analoga nur langsam durch die entsprechenden Kinasen in das biologisch aktive Triphosphat umgesetzt werden. Besonders limitierend ist dabei der erste Phosphorylierungsschritt. Eine Maskierung des entsprechenden

Nukleosidmonophosphats durch biologisch oder chemisch spaltbare Gruppen hat sich als gängige Strategie etabliert.

Die Problematik der unzureichenden Phosphorylierung wird auch bei dem im Jahr 2019 von der Gruppe um *Prof. Dr. Carell* publizierten carbozyklischen 5-Aza-2'-deoxycytidin (cAzadC) vermutet. Das Cytidin-Analogon cAzadC stellt eine signifikant stabilere Variante des Decitabins dar, welches trotz seiner Hydrolyseempfindlichkeit als hypomethylierend wirkendes Medikament bei der Behandlung von akuter myeloischer Leukämie (AML) zum Einsatz kommt. Aufgrund der verbesserten Stabilität bei gleichzeitigem Fortbestand der hypomethylierenden Wirkung, stellt cAzadC einen vielversprechenden Kandidaten für ein epigenetisch aktives Arzneimittel dar. Es wurde jedoch beobachtet, dass eine höhere Dosierung von cAzadC gegenüber Decitabin für vergleichbare Effekte notwendig ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene *Prodrug*-Konzepte verfolgt um möglichst die Bioverfügbarkeit und pharmakokinetischen Eigenschaften von cAzadC zu verbessern. Neben der Etablierung des synthetischen Zugangs wurde in Kollaboration mit *Tina Aumer* die biologische Evaluierung der Prodrugs in Krebszelllinien des Blutes, der Lunge und der Leber durchgeführt.

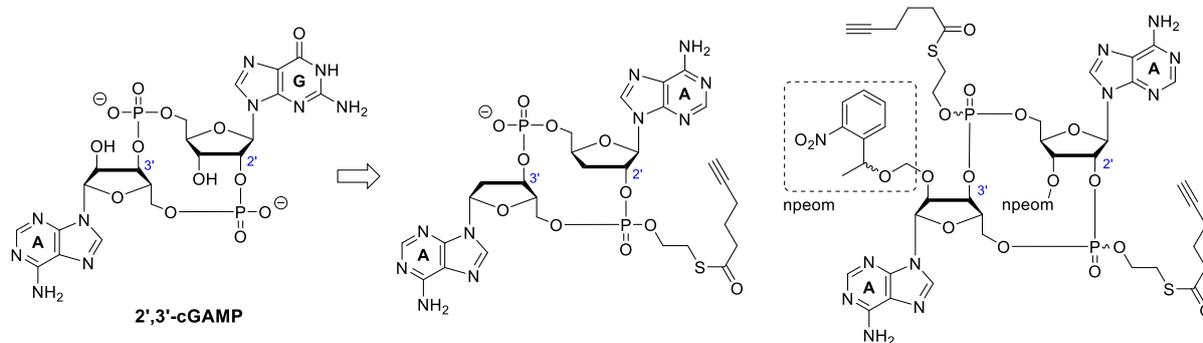


Neben der Synthese von *Prodrug*-modifizierten Nukleotidanaloga war die Synthese und funktionale Evaluierung eines fluoreszenten 2',3'-cGAMP-Analogons Teil dieser Dissertation. In Kapitel 5.1.6 wird der bei *ChemBioChem* publizierte Artikel gezeigt.

2 Summary

The cGAS-STING pathway is an important signaling pathway of the innate immune system in metazoa. Its function is to recognize the presence of DNA in the cytosol as danger signal. Importantly, the DNA recognized as a danger signal is independent from its source, whether it is originating from pathogens or damaged nuclei and mitochondria from the host. The second messenger 2',3'-cGAMP is a key player to transfer the signal from the DNA-recognizing enzyme cGAS to the STING receptor. Following the activation of STING a signaling cascade is triggered that leads to the expression of immunostimulatory proteins such as interferons and other cytokines. As a result of those discoveries the use of STING agonists in medicine is gaining interest. More precisely, agonists of STING hold great promises for cancer immunotherapy. These compounds may also establish a new strategy for the treatment of viral and bacterial infections. However, the cyclic dinucleotide 2',3'-cGAMP has unfavorable pharmacokinetic properties due to its low ability to cross cell membranes as a consequence of its two-fold negatively charged structure under physiological conditions. Moreover, for cancer immunotherapy, the ability to have a cell type-specific targeting mechanism would be beneficial to reduce undesired toxic side-effects.

In the first part of this thesis 2',3'-cGAMP analogs bearing prodrug motives were designed and synthesized. The prodrug motive explored, is a modified *S*-Acyl-2-thioethyl (SATE) unit with a terminal alkyne, which allows late-stage functionalization by click chemistry. After establishing the synthetic access, the biological activity of the designed analogs was tested in collaboration with *Dilara Özdemir*. In collaboration with *David Drexler* (*Hopfner* group) the cell targeting was investigated.

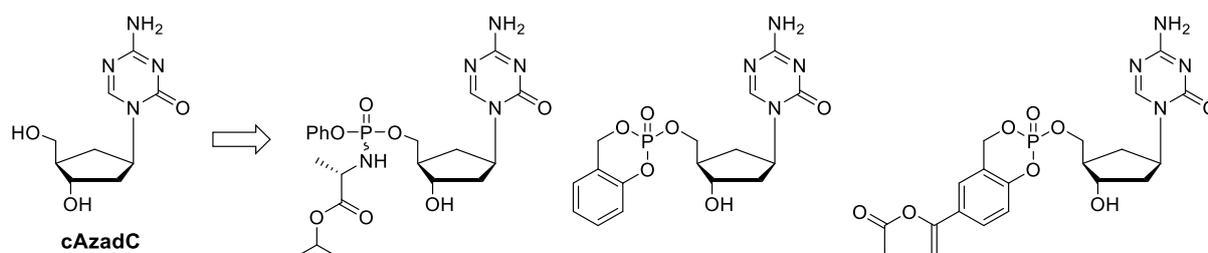


The use of the prodrug concept is a common strategy to improve pharmacokinetic properties of nucleoside analogs. Besides improving the cell membrane permeability of therapeutically active compounds, a main reason to use prodrugs of the nucleoside monophosphate instead of its parent nucleoside is the slow intracellular conversion of modified nucleosides by kinases. The first phosphorylation step is known to be the limiting step in the conversion of nucleosides to its bioactive triphosphate form.

In 2019, the group of *Prof. Dr. Carell* published a carbocyclic 5-aza-2'-deoxycytidine (cAzadC), which is a significantly more stable cytidine analogue compared to decitabine. Despite its hydrolytic instability, the hypomethylating agent decitabine is used in the clinic for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). Since cAzadC shows a similar hypomethylating effect as decitabine but features an improved stability, cAzadC has great potential to be used

as alternative medication in the future. Compared to decitabine however, higher dosing is required.

In the second part of this thesis various prodrugs were prepared in order to further improve the bioavailability and pharmacokinetic properties of cAzadC. Following the establishment of synthetic access, the cAzadC prodrugs were biologically evaluated in collaboration with *Tina Aumer* in cancer cell lines from blood, lung, and liver.



Along with the synthesis of prodrug-modified nucleotide analogs, a fluorescent 2',3'-cGAMP analog was synthesized and evaluated by two-photon imaging in the progress of this thesis. In chapter 5.1.6 the in *ChemBioChem* published article is shown.

3 Einleitung

3.1 Immunmodulation in der Krebstherapie

3.1.1 Immunsystem

Mikroben sind allgegenwärtig und können für Menschen und Säugetiere von großem Nutzen sein. Ein beeindruckendes Beispiel beim Menschen ist der Verdauungstrakt, insbesondere der Dickdarm. Dort haben 100 Billionen Bakterien eine mutualistische symbiotische Beziehung zum Wirtsorganismus. Sie spielen unter anderem eine bedeutende Rolle bei der Verdauung von Nahrungsbestandteilen, bei der Entwicklung der Darmschleimhaut und auch lymphartiger Gewebe.^[1-3] Im Kontrast zu den symbiotisch nützlichen Mikroorganismen enthält eine Vielzahl von Mikroben eine große Bandbreite an Toxinen und Allergenen, welche die Homöostase bedrohen und krankheitserregend sein können.^[4] Um sich gegen die enorme Vielzahl an Pathogenen sowie deren vielfältigen Mechanismen zu schützen, ist für einen komplexen Organismus wie den Menschen ein mehrschichtiges Abwehrsystem notwendig: das Immunsystem.

Das Immunsystem gliedert sich im Wesentlichen in zwei immunologische Verteidigungslinien, um eindringende Pathogene, wie beispielsweise Viren, Bakterien und Pilze abzuwehren. Es handelt sich dabei um das angeborene und das adaptive Immunsystem, welche sich ineinandergreifend ergänzen.^[5-6]

Zum Schutz vor Infektionen dienen in erster Linie anatomische sowie physiologische Barrieren, die zum angeborenen Immunsystem gezählt werden können. Diese umfassen die Haut, Schleimhäute, Körpertemperatur und niedrige pH-Werte auf der Haut und im Magen. Wenn Erreger diese ersten Barrieren überwinden konnten, initiiert zunächst das angeborene Immunsystem sofort oder innerhalb von Stunden nach dem Eindringen eine Immunantwort.^[6] Dieser Prozess basiert auf Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR), die es bestimmten Immunzellen wie zum Beispiel Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs) ermöglichen Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) zu erkennen.^[7] Ein typisches PAMP, welches durch PRRs erkannt wird, ist beispielsweise doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA), die während einer Virusinfektion vorliegt und somit als Motiv pathogenen Ursprungs identifiziert werden kann.^[8] Die rasche Antwort des angeborenen Immunsystems durch Rekrutierung von Immunzellen und lokale Entzündungsreaktion wird durch die Produktion von Cytokinen und Chemokinen initiiert. Sie erfolgt ohne die Erzeugung von Antikörpern und ist besonders gegen neuartige Expositionen effizient.^[6]

Die adaptive Immunantwort hingegen ist abhängig von Antigenen und aufgrund der Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses besonders gegen sekundäre Expositionen gerichtet.^[9] Sie basiert überwiegend auf der Fähigkeit von Thymus-abgeleiteten (T) und Knochenmark-abgeleiteten (*bone marrow*, B) Lymphozyten, Pathogen-spezifische Antigene mit Zelloberflächenrezeptoren zu erkennen, sowie durch Zelldifferenzierung und Antikörperproduktion zu reagieren. B-Zellen erkennen dabei direkt Oberflächenproteine und

Zuckerstrukturen invasiver Mikroben, wohingegen T-Zellen auf die Interaktion mit teilweise abgebauten Antigenen auf den Oberflächen von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) angewiesen sind. Zu den wichtigsten APCs gehören Makrophagen und DCs, weshalb T-Zellen ein wichtiges Bindeglied von angeborenem und adaptiven Immunsystem darstellen.^[10]

Für beide Mechanismen der Immunantwort ist die Fähigkeit, pathogene Strukturen von körpereigenen Motiven und sogar den anfangs erwähnten, nützlichen Mikroorganismen zu unterscheiden, von essentieller Bedeutung. Das Versagen der Immunabwehr eigene Zellen zu tolerieren, wird mit einer Vielzahl an Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht.^[4]

Über die letzten zwei Jahrzehnte wurde zunehmend ersichtlich, dass einige PRRs nicht nur für PAMPs, sondern auch für die Erkennung von endogenen Molekülen aus beschädigten Zellen, sogenannten Schaden-assoziierten molekularen Mustern (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) verantwortlich sind.^[11-13] Zum Beispiel wurden zwei Vertreter der Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs) in Mäusen identifiziert (TLR2 und TLR4), die in Folge einer nicht-infektiösen Verletzung der Lunge für die Auslösung einer Entzündungsreaktion durch Interaktion mit fragmentierter Hyaluronsäure des Bindegewebes essentiell sind.^[14]

Oftmals lassen sich PAMPs und DAMPs nicht klar voneinander abgrenzen. Die Anwesenheit von Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Cytosol stellt beispielsweise unabhängig von der Herkunft für eine Säugetierzelle ein Gefahrensignal dar. Mögliche Ursachen für das Vorliegen cytosolischer, doppelsträngiger DNA (dsDNA) kann unter anderem eine Infektion mit einem Retro- oder DNA-Virus (Fremd-DNA) sowie Schäden am Zellkern oder an Mitochondrien (Eigen-DNA) sein.^[15] Ein wichtiger Sensor des angeborenen Immunsystems für die Erkennung so gebildeter cytosolischer dsDNA ist die zyklische Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat Synthase (cGAS).^[16] Der biochemische Signalweg, welcher durch Interaktion von cGAS mit dsDNA initiiert wird, wird im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

3.1.2 cGAS-STING-Kaskade

Um der Gefahr, welche durch cytosolische dsDNA signalisiert wird, entgegenzuwirken, muss dieses zunächst erkannt werden, was durch das Enzym cGAS erfolgt. cGAS kann selektiv dsDNA im Cytosol binden und daraufhin Adenosintriphosphat (ATP) und Guanosintriphosphat (GTP) in der aktiven Stelle zu dem zyklischen Dinukleotid (CDN) 2',3'-zyklisches Guanosin Adenosin Monophosphat (2',3'-cGAMP, **1**) umsetzen.^[17] Der *second messenger* 2',3'-cGAMP wird daraufhin im Cytosol freigesetzt. Die Substanz diffundiert durch die Zelle und kann mit dem in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) sitzenden Transmembranrezeptor *stimulator of interferon genes* (STING) wechselwirken. Der Rezeptor STING verändert durch die Bindung des CDNs die Konformation und transloziert vom ER zum Golgi-Apparat. STING wird dabei aktiviert und induziert durch eine Downstream-Signalkaskade die Expression immunstimulierender Proteine wie beispielsweise Interferon- β (IFN β). Dieser Signalweg des angeborenen Immunsystems wird cGAS-STING-Kaskade genannt (Abbildung 1).^[15, 18]

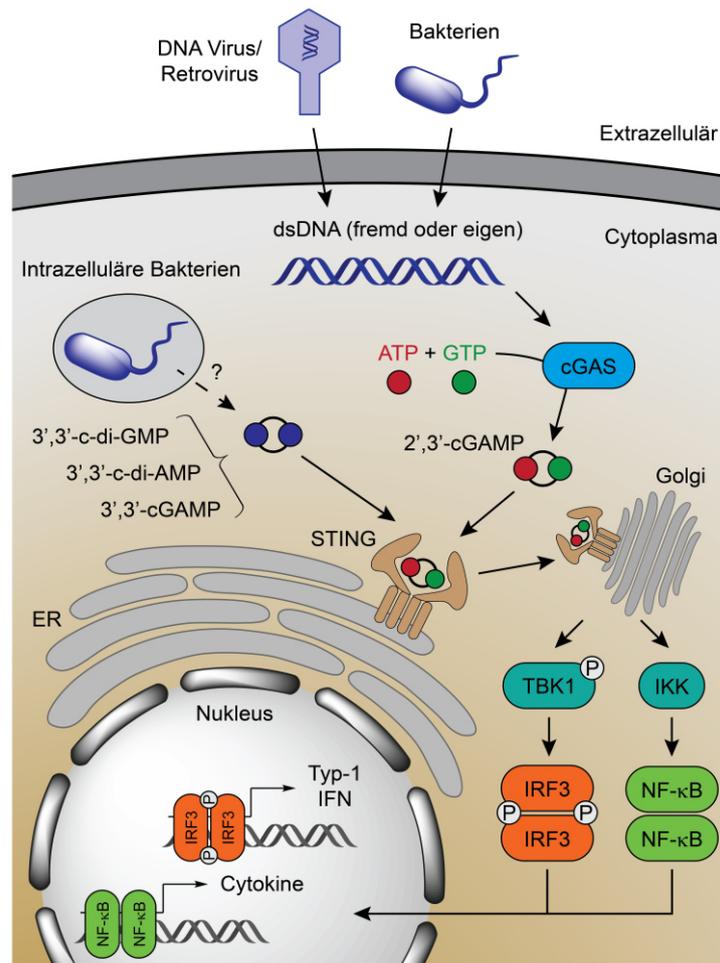


Abbildung 1: Signalkaskaden der cGAS-STING-Kaskade des angeborenen Immunsystems.

Der dsDNA-Sensor cGAS ist ein 60 kDa großes Protein, welches dimerisiert, um zwei DNA Liganden zu binden, wobei jedes Monomer mit weniger als 20 Basenpaaren (bp) wechselwirkt.^[19-20] Durch Kristallstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass sich cGAS Dimere zu Fibrillen anordnen.^[21] Für die robuste Aktivierung von cGAS ist dsDNA mit einer Länge von mindestens 40 bp notwendig. Die Stärke der resultierenden Aktivierung ist dabei abhängig von der Länge der dsDNA, jedoch nicht von deren Sequenz.^[20]

Das Produkt der enzymatischen Umsetzung von cGAS ist ein nicht-kanonisches CDN mit außerordentlich hoher Bindungsaffinität zu STING ($k_D^{STING} = 3.79 \text{ nM}$).^[22-23] Es unterscheidet sich von anderen bekannten CDN wie den bakteriellen *second messengern* zyklisches Diadenosin Monophosphat (3',3'-c-di-AMP, **2**) oder zyklischem Diguanosin Monophosphat (3',3'-c-di-GMP, **3**) durch den asymmetrischen Aufbau (Abbildung 2). Im Gegensatz zu den bakteriellen CDN-Vertretern besitzt 2',3'-cGAMP (**1**) neben einer kanonischen 3',5'-Phosphordiesterverknüpfung eine nicht-kanonische 2',5'-Verknüpfung zwischen der 2'-OH Gruppe des Guanosin-Bausteins und der 5'-OH Gruppe des Adenosin-Bausteins.^[23]

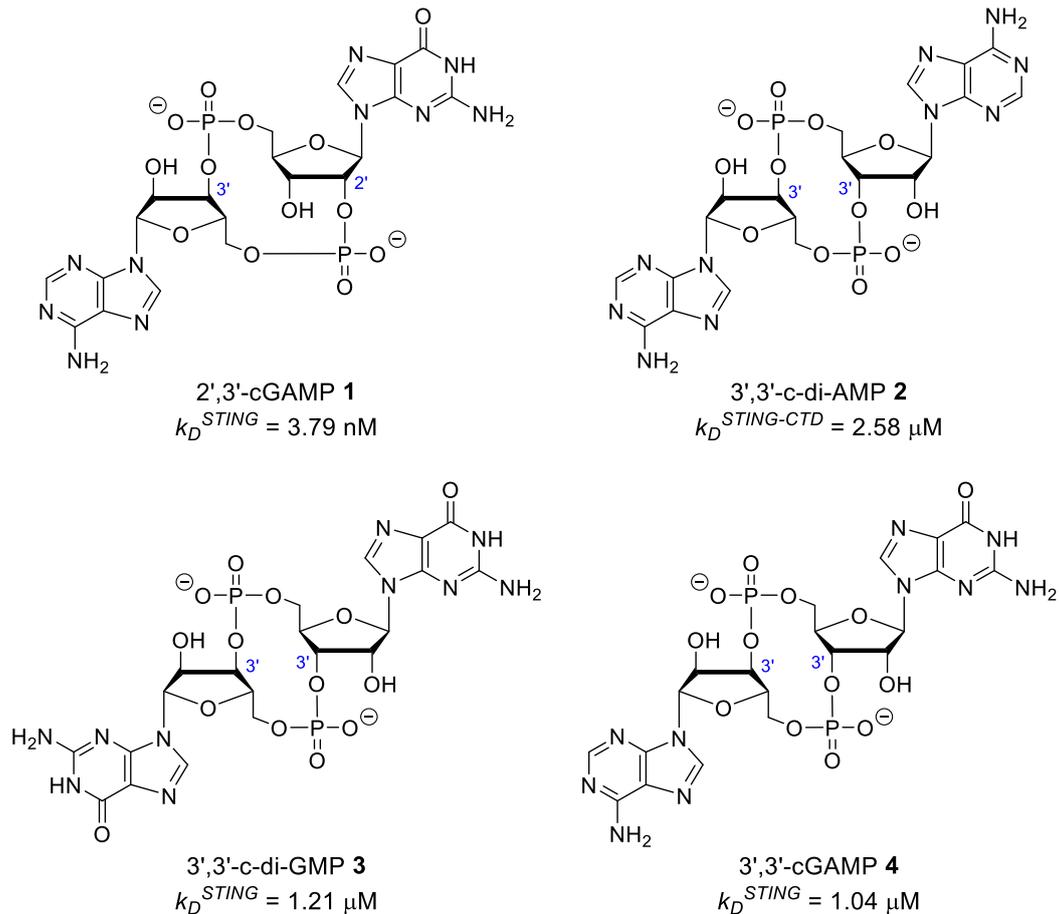


Abbildung 2: Strukturen sowie Bindungsdissoziationskonstanten des tierischen *second messenger* 2',3'-cGAMP (**1**) sowie der bakteriellen CDNs 3',3'-c-di-AMP (**2**), 3',3'-c-di-GMP (**3**) und 3',3'-cGAMP (**4**).

Das bereits erwähnte bakterielle 3',3'-c-di-GMP (**3**, $k_D^{STING} = 1.21 \text{ }\mu\text{M}$) sowie das 2012 im Cholera-Erreger *Vibrio Cholerae* entdeckte 3',3'-cGAMP (**4**, $k_D^{STING} = 1.04 \text{ }\mu\text{M}$) können beide jeweils STING binden und aktivieren.^[23-27] Für 3',3'-c-di-AMP (**2**) konnte zunächst keine Bindungsdissoziationskonstante ermittelt werden, allerdings wurde die Bindung an STING durch Kristallisation gezeigt. Kurz darauf wurde dann doch die Bindungsaffinität einer radioaktiv markierten Variante an die C-terminale Domäne (CTD) bestimmt ($k_D^{STING-CTD} = 2.58 \text{ }\mu\text{M}$).^[28-29] Die Bindungsaffinitäten der bakteriellen CDNs sind signifikant geringer als bei 2',3'-cGAMP (**1**). Als wichtigste Ursache hierfür wird eine strukturelle Präorganisation des Makrozyklus als Konsequenz der starrereren Struktur angenommen, welche aus der Verringerung von möglichen Konformationszuständen durch die 2',3'-Phosphordiesterbindung resultiert.^[30]

Der CDN-Rezeptor STING ist ein evolutionär konserviertes, dimeres Transmembranprotein mit einer CTD, die in das Cytosol ragt.^[31-32] In der *apo*-Form liegt der Rezeptor in einer weit geöffneten, V-förmigen Konformation vor (Abbildung 3A).^[23] Im Zentrum der geöffneten Struktur ist die Bindetasche für Liganden lokalisiert (Abbildung 3B). In Folge der Bindung eines 2',3'-cGAMP-Moleküls (oder eines anderen CDN-Liganden) werden Änderungen der Konformation induziert, welche zu einer Schließung der Deckelstruktur bestehend aus vier antiparallelen β -Faltblättern führt. Zudem wird eine Rotation der Bindeeinheit um 180° ausgelöst, in deren Folge die STING-Dimere oligomerisieren (Abbildung 3C).^[33]

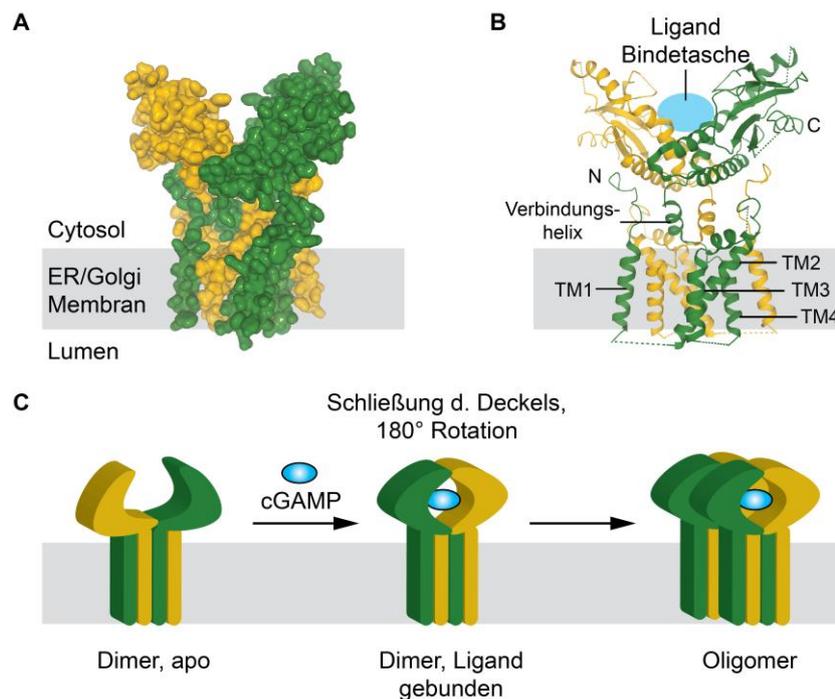


Abbildung 3: A) Cyro-EM 3D Rekonstruktion von STING schematisch in eine ER-Golgi Membran eingebettet. B) Schematische Repräsentation der Proteinstruktur mit hervorgehobener Bindetasche für Liganden. C) Schematische Übersicht der durch Bindung von 2',3'-cGAMP induzierten Konformationsänderungen sowie Oligomerisierung von STING. Frei adaptiert nach *Shang et al.*^[33]

Die Oligomerisierung von STING wurde als eine essentielle Voraussetzung für die nachfolgende Signalkaskade identifiziert. Hierbei kommt es zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten der Verbindungshelix (Cys148), welche Transmembran- und Ligandenbindedomäne verknüpft. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es sich bei der Aktivierung von STING ab diesem Punkt um einen nahezu irreversiblen Prozess handelt.^[34] Mutationsstudien konnten zeigen, dass die Oligomerisierung neben der Aktivierung auch für die Translokation der STING-Rezeptoren vom ER über das *ER-Golgi Intermediate Compartment* (ERGIC) zum Golgi-Apparat notwendig ist.^[28, 33] STING Oligomere stellen eine geeignete Plattform für die Interaktion mit *TANK-Binding Kinase 1* (TBK1) zur Verfügung. Diese phosphoryliert die STING Rezeptoren jeweils an Serin366, woraufhin eine Rekrutierung von *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3) ermöglicht wird.^[35] Auch der Transkriptionsfaktor IRF3 wird nun durch TBK1 phosphoryliert. Er kann in Folge dieser Modifikation dimerisieren und dann transloziert er in einer aktivierten Form in den Zellkern (Abbildung 4). Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung von IRF3 bereits im ERGIC erfolgt.^[36] Für die maximale Signaltransduktion ist jedoch eine Cluster-Bildung von STING im Golgi von Bedeutung, die ferner durch die Palmitoylierung eines Cysteinrests in der Transmembrandomäne 3 von STING begünstigt wird.^[37-38]

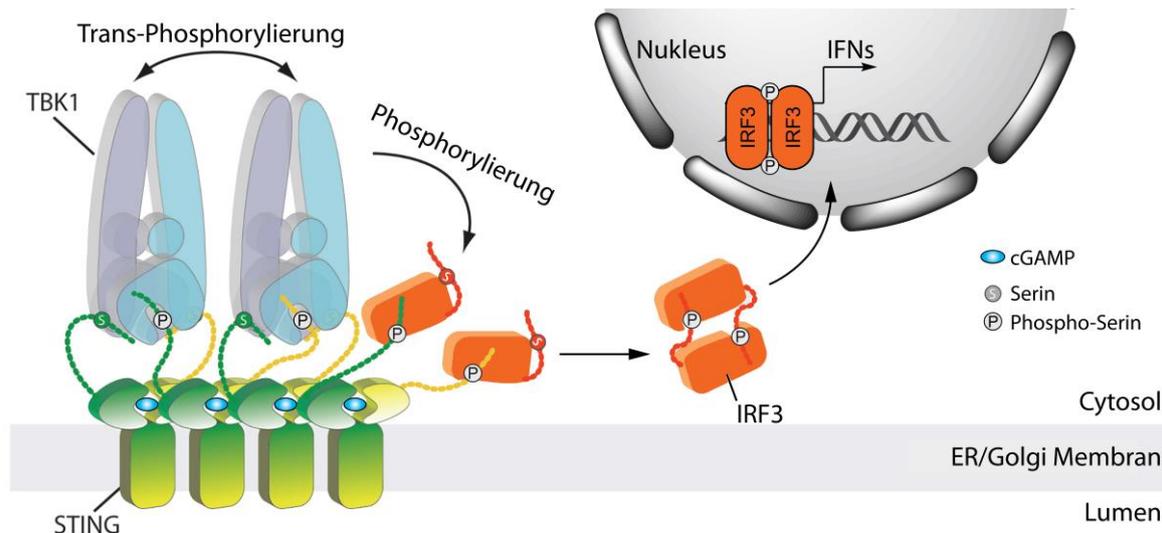


Abbildung 4: Rekrutierung von IRF3 und die Translokation in den Nucleus als Dimer in Folge von STING Oligomerisierung und Wechselwirkung mit TBK1. Frei adaptiert nach Zhang *et al.*^[39]

Im Zellkern initiiert IRF3 die Produktion von Typ-1 Interferonen und als Konsequenz daraus die Expression Interferon-stimulierter Gene (ISG).^[40-41] Neben IRF3 wird durch STING-Signalisierung auch der nukleare Faktor κB (NF- κB) aktiviert, welcher die Transkription von entzündungsfördernden Cytokinen wie IL-6 und dem *Tumour Necrosis Factor* (TNF) reguliert. Bei diesem Signalweg sind die I κB Kinasen (IKKs) IKK α und IKK β involviert. Der genaue Mechanismus der STING-abhängigen Aktivierung von NF- κB ist noch nicht aufgeklärt.^[15, 34, 42] Für die Induktion der gesamten STING-abhängigen Signalkaskade ist der bereits beschriebene *second messenger* 2',3'-cGAMP von zentraler Bedeutung. Obwohl cGAMP im Cytosol produziert wird, spielen auch Prozesse außerhalb der intrazellulären Signalweitergabe eine wichtige Rolle. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass 2',3'-cGAMP als Immunotransmitter durch *Gap Junctions* in benachbarte Zellen gelangen kann, um dort eine STING-abhängige Immunantwort auszulösen.^[43] Außerdem wurde beobachtet, dass 2',3'-cGAMP in virale Partikel verpackt in neuinfizierte Zellen gelangt, wo eine antivirale Immunreaktion erzeugt wird.^[44]

Für einige Viren ist bekannt, dass diese Gegenmaßnahmen entwickelt haben, um der immunologischen Überwachung ihres Wirts durch die cGAS-STING-Kaskade zu entgehen. Diese Mechanismen umfassen beispielsweise die Reduktion der 2',3'-cGAMP-Produktion durch Inhibierung von cGAS wie es für Herpesviren gezeigt werden konnte.^[45-47] Eine andere Möglichkeit besteht im Abbau des *second messengers* durch spezielle, virale Nucleasen wie diese für Pockenviren gefunden wurden. Die sogenannten *Poxvirus Immune Nucleases* (Poxine) spalten durch das Zusammenspiel einer katalytischen Triade aus Histidin, Tyrosin und Lysin selektiv die 3',5'-Phosphordiesterbindung und setzen damit das CDN in ein lineares Dinukleotid 5 um (Abbildung 5). Wie sich bei Untersuchungen der Gruppe von Philip Kranzusch zeigte, erfolgt die Spaltung dabei spezifisch für 2',3'-cGAMP und nicht bei 3',3'-CDNs.^[48] Interessanterweise sind Poxine aktuell die bisher einzigen bekannten Enzyme, welche 2',3'-cGAMP intrazellulär abbauen können. Im Menschen wird für den Abbau von 2',3'-cGAMP die Ectonucleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 (ENPP1)

verantwortlich gemacht. Das Enzym kann entweder extrazellulär als lösliches Protein im Serum oder als Transmembranprotein vorliegen, wobei sich die aktive Stelle auf der extrazellulären Seite der Membran befindet.^[49] Im Gegensatz zum Spaltungsmechanismus der Poxine erfolgt für ENPP1 der erste Spaltungsschritt selektiv an der 2',5'-Phosphordiesterbindung (Abbildung 5) und erfolgt spezifisch und ausschließlich für 2',3'-cGAMP. Das entsprechende 3',3'-Derivat kann nicht von ENPP1 umgesetzt werden.^[50] Während 3',3'-CDNs also von einer Vielzahl von bakteriellen und humanen Enzymen abgebaut werden können, wird 2',3'-cGAMP lediglich von wenigen, sehr spezifischen Nukleasen bzw. Phosphodiesterasen hydrolysiert.^[51-55] Dies hebt hervor, dass die 2',5'-Verknüpfung neben der hohen Affinität des CDNs für STING auch für eine erhöhte metabolische Stabilität verantwortlich ist.

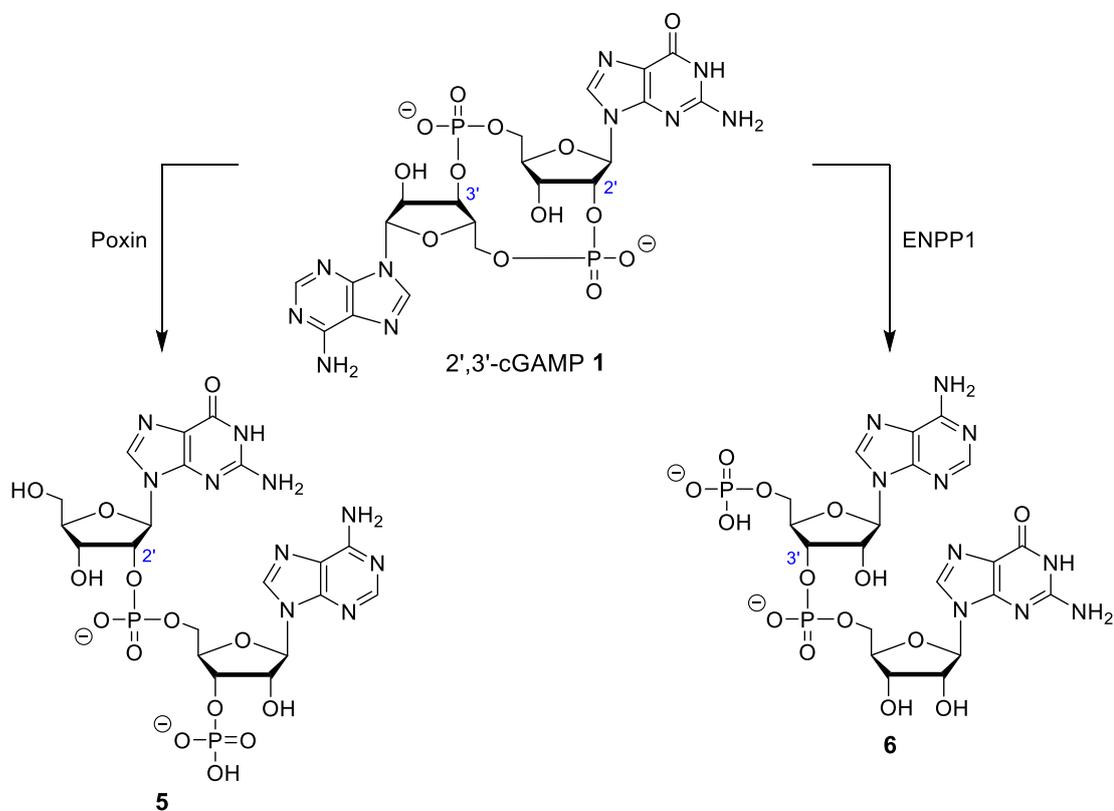


Abbildung 5: Unterschiedlicher Abbau von 2',3'-cGAMP (1) durch virale Poxine zu 5 und durch ENPP1 zu 6 im ersten Hydrolyseschritt.

Da ENPP1 ausschließlich extrazelluläres 2',3'-cGAMP spalten kann und bisher keine intrazelluläre Nuklease oder Phosphodiesterase, abseits von viralen Poxinen, für den Abbau des CDNs identifiziert wurde und ungeklärt ist wie 2',3'-cGAMP effizient in den extrazellulären Raum gelangen kann, ist das Ende des metabolischen Lebenszyklus des *second messengers* bisher nicht gut verstanden.^[34, 56] Es gibt jedoch erste Hinweise, dass CDNs wie das 3',3'-c-di-AMP durch *multidrug resistance proteins* (MRPs) exportiert werden können.^[57] Ein entsprechender Exporter für 2',3'-cGAMP konnte allerdings bislang nicht identifiziert werden. Wie an der beschriebenen Phosphodiesterase ENPP1 ersichtlich wird, ist davon auszugehen, dass die Präsenz von 2',3'-cGAMP auch im extrazellulären Raum eine bedeutende Rolle spielt.

Dies wird auch von den Erkenntnissen von *Li et al.* untermauert, welche mit SLC19A1 einen Importer für 2',3'-cGAMP identifizieren konnten, welcher in vielen Gewebetypen exprimiert wird. Den Erwartungen entsprechend wurden in Zellkultur für Zellen mit hohen SLC19A1-Expressionsleveln nach der Stimulation mit extrazellulärem 2',3'-cGAMP eine höhere Interferonproduktion gemessen als bei Zellen mit niedrigen Expressionsleveln von SLC19A1.^[58-59]

Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung des Transmembrantransports von 2',3'-cGAMP formulierte ebenfalls die Gruppe um *Lingyin Li*, da sie schlussfolgerten, dass Krebszellen aktiv das Zellinnere von 2',3'-cGAMP leeren, um den *second messenger* dem Abbau durch ENPP1 zuzuführen und so Entzündungsreaktionen zu verhindern.^[60] Als Konsequenz daraus fällt eine resultierende Immunantwort zu schwach aus, wodurch entartete Tumorzellen ungehindert proliferieren können. Solche Ausweichmechanismen von Tumorzellen gegenüber dem Immunsystem (*immune escape*) sind schon seit geraumer Zeit als zentrales Problem bei Krebserkrankungen bekannt.^[61] In den letzten drei Jahrzehnten wurden die Zusammenhänge von Immunsystem und Krebserkrankungen immer besser verstanden und verschiedene Therapieansätze im Bereich der Krebsimmuntherapie entwickelt.^[62-68] Dieses Thema sowie neue Ansätze, welche die soeben diskutierte cGAS-STING-Kaskade involvieren, werden in den nachfolgenden Kapiteln näher betrachtet.

3.1.3 Tumorimmunität in der Krebstherapie

Krebszellen weisen einzigartige Charakteristiken auf, welche es dem Immunsystem ermöglichen können diese als schädliche Zellen zu identifizieren. Diese Erkennungsmerkmale werden als Neoantigene oder Tumor-assoziierte Antigene bezeichnet. Beispiele sind mutierte Proteinvarianten von β -Catenin oder Caspase 8 sowie überexprimierte Proteine wie MUC1.^[69-70] Einige APCs, wie beispielsweise unausgereifte DCs, können durch Phagozytose diese Antigene von abgestorbenen Krebszellen aufnehmen. Es erfolgt eine Aktivierung und Reifung der DCs, welche daraufhin die Antigene mithilfe des *major histocompatibility complex* (MHC) auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Die gereiften DCs gelangen durch Lymphgefäße zu Lymphknoten, wo diese mit T- und B-Zellen in Kontakt kommen und diese aktivieren. Diese Immunzellen beginnen sich daraufhin zu vervielfältigen und durch den Körper zu zirkulieren. Werden Zellen mit den präsentierten Antigenen gefunden, werden diese beispielsweise durch die Rekrutierung von Makrophagen eliminiert (Abbildung 6).^[71]

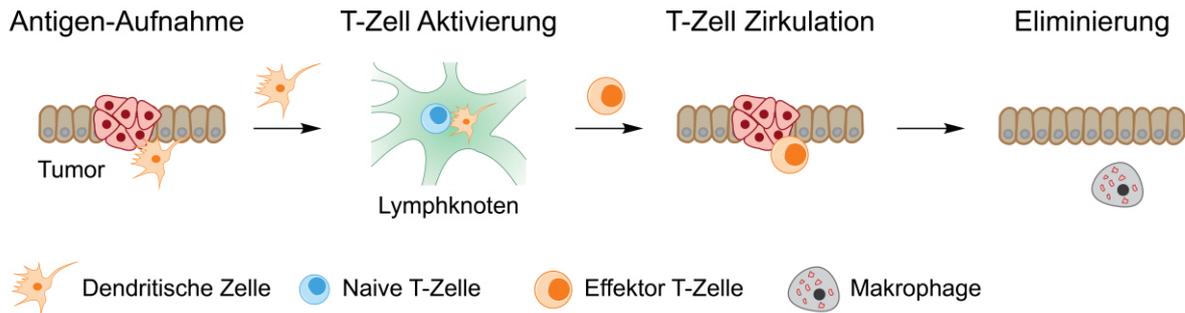


Abbildung 6: Antigen-Aufnahme durch dendritische Zellen, T-Zell Aktivierung in Lymphknoten sowie deren Zirkulation und Erkennung der Tumorzellen und Rekrutierung von Makrophagen als Schlüsselschritte bei der Anti-Tumor Immunität. Frei adaptiert nach Egen *et al.*^[72]

Diesem unter normalen Bedingungen sehr effektiven Prozess des Immunsystems stehen jedoch Mechanismen gegenüber, welche es den Tumorzellen ermöglichen der immunologischen Überwachung zu entgehen. Dieser *immune escape* ist häufig ein essentieller Bestandteil für das Fortbestehen der Krebszellen im Körper, das fortschreitende Krebswachstum sowie die Bildung von Metastasen.^[61] Um diesen immunsuppressiven Mechanismen entgegenzuwirken, wurden viele Strategien entwickelt, um das körpereigene Immunsystem durch Therapiemethoden zu aktivieren oder aber die inhibierenden Faktoren zu blockieren. Die ausgereiftesten Methoden der Krebsimmuntherapie basieren dabei auf Antikörpern, gentechnisch veränderten Zellen oder aber kleinen Molekülen, die gegen bestimmte PRRs gerichtet sind.^[68, 73]

Bei der medizinischen Verwendung von Antikörpern gibt es verschiedenste Herangehensweisen. Beispielsweise wurden monoklonale Antikörper (mAb) entwickelt, die an Krebs-spezifische Antigene binden und Prozesse des Immunsystems auslösen, welche zum Zelltod führen.^[74-75] Andere Ansätze nutzen die hohe Spezifität eines Antikörpers, um zytotoxische Substanzen gezielt in Krebszellen einzuschleusen. Hierfür werden Chemotherapeutika kovalent über einen intrazellulär spaltbaren Linker an Antikörper konjugiert. Diese sogenannten *Antibody-Drug-Conjugates* (ADCs) bringen den Vorteil mit sich, dass Nebenwirkungen infolge von Schädigungen des gesunden Gewebes gegenüber der klassischen Chemotherapie deutlich reduziert werden.^[76-79] Eine weitere Anwendung von Antikörpern in der Krebstherapie sind Checkpoint-Inhibitoren. Bei diesem Ansatz sind die Antikörper gegen Kontrollelemente (Checkpoints) des Immunsystems gerichtet, welche für die Inhibierung der Immunantwort von T-Zellen verantwortlich sind.^[80] Unter normalen Bedingungen dienen diese Checkpoints als Schutzmechanismus, um eine unkontrollierte Immunabwehr gegen körpereigene, gesunde Strukturen zu verhindern.^[81] Manche Krebszellarten können diese inhibierenden Mechanismen jedoch im Zuge der *immune escape* nutzen, um ungestört zu wuchern.^[82] Das erste Zielprotein für die Entwicklung von Checkpoint-Inhibitoren war der Rezeptor CTLA-4, welcher für die Dämpfung der anfänglichen Aktivierung von T-Zellen durch DCs verantwortlich ist (Abbildung 7A).^[83-85] Der monoklonale Antikörper Ipilimumab war im Jahr 2011 der erste zugelassene Checkpoint-Inhibitor und wird für die Therapie von Hautkrebs Patienten mit metastasierendem Krankheitsbild eingesetzt.^[86-88] Ipilimumab zeigte jedoch für zahlreiche andere Krebserkrankungen keine klinischen

Vorteile oder sogar nachteilige Effekte, die der fundamentalen Rolle von CTLA-4 als Immunregulator und der resultierenden Überreaktion des Immunsystems nach Inhibierung von CTLA-4 zugeordnet werden konnten.^[87, 89]

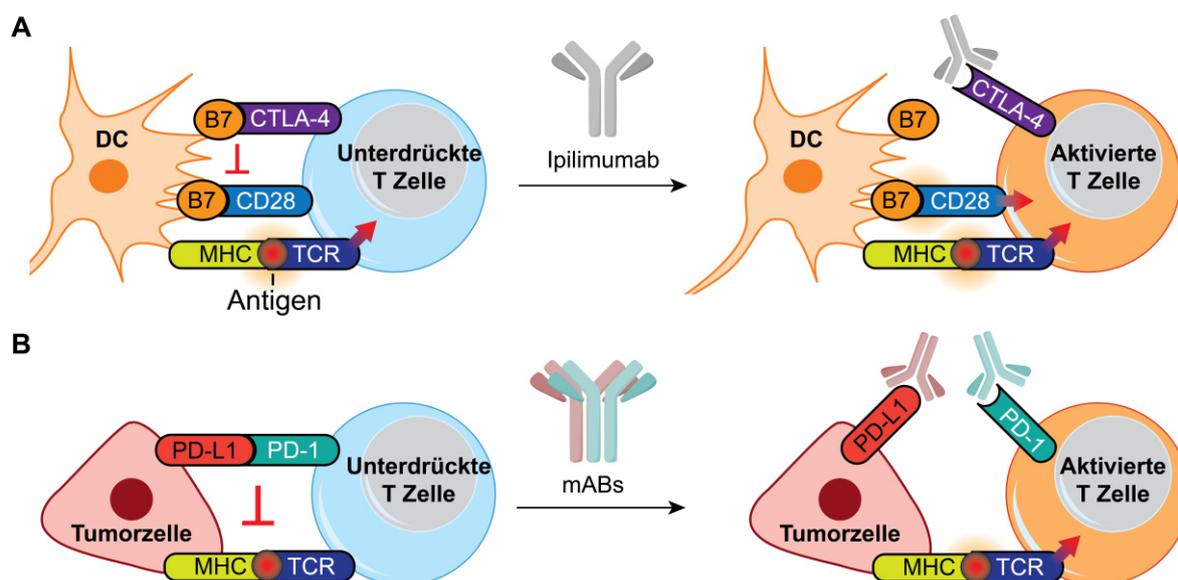


Abbildung 7: Wirkprinzip von Checkpoint-Inhibitoren. **A)** Anti-CTLA-4 Antikörper wie Ipilimumab. Für die Aktivierung von T-Zellen ist neben der Interaktion des T-Zellrezeptors (TCR) mit dem Antigen-präsentierenden MHC eine Stimulation von CD28 durch B7 co-stimulierende Moleküle notwendig. CTLA-4 interagiert kompetitiv mit B7 Rezeptoren und hemmt damit die T-Zellaktivität. Ipilimumab blockiert die Interaktion von CTLA-4 und B7, was in einer Aktivierung der T-Zelle resultiert. **B)** Interaktionen des PD-1 Rezeptors mit dem häufig von Tumorzellen exprimierten Ligand PD-L1 inhibieren die T-Zellaktivität. mAbs, die PD-1 und/oder PD-L1 binden, erlauben somit eine Reaktivierung von T-Zellen. Frei adaptiert nach *Farkona et al.*^[62]

Mit dem Rezeptor PD-1 wurde ein Kontrollelement von Antigen-stimulierten T-Zellen identifiziert, welches bei Interaktion mit seinen Liganden PD-L1 oder PD-L2 die Proliferation von T-Zellen, die Freisetzung von Cytokinen und die Cytotoxizität inhibiert.^[90-92] In verschiedenen Tumormodellen wurde die Expression des Liganden PD-L1 nachgewiesen, womit T-Zellen trotz Interaktion mit einem Tumor-assoziierten Antigen in einem inaktiven Zustand verbleiben (Abbildung 7B).^[93] Die Antikörper Pembrolizumab (anti-PD1), Nivolumab (anti-PD1) und Atezolizumab (anti-PD-L1) zählen zu den bekanntesten Vertretern der Inhibitoren für diesen Checkpoint und erzielen therapeutische Erfolge in einer Vielzahl von Krebsarten.^[86, 94-95] Es wird in den letzten Jahren zunehmend ersichtlich, dass für eine vollständige Remission und Heilung von Krebs eine Kombinationstherapie von zwei Antikörpern besonders vielversprechende Ergebnisse ermöglichen kann. Dieses Feld der medizinischen Forschung entwickelt sich rasch weiter und wird aktuell in klinischen Studien weiter erforscht.^[96-97]

Die Verwendung gentechnisch veränderter Zellen gehört zu den neuesten, marktreifen Ansätzen der Krebsimmuntherapie und ist ein herausragendes Beispiel personalisierter Medizin. Bei dieser Methode werden T-Zellen vom Patienten entnommen, im Labor gentechnisch verändert und dem Patienten infundiert. Diese veränderten T-Zellen bilden nun chimäre Antigenrezeptoren (CAR) auf ihrer Oberfläche, welche gegen Krebszellen gerichtet

sind.^[98-99] Die CAR-T-Zell-Therapie gehört mit der Erstzulassung von *Axicabtagene Ciloleucel* im Jahr 2017 zu den innovativsten Strategien, geht jedoch bisher mit hohen Kosten einher und steht aufgrund eines unausgewogenen Kosten-Nutzen-Verhältnisses in der Kritik.^[100-101]

Meist deutlich kostengünstiger sind Ansätze basierend auf immunmodulierenden, kleinen Molekülen. Neben dem Kostenaspekt bringen kleine Moleküle Vorteile wie bessere Bioverfügbarkeit und häufig auch einen einfacheren Zugang zum Tumorgewebe mit sich. Darüber hinaus haben diese Verbindungen meist die Möglichkeit Zellmembranen zu überwinden, beziehungsweise lassen sich dahingehend relativ einfach modifizieren. Somit ist das Wirkspektrum nicht wie beispielsweise bei den zuvor beschriebenen Antikörpern auf Membranrezeptoren beschränkt.^[102-103] Mit kleinen Molekülen lässt sich sowohl die Aktivität von T Zellen beeinflussen (zum Beispiel *Idelalisib* bei chronischer lymphatischer Leukämie) aber auch PRRs wie TLR7 ansteuern und deren Antitumor-Immunantwort artifiziell provozieren (zum Beispiel *Imiquimod* bei Basalzellenkrebs).^[104-106] Aufgrund der zentralen Rolle des STING-Rezeptors in der Regulation von Immunantworten, wurden und werden vielseitige Anstrengungen unternommen kleine Molekül-Agonisten für STING und somit neuartige Arzneimittel für die Krebsimmuntherapie zu entwickeln.

3.1.4 cGAS-STING-Kaskade in der Krebsimmuntherapie

Seit der Entdeckung von STING und 2',3'-cGAMP herrscht ein reges Interesse der industriell-pharmazeutischen und akademischen Forschung neuartige, potenzielle Agonisten und Antagonisten für die cGAS-STING-Kaskade zu entwickeln. Einerseits steht die Überaktivierung dieses Signalwegs in Verbindung mit chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise *STING-associated vasculopathy with onset in infancy* (SAVI), dem Aicardi-Goutières Syndrom (AGS) und systemischem Lupus Erythematoses (SLE), wobei für SLE ein Zusammenhang zur cGAS-STING-Kaskade noch kontrovers diskutiert wird.^[107-109] Andererseits ist bekannt, dass dieser Immunsignalweg und somit die Expression immunstimulierender Moleküle wie Typ-1 Interferon in verschiedensten Krebsarten runterreguliert ist, was die Tumorprogression begünstigt. Die Anwendung von STING Agonisten verspricht die Aktivierung des Immunsystems gegen Krebszellen, aber auch neue Möglichkeiten bei der Bekämpfung viraler und bakterieller Infektionen.^[110-112]

Noch vor der Entdeckung von 2',3'-cGAMP wurde das Xanthenon-Derivat DMXAA (**7**) als einer der ersten STING-Agonisten gefunden (Abbildung 8).^[113-114] Obwohl präklinische Studien zur Evaluierung von DMXAA als Anti-Krebsmedikament vielversprechende Ergebnisse erzielten, musste die klinische Phase III aufgrund mangelnder Therapieerfolge abgebrochen werden.^[115] Es zeigte sich bei späteren Nachforschungen, dass DMXAA ausschließlich an murines STING und nicht an humanes STING, trotz der hohen Ähnlichkeit der beiden Proteine, bindet.^[116-117] Ein anderes Xanthenon-Derivat, α -Mangostin (**8**), konnte als Agonist für humanes STING bestätigt werden. Im Vergleich zum natürlichen Agonisten 2',3'-cGAMP handelt es sich bei α -Mangostin jedoch um einen langsam wirkenden Agonisten mit geringerer Potenz.^[118] Ein

paar Agonisten (**9-11**, Abbildung 8) mit bemerkenswerter Bindungsaffinität zu humanem STING wurden von *Ramanjulu et al.* entwickelt. Es ist hervorzuheben, dass manche Vertreter dieser Amidobenzimidazol (ABZI)-basierten Agonisten wie **10** ($k_D^{STING} = 1.6 \text{ nM}$) sogar die Bindungsaffinität von 2',3'-cGAMP übertreffen.^[119]

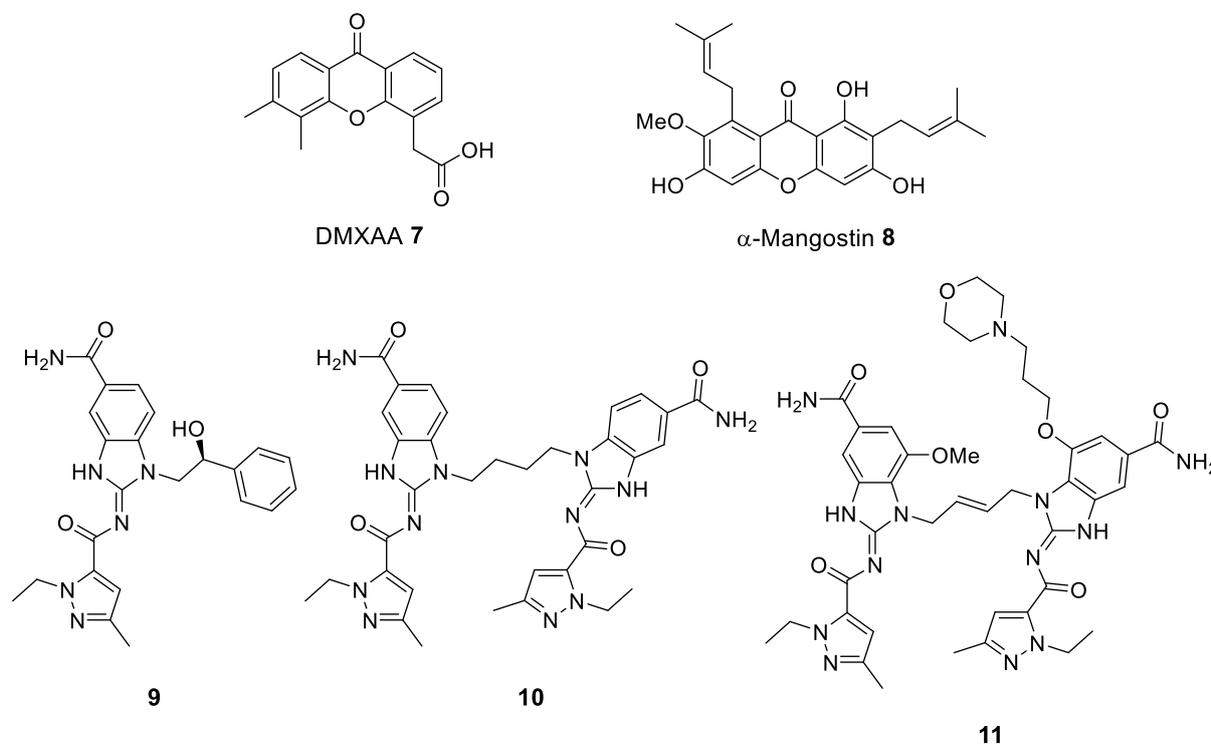


Abbildung 8: Chemische Strukturen einer Auswahl von STING Agonisten der Kategorie *small molecules*.

Für die Evaluierung von Agonisten ist neben der Bindungsaffinität vor allem die halbmaximale effektive Konzentration (EC_{50}) von Interesse, da diese ein Maß für die Potenz der Verbindung bei extrazellulärer Applikation darstellt.^[120] Die Fähigkeit eines Moleküls die unpolare Lipiddoppelschicht von Zellen zu überwinden, um den cytosolischen Rezeptor zu binden, ist dabei von wesentlicher Bedeutung. Der diABZI-Agonist **11** wurde aus der Verbindung **10** entwickelt und mit 2',3'-cGAMP verglichen. Die dosisabhängige STING-Aktivierung und anschließende Sekretion von $IFN\beta$ war für diABZI **11** ($EC_{50} = 130 \text{ nM}$) mehr als 400-fach potenter als der natürliche STING-Agonist 2',3'-cGAMP ($EC_{50} = 53.9 \mu\text{M}$). Die Ursache für einen solch signifikanten Unterschied im EC_{50} -Wert liegt vor allem darin begründet, dass CDNs aufgrund der Phosphodiesterbindungen unter physiologischen Bedingungen zweifach negativ geladen und somit sehr polar sind, was in einer geringen Zellmembranpermeabilität resultiert.^[119] Die Verbesserung dieser pharmakologischen Eigenschaft hat schon früh beim Design und der Entwicklung von cGAMP-Analoga für therapeutische Anwendungen eine wesentliche Rolle gespielt.

Nukleosidanaloga von 2',3'-cGAMP haben den Vorteil, dass diese die strukturellen Eigenschaften des natürlichen Agonisten im Wesentlichen beibehalten. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Agonisten, welche meist nur durch *high-throughput screening* Methoden identifiziert werden können, sind vielversprechende cGAMP-Analoga durch rationales Design

leichter zugänglich. Von verschiedenen Firmen und Forschungsgruppen wurden zahlreiche Ansätze verfolgt um CDN-basierte STING Agonisten zu entwickeln, welche eine höhere Stabilität unter physiologischen Bedingungen und eine verbesserte Zellpermeabilität im Vergleich zu 2',3'-cGAMP aufweisen. Ein zentraler Aspekt war dabei bisher meist das Ersetzen der Phosphordiester-Einheiten durch biologisch robustere sowie weniger polare Motive. Einer der Vorreiter war hier das Unternehmen *Aduro Biotech*, welches in Kollaboration mit *Novartis* Phosphorothioat-Analoga wie 2',3'-cG^SA^SMP (**12**) und ADU-S100 (**13**) entwickelte (Abbildung 9).^[121-122] Die Substitution der Phosphate durch Phosphorothioate resultiert in ähnlichen Bindungsaffinitäten zu STING und einer im Vergleich zu 2',3'-cGAMP 10-fach gesteigerten Interferonantwort in THP-1 Monozyten.^[123] Die eingeführten Schwefelatome führen zu einer erhöhten Resistenz dieser CDN-Analoga gegenüber ENPP1 sowie zu verbesserter Zellmembranpermeabilität.^[50] Nach vielversprechenden präklinischen Studien am Mausmodell wurde der Agonist ADU-S100 auch in klinischen Studien bei wiederholten, intratumoralen Injektionen in feste Tumore oder maligne Lymphome getestet.^[122, 124-125] Des Weiteren wurde ADU-S100 in einer Kombinationstherapie mit dem anti-PD-1 mAb Spartalizumab beispielsweise bei triple-negativem Mammakarzinom, einer besonders aggressiven Variante von Brustkrebs, untersucht.^[126] Zwar wurde die Therapie als sicher befunden, jedoch konnten die klinische Studien nur geringfügige Antitumor-Aktivität aufzeigen und wurden im Jahr 2020 schließlich eingestellt (NCT03172936).^[127-128]

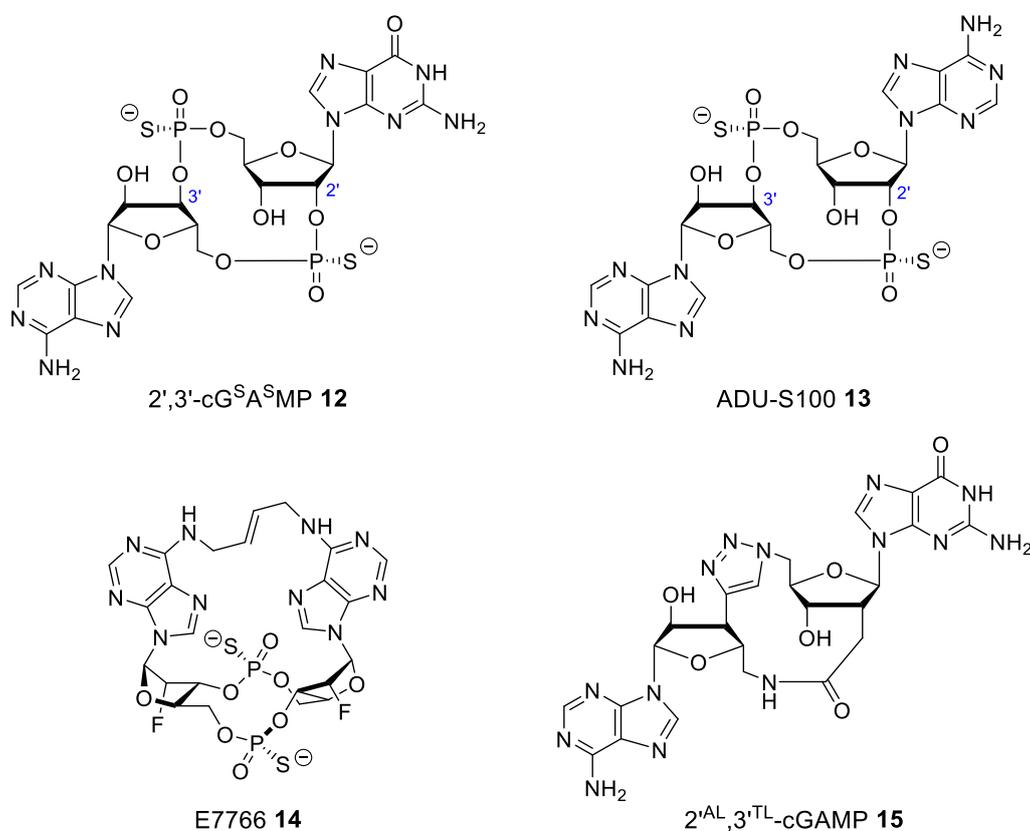


Abbildung 9: Chemische Strukturen einer Auswahl neutraler sowie Phosphorothioat-basierter cGAMP Analoga.

Trotz erster Rückschläge bei der Anwendung von CDN-Agonisten werden neuartige CDN-basierte Agonisten weiterhin untersucht und erreichen gelegentlich die klinischen Phase I Studien. Ein aktuelles Beispiel hierfür ist E7766 (**14**), welches ebenfalls durch intratumorale Injektion zum Einsatz kommen soll.^[127] Aufgrund seiner Makrozyklen-verbrückten Struktur ist das CDN starr in der bioaktiven Konformation eines CDN-Agonisten präorganisiert, was zu entropischen Vorteilen und einer pangenotypischen Aktivität führt.^[129] Auch für das von *Dialer et al.* beschriebene 2^{'AL},3^{'TL}-cGAMP (**15**) war aufgrund der Substitution der Phosphordiesterbrücken durch eine Amid- beziehungsweise Triazol-Verknüpfung eine starrere Struktur zu erwarten, die zugleich deutlich lipophiler und somit zellgängiger sein sollte.^[130] Detaillierte NMR-Studien konnten jedoch aufzeigen, dass in der bevorzugten Konformation die Heterozyklen vermutlich nicht parallel zueinander ausgerichtet sind, was im Konflikt mit der Konformation steht, die 2',3'-cGAMP für die Bindung an STING einnehmen muss.

Neben den soeben beschriebenen Hürden bei der Entwicklung von CDN-Agonisten für die Krebsimmuntherapie, stellt auch die Applikation in Form von intratumoraler Injektion eine nennenswerte Limitation dar. Das Design und die Entwicklung neuartiger CDN-Analoga, welche diese Problematik zu überwinden versuchen, sind wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit und werden an späterer Stelle diskutiert (siehe Kapitel 5.1). Die bereits in klinischen Verfahren befindlichen Ansätze der Krebsimmuntherapie wurden im Kapitel 3.1.3 aufgezeigt, stellen jedoch bisher nicht den klinischen Standard zur Behandlung von Krebs dar. Stattdessen finden aktuell noch überwiegend Chemotherapie, Bestrahlung und radikale Operation Anwendung.^[131] Die verschiedenen Krankheiten, die unter dem Begriff Blutkrebs zusammengefasst werden, stellen dabei eine besondere Herausforderung dar. Ein Beispiel ist die akute myeloische Leukämie (AML), die seit den 1970ern fast ausschließlich durch intensive Chemotherapie behandelt wird.^[132] Auf die Krankheit AML und bisherige Therapieansätze sowie aktuelle Entwicklungen wird im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen.

3.2 Akute myeloische Leukämie

Leukämie ist eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems, was sich in der abnormalen Entwicklung und Proliferation von Leukozyten während der Hämatopoese äußert.^[133] Der Prozess der Blutbildung findet im Knochenmark statt, wo hämatopoetische Stammzellen zunächst entweder zu myeloischen oder lymphoiden Vorläuferzellen (Blasten) heranreifen und anschließend in Erythrozyten, Leukozyten oder Thrombozyten differenzieren.^[134] Im Fall von AML teilen sich die Blasten ungebremst, entwickeln sich jedoch nicht zu funktionstüchtigen Blutkörperchen weiter und behindern die Bildung gesunder Blutzellen.^[135] Eine zentrale Kenngröße für die Diagnose von AML stellt der Anteil von Blasten im Knochenmark und peripheren Blut dar, der für AML-Patienten bei über 20% der Zellen liegt.^[136] AML ist mit einem Anteil von etwa 80% die am meisten verbreitete Art akuter Leukämie bei Erwachsenen und äußert sich durch unspezifische Symptome wie Fieber,

Müdigkeit, Gewichtsverlust und Appetitlosigkeit. Unbehandelt verläuft die Krankheit meist innerhalb von Wochen oder wenigen Monaten tödlich.^[137-138]

3.2.1 Zytostatika zur Behandlung von AML

Das Standardverfahren zur Behandlung von AML ist eine intensive Chemotherapie, die sich in die zwei Phasen der Induktions- und Konsolidierungstherapie unterteilt. Während der Induktionstherapie wird versucht mit verschiedenen Zytostatika das Wachstum der Leukämiezellen zu hemmen und durch Reduktion der Blasten im Knochenmark auf ein Level von unter 5% möglichst eine komplette Remission (*complete remission*, CR) zu erreichen. Üblicherweise werden hierfür die Topoisomerase II Inhibitoren Daunorubicin (**16**) oder Idarubicin (**17**) über drei Tage in Kombination mit einer siebentägigen Infusion des Cytidin-Isomers Cytarabin (**18**) eingesetzt (Abbildung 10).^[132, 139]

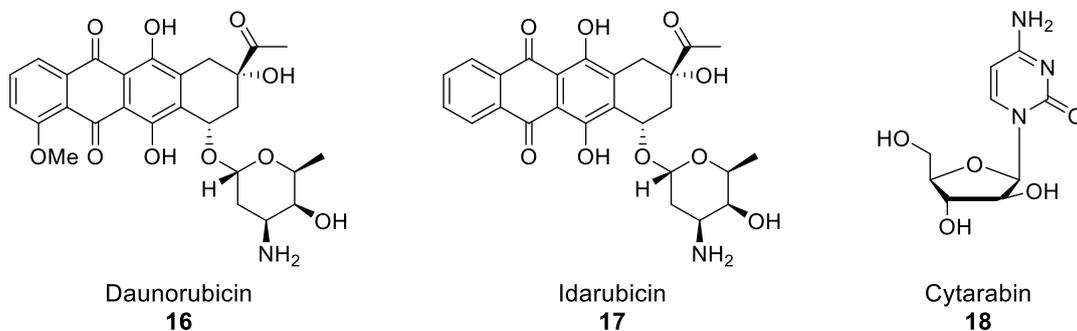


Abbildung 10: Chemische Strukturen der in der Phase der Induktionstherapie zur Behandlung von AML zum Einsatz kommenden Zytostatika.

Abhängig vom Alter des Patienten führt diese Chemotherapie für unter Sechzigjährige bei 65%-73% zu einer CR, wohingegen bei Patienten älter als 60 Jahre die Erfolgschancen nur zwischen 38% und 62% liegen.^[140-142] Wenn eine CR erreicht wurde, beginnt üblicherweise die Phase der Konsolidierungstherapie, da ohne weitere Behandlung alle AML Patienten innerhalb weniger Wochen oder Monate einen Rückfall erleiden.^[143] Die Konsolidierungstherapie besteht im Wesentlichen aus sich wiederholenden, hochdosierten Cytarabin-Infusionen, die umgehend nach Erholung des Patienten von der besonders strapaziösen Induktionstherapie beginnt.^[144-145]

3.2.2 Hypomethylierende Cytidin-Analoga

Der Median für das Alter der Diagnose von AML liegt bei etwa 70 Jahren.^[146] Für die meisten AML Patienten sind demnach die Aussichten auf Heilung durch intensive Chemotherapie wenig vielversprechend und zugleich werden die Strapazen der Therapie nur bedingt verkraftet. Als etwas verträglichere Alternativen kommen die Cytidin-Analoga 5-Azacytidin (**19**, AzaC) oder 5-Aza-2'-deoxycytidin (**20**, AzadC, Decitabin) zum Einsatz (Abbildung 11). Diese beiden Medikamente wurden ursprünglich in den 1960ern als

Alternativen zu Cytarabin entwickelt und erst später deren inhibierende Wirkung auf DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und somit die Fähigkeit epigenetische Veränderungen zu bewirken, erkannt.^[147-148]

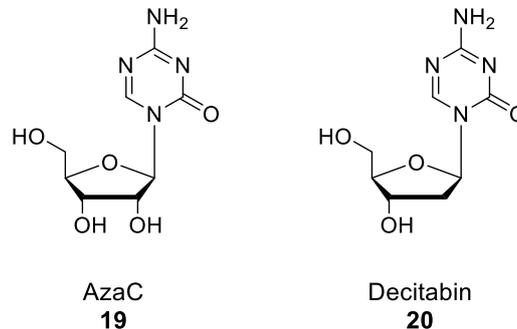


Abbildung 11: Chemische Strukturen der hypomethylierend wirkenden Cytidin-Analoga 5-Azacytidin (**19**) und Decitabin (**20**).

Erste Hinweise darauf, dass die Level von DNA-Methylierung in Verbindung mit Krebs stehen, gingen aus Studien in den 1980ern hervor. Dabei wurde festgestellt, dass die epigenetische Modifikation 5-Methyl-2'-deoxycytidin (mdC) in Tumorzellen seltener vorkommt als in normalen Zellen.^[149-150] Im Kontrast dazu wurde ein Jahrzehnt später ersichtlich, dass trotz niedrigerer Gesamtlevel eine abnormal hohe Methylierung von CpG-Inseln ein wesentliches Phänomen während der Tumorentwicklung ist.^[151-152] Neben Mutation stellt das resultierende *Silencing* von Genen durch Methylierung der CpG-Inseln in Promotoren die Hauptursache für den Verlust der Funktion von Tumorsuppressor-Genen dar.^[153] Der globale, hypomethylierende Effekt von Decitabin und 5-Azacytidin durch Inhibierung der DNMTs resultiert in der Reaktivierung von Genen, inklusive dieser der Tumorsuppression.^[147] Therapieansätze mit diesen hypomethylierenden Medikamenten führen nur in 15% bis 20% der Fälle zu einer CR, zeigen jedoch bei Patienten im Alter von über 65 Jahren vergleichbare Überlebensraten wie die Chemotherapie. Als Konsequenz hat sich inzwischen die Behandlung von älteren AML Patienten, für die keine intensive Chemotherapie in Frage kommt, mit AzaC oder AzadC als klinischer Standard etabliert.^[154]

Wie bereits erwähnt, agieren beide Cytidin-Analoga mechanistisch betrachtet als DNMT-Inhibitoren. Um die inhibierende Wirkung zu erzielen, müssen AzaC oder AzadC intrazellulär zunächst in die entsprechende Triphosphate (AzaCTP und AzadCTP) umgesetzt werden. Als solche stehen diese Pyrimidin-Analoga in Konkurrenz zu Cytidintriphosphat während der Replikation für den Einbau in die neusynthetisierten DNA-Stränge zur Verfügung (Abbildung 12A).^[155-156] Dementsprechend sind beide Medikamente auf die S-Phase des Zellzyklus angewiesen und somit für das *Targeting* von proliferierenden Zellen geeignet.^[157] Als wesentlicher Unterschied von AzaC und AzadC ist zu erwähnen, dass AzaC zellzyklusunabhängig auch in RNA eingebaut werden kann. Die klinische Relevanz dieser Eigenschaft ist jedoch nicht eindeutig geklärt.^[158]

Nach Einbau der Aza-Cytidinderivate ins Genom erfolgt die Methylierung durch DNMTs, insbesondere durch DNMT1 in Folge von Erkennung hemimethylierter Sequenzen und Übertragung der Methylierungsmuster auf den Tochterstrang. Hierbei kommt es in der

aktiven Tasche des Enzyms zunächst zu einem nukleophilen Angriff eines Thiols an der C6 Position der Nukleobase. Das resultierende Intermediat wird an der Position 5 mithilfe des Cofaktors S-Adenosylmethionin (SAM) methyliert. Im Gegensatz zu Methylcytosin kann die anschließende β -Eliminierung aufgrund des zusätzlichen N-Atoms im Heterozyklus nicht stattfinden, wodurch DNMT kovalent und irreversibel an die mit AzaC oder AzadC modifizierte DNA gebunden wird (Abbildung 12B).^[159-160] Die so inhibierten DNMTs stehen nicht mehr für die Methylierung von Cytidin zu Verfügung und im Zuge aufeinanderfolgender Replikationen führt dies zu fortschreitender Hypomethylierung.^[155-156]

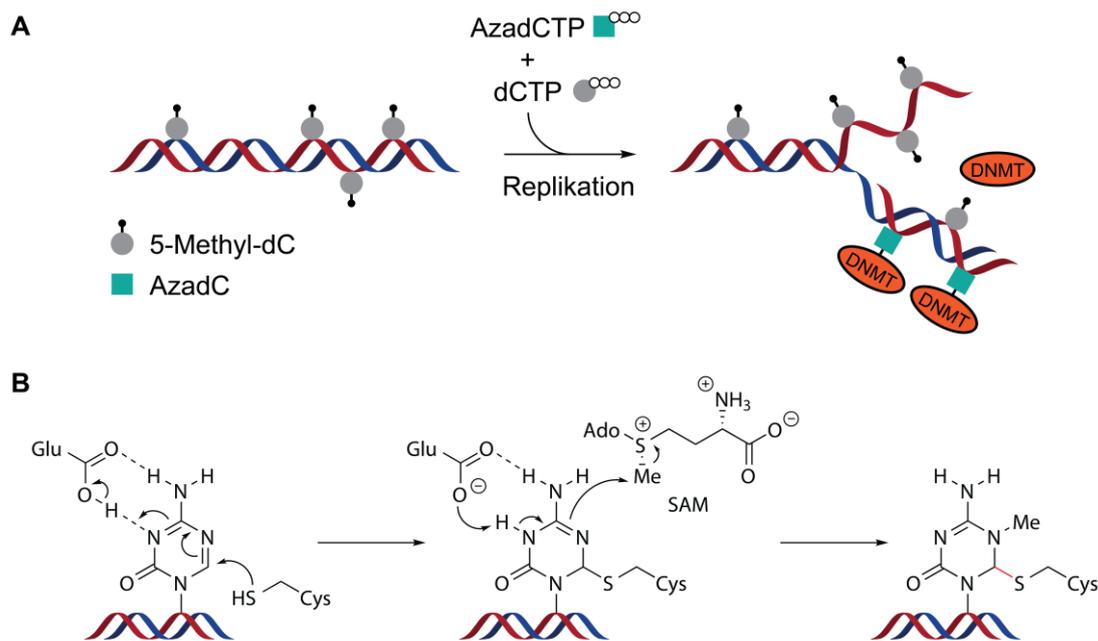


Abbildung 12: **A)** Wirkmechanismus der hypomethylierenden Cytidin-Analoga. **B)** Mechanismus der Methylierung von in DNA inkorporiertem Decitabin und daraus resultierende irreversible Hemmung von DNMTs. Die in Rot gezeigte Bindung kann aufgrund des N-Atoms in 5-Position nicht durch β -Eliminierung gespalten werden.

Neben der resultierenden Hypomethylierung führen eingebaute AzaC- und AzadC-Bausteine zu DNA Schäden, die vor allem bei hoher Dosierung dieser Medikamente zu beobachten sind. Die aktuellen Administrationsschemata mit relativ geringer Dosis versuchen eine ausreichende Hypomethylierung bei zeitgleich möglichst geringer Zytotoxizität zu erreichen.^[161] Dennoch sind Nebenwirkungen wie zum Beispiel Neutropenie und Thrombozytopenie als Folge von Myelosuppression häufig.^[162-163] Myelosuppression äußert sich in der teilweisen oder sogar vollständigen Inhibierung der Knochenmarksaktivität, was zu einer verringerten Blutzellenproduktion führt. Ursache hierfür ist die toxische Wirkung auf hämatopoetische Stammzellen. Dieses Problem erzeugt damit eine der häufigsten Nebenwirkungen von zytotoxischen Chemotherapeutika oder anderen Krebsmedikationen, deren Wirkmechanismus auf die Schädigung von DNA oder Inhibierung der Replikation von unkontrolliert proliferierenden Zellen abzielt.^[164] Im Fall von Decitabin ist zu vermuten, dass die Toxizität der Substanz auch aus der hydrolytischen Instabilität dieses Wirkstoffs resultiert. Das Triazin des Decitabins ist sehr elektronenarm und kann in wässriger Umgebung an der C6

Position nukleophil von Wasser angegriffen werden, was den schrittweisen Zerfall des Heterozyklus zur Folge hat und letztendlich in abasischen Stellen resultiert (Abbildung 13A). Dieser Abbau wurde mit unterschiedlichsten Analysemethoden bei verschiedenen pH-Werten, Pufferbedingungen und Temperaturen nachgewiesen.^[165-168]

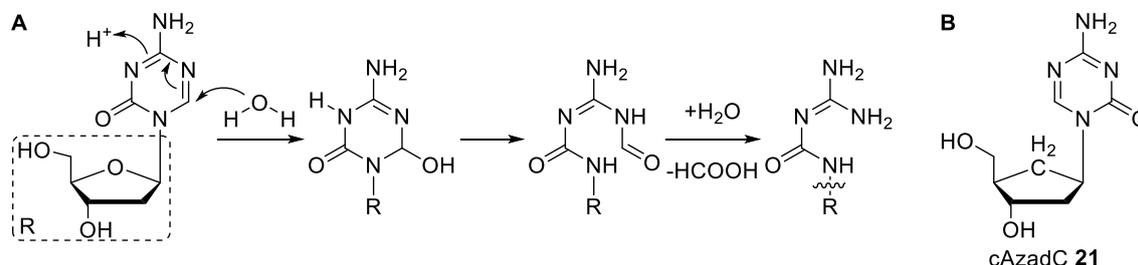


Abbildung 13: **A)** Mechanismus des hydrolytischen Abbaus von Decitabin. **B)** Chemische Struktur der carbozyklischen Variante des Decitabins (cAzadC, **21**).

Trotz der verbesserten Verträglichkeit von Behandlungen mit Decitabin gegenüber der Standard-Chemotherapie, sind auch die Nebenwirkungen dieses Therapieansatzes nicht zu vernachlässigen. Etwa 80% aller über 65-jährigen AML Patienten versterben mit einer nur zwei bis acht Monate langen medianen Gesamtüberlebenszeit.^[169-170] Es besteht demzufolge weiterhin großes Interesse an der Verbesserung von Medikamenten und neuen Therapieansätzen zur Behandlung von AML.

Im Jahr 2019 publizierte die Gruppe von *Prof. Dr. Carell* die Synthese sowie die biologische Evaluierung einer carbozyklischen Variante des Decitabins (cAzadC, **21**), welches eine signifikant verbesserte Stabilität in wässrigen Puffern aufweist.^[171] Dabei wurde der endozyklische Sauerstoff im Ribosebaustein durch eine CH_2 Gruppe ersetzt (Abbildung 13B). Der dadurch verringerte Elektronenabzug resultiert in einer Stabilisierung des Triazin-Rings und erschwert den nukleophilen Angriff auf die C6 Position. Als Konsequenz zeigt cAzadC (**21**) im Gegensatz zu Decitabin (**20**) über einen Zeitraum von 14 Tagen keine Zersetzung bei unterschiedlichen pH-Werten im wässrigem Milieu. Trotz dieser Veränderungen der Reaktivität des Heterozyklus konnte weiterhin der Einbau in die DNA und die Reduktion der mdC-Level in embryonalen Stammzellen der Maus (mESC) und somit die gewünschte biologische Aktivität nachgewiesen werden. Die Reduktion der mdC-Level war mit den Beobachtungen für Decitabin (**20**) vergleichbar, allerdings waren für cAzadC (**21**) höhere Konzentrationen (etwa fünffach) und längere Inkubationszeiten erforderlich. Als Ursache für diese Beobachtung wird die potentiell langsamere Umsetzung des cAzadCs in das entsprechende Triphosphat (cAzadCTP) vermutet. Bisher unveröffentlichte Arbeiten deuten auf eine bemerkenswerte Hypomethylierung bei gleichzeitig starker Verringerung von Nebenwirkungen hin. Das cAzadC stellt somit einen vielversprechenden Kandidaten für ein epigenetisch aktives Arzneimittel dar. Die Herstellung von cAzadC ist jedoch synthetisch aufwendig und die benötigte höhere Dosierung nicht ideal. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sogenannte *Prodrug*-Konzepte verfolgt um die Bioverfügbarkeit und pharmakokinetischen Eigenschaften weiter zu verbessern (siehe Kapitel 5.2). Das allgemeine Konzept von *Prodrugs* sowie vereinzelte Beispiele werden in nachfolgendem Kapitel näher erläutert.

3.3 Prodrug-Konzept

Nukleotid-Analoga besitzen hohes therapeutisches Potential für eine Vielzahl von Erkrankungen. Für die Entfaltung der biologischen Aktivität ist es allerdings notwendig, dass diese Moleküle ins Zellinnere gelangen. Eine der größten Herausforderungen ist dabei, dass die aktive Form meist das entsprechende Triphosphat ist und solch polare, negativ geladene Moleküle eine äußerst geringe Zellmembranpermeabilität aufweisen. Häufig werden daher die modifizierten Nucleoside ohne Phosphatgruppen verwendet, welche anschließend intrazellulär durch Kinasen mono-, di- und anschließend triphosphoryliert werden. Diese Strategie scheitert jedoch oft daran, dass der erste Phosphorylierungsschritt für modifizierte Nucleoside nur langsam oder gar nicht stattfindet.^[172-173]

Eine gängige Strategie zur Lösung dieses Problems ist das *Prodrug*-Konzept. Hierbei werden chemisch modifizierte Nucleosidmonophosphate (NMPs) anstatt der freien Nucleoside verwendet.^[174-175] Die maskierenden, chemischen Gruppen verleihen dem Molekül die nötige Lipophilie für verbesserte Membranpermeabilität. Die Gruppen werden anschließend intrazellulär durch enzymatische oder chemische Reaktionen abgespalten. Das resultierende Monophosphat kann dann von Kinasen in das biologisch aktive Triphosphat umgesetzt werden. Demnach handelt es sich bei einem chemisch modifizierten NMP um eine Vorläuferverbindung des therapeutisch aktiven Moleküls (*Prodrug*).^[176-177]

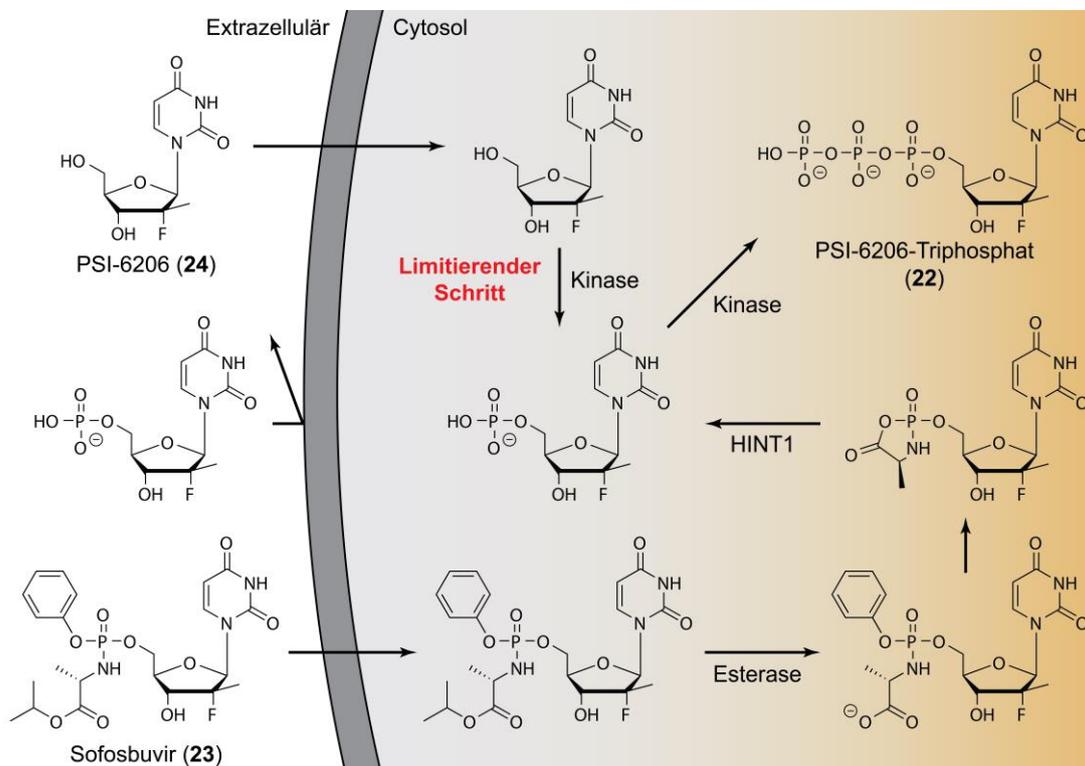


Abbildung 14: Illustration des Wirkprinzips von *Prodrugs* am Beispiel des antiviral wirkenden Sofosbuvirs. Der erste Phosphorylierungsschritt stellt den limitierenden Schritt dar und verhindert im Fall von Nucleosid PSI-6206 (24), dass dieses intrazellulär zum biologisch aktiven Triphosphat (22) umgesetzt wird.

Ein besonders prominentes Beispiel im Bereich der Nukleotid-Prodrugs ist das antiviral aktive Triphosphat des Nucleosids PSI-6206 (**22**), dessen *Prodrug* als Sofosbuvir (**23**) bekannt ist (Abbildung 14). PSI-6206 (**24**) selbst wird von keiner Kinase als Substrat erkannt und zeigt dementsprechend keine biologische Aktivität.^[178] Das *Prodrug* Sofosbuvir hingegen, das nach initialer, enzymkatalysierter Esterhydrolyse spontane chemische Reaktionen sowie eine weitere enzymatische Spaltung durch eine Monophosphoramidase (z.B. HINT1) durchläuft, wird mit einem Heilungserfolg von etwa 90% gegen chronische Hepatitis C eingesetzt.^[179] Das in Sofosbuvir Anwendung findende *Prodrug*-Motiv eines Aryloxyphosphoramidats wurde entscheidend von *McGuigan et al.* entwickelt und ist als *ProTide* bekannt.^[180-181] Aufgrund der relativ einfachen Herstellung und der Fähigkeit wie zum Beispiel bei Sofosbuvir, die biologische Aktivität von Nucleosid-Analoga aufzudecken, ist es derzeit eines der am häufigsten verwendeten *Prodrug*-Motive.^[174, 182] Weitere bekannte Vertreter sind zum Beispiel Tenofovir Alafenamid (**25**) gegen chronische Hepatitis B^[183] und das virostatisch wirkende Remdesivir (**26**), welches ursprünglich gegen Ebolafieber entwickelt wurde und während der weltweiten Corona-Pandemie Sonderzulassungen für die Behandlung der durch SARS-CoV-2 verursachten Krankheit COVID-19 erhielt (Abbildung 15).^[184-185] Ein Zusatznutzen von Remdesivir bei COVID-19 ist bisher jedoch umstritten.^[186-188]

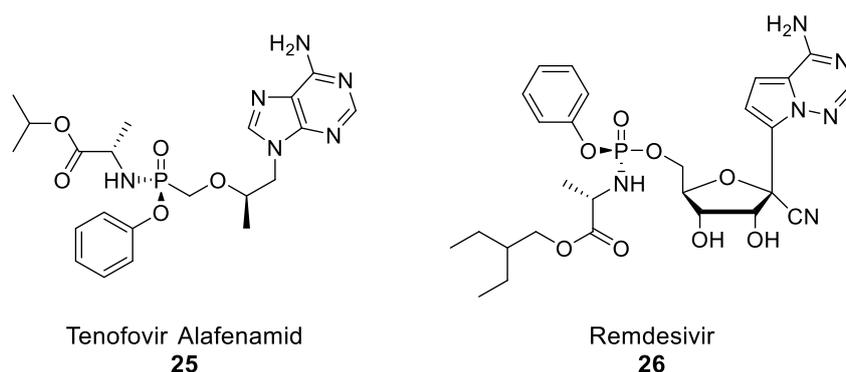


Abbildung 15: Chemische Strukturen bekannter Vertreter der *ProTides* mit den entsprechenden Aryloxyphosphoramidat-Motiven.

Neben den *ProTides* gehören die Cyclosaligenyl (*cycloSal*) Phosphat *Prodrugs* zu den am besten untersuchten Nucleosidmonophosphat-*Prodrugs*. Eine Besonderheit dieses Konzepts ist, dass es keine enzymatische Aktivierung benötigt und ausschließlich durch pH-abhängige, chemische Hydrolyse zur Freisetzung des Monophosphats kommt (Abbildung 16).^[189-190]

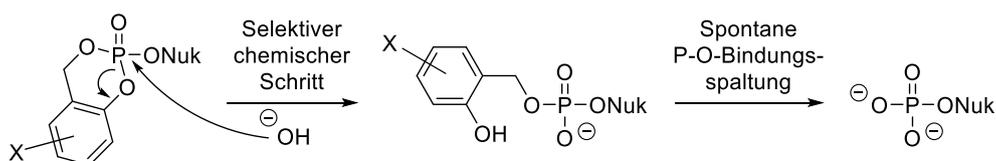


Abbildung 16: Mechanismus der Freisetzung eines Nucleosidmonophosphats aus einem *CycloSal*-*Prodrug*.

Für *ProTides* und *CycloSal-Prodrugs* existieren aufgrund der Chiralität am Phosphoratom dieser Verbindungen zwei Diastereomere (R_P und S_P). Es hat sich gezeigt, dass die R_P und S_P Diastereomere dieser *Prodrugs* teils sehr unterschiedliche biologische Aktivitäten und Potenzen aufweisen können.^[191-192] Demzufolge sind häufig herausfordernde Trennungen der Diastereomere mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) notwendig. Diese lassen sich nicht immer realisieren. Um dieses Problem zu lösen, wurden asymmetrische Synthesen mit hoher Diastereoselektivität, beispielsweise unter Verwendung von chiralen Auxiliaren, entwickelt.^[192-195]

Bei anderen *Prodrug*-Motiven, die auf zwei identischen Resten basieren, handelt es sich um achirale Verbindungen. Motive hierfür sind unter anderem *S*-Acyl-2-thioethyl (SATE) und Carbonyloxymethyl-basierte Strukturen wie Pivaloyloxymethyl (POM) und Isopropylloxycarbonyloxymethyl (POC). Diese *Prodrugs* werden allesamt intrazellulär durch Esterasen gespalten und das erhaltene Intermediat zerfällt anschließend unter physiologischen Bedingungen um das Monophosphat freizusetzen (Abbildung 17).^[174] Ein Nachteil dieser durch Esterasen gespaltenen Prodrug-Motive ist, dass es zur Bildung potentiell toxischer Abspaltungsprodukte kommt.^[196] Im Fall von POM und POC handelt es sich um Formaldehyd.^[197] Bei der Spaltung des SATE-Motivs entsteht Ethylensulfid.^[198-199] Entsprechend wurde vereinzelt für bis(SATE)-*Prodrugs* bei verbesserter Wirkstoffpotenz zugleich eine erhöhte Toxizität dieser *Prodrugs* gegenüber dem freien Nukleosid festgestellt.^[200]

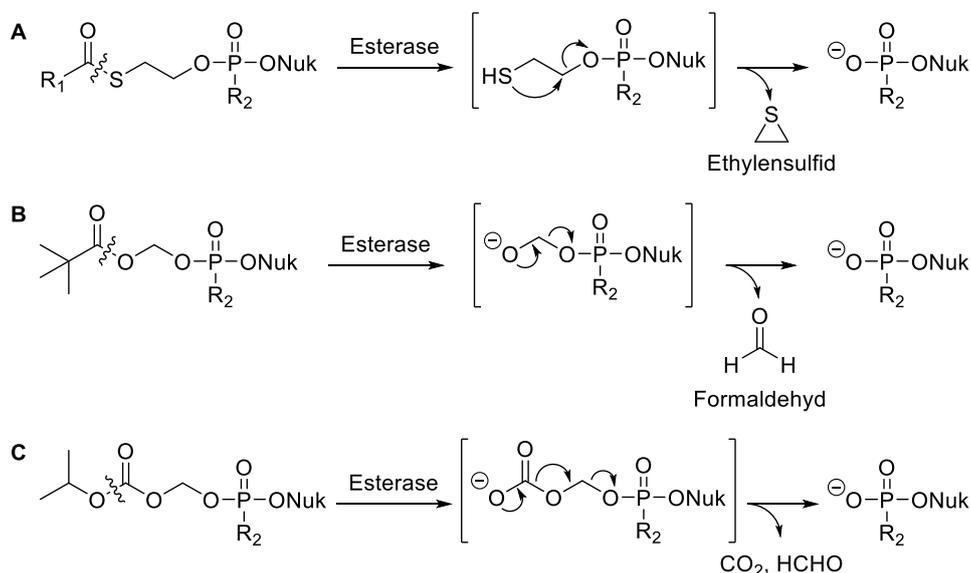


Abbildung 17: Esterase-basierte Aktivierung von *Prodrugs* basierend auf Motiven wie **A)** SATE, **B)** POM und **C)** POC.

Der Aufbau der zuletzt beschriebenen Motive erlaubt es auch Phosphordiester zu maskieren. Im Jahr 2021 wurde erstmals die Synthese sowie umfangreiche biologische Evaluierung eines CDN-*Prodrugs* für die Aktivierung von STING beschrieben (Abbildung 18). Das POM-modifizierte CDN (**27**) wies dabei eine 1000-fach verbesserte Potenz in einem auf

HEK293T-Zellen basierten Assay gegenüber dem freien CDN auf, was auf die gesteigerte Zellpermeabilität zurückzuführen ist.^[201]

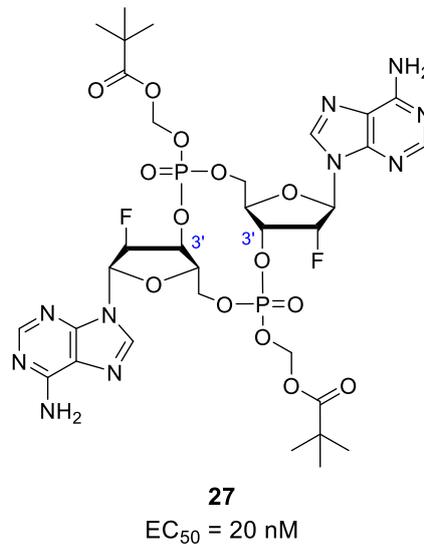


Abbildung 18: Chemische Struktur des CDN-Prodrugs von Pimková et al.^[201]

Neben der Verbesserung der Fähigkeit von Wirkstoffen lipophile Zellmembranen zu überwinden und deren Bioverfügbarkeit zu erhöhen, findet das *Prodrug*-Konzept auch zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit Anwendung. Diese Anforderung ist nur selten für modifizierte Nucleoside oder Nucleotide von Bedeutung, jedoch für zahlreiche andere Arzneistoffklassen von Relevanz.^[202-205]

Darüber hinaus lässt sich das *Prodrug*-Konzept für die Entwicklung von Strategien für zielgerichtetes *Drug Delivery* verwenden um unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren.^[206] Im Zusammenhang mit *Drug Delivery* ist im Bereich der Nucleotid-Prodrugs vor allem das *HepDirect*-Motiv zu nennen. Der Spaltungsmechanismus dieser Aryl-substituierten 1,3-Propanylester basiert auf der von Cytochrom-P450 katalysierten, oxidativen Reaktion in der Leber und erlaubt so die spezifische Freisetzung des Wirkstoffs in einem bestimmten Organ.^[207-208]

Der Mechanismus des zielgerichteten *Drug Delivery* basiert wie im soeben genannten Beispiel häufig auf den unterschiedlichen Expressionsleveln bestimmter Enzyme und Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen beziehungsweise deren Oberflächen. An Bedeutung gewinnende Ansätze der Medizin, welche eine zielgerichtete Wirkstofffreisetzung unabhängig vom Gewebeproteom ermöglichen, stammen beispielsweise aus dem Feld der Photopharmakologie.^[209-210] Hier wird unter anderem versucht durch Maskierung der biologisch aktiven Substanzen mit Schutzgruppen, die sich durch Licht abspalten lassen, eine räumliche sowie zeitliche Kontrolle über die Freisetzung des Wirkstoffs zu erreichen.^[211-212]

4 Zielsetzung

Agonisten des STING-Rezeptors stellen aufgrund der Fähigkeit das angeborene Immunsystem stimulieren zu können einen bedeutenden Gegenstand aktueller Forschung im Bereich der Krebsimmuntherapie dar. Die therapeutische Anwendung des Naturstoffs 2',3'-cGAMPs (**1**) selbst gestaltet sich unter anderem aufgrund der geringen Permeation von Zellmembranen, die aus der unter physiologischen Bedingungen vorherrschenden zweifach negativen Ladung resultiert, als schwierig.^[213] Darüber hinaus können, wie in der Einleitung erwähnt, natürliche Phosphordiesterbindungen von zyklischen Dinukleotiden von einem humanen Enzym extrazellulär hydrolysiert werden. Da des Weiteren die Überaktivierung der cGAS-STING-Kaskade unerwünschte Nebenwirkungen wie Entzündungen und autoimmune Reaktionen für gesundes Gewebe birgt, ist die Etablierung von Mechanismen für zielgerichtetes *Drug Delivery* erstrebenswert. Aus den genannten Gründen sind Moleküle gesucht, die weiterhin STING aktivieren, aber verbesserte chemische und biochemische Eigenschaften aufweisen und idealerweise eine zielgerichtete oder gar zelltyp-spezifische Aktivierung der Immunantwort erlauben.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten im ersten Teil der Arbeit cGAMP Analoga entwickelt und durch organische Synthese zugänglich gemacht werden, welche eine zielgerichtete Anreicherung und Freisetzung eines biologisch aktiven CDNs und somit die Aktivierung von STING und dessen Signalkaskade ermöglichen. Das generelle Konzept einer Maskierung von negativen Ladungen der Phosphat-Gruppe wie es für Mononukleotid-*Prodrugs* breite Anwendung findet, ist auch für die Modifikation zyklischer Dinukleotide interessant. Durch die Verknüpfung der Phosphate mit biologisch spaltbaren Gruppen, sollte die Fähigkeit lipophile Zellmembranen zu durchdringen, gesteigert werden. Mit der Verwendung von Linkern, die durch Click-Chemie modifizierbar sind, wurde eine weiterführende Funktionalisierung der Analoga angestrebt, die eine möglichst zelltyp-spezifische Aufnahme ermöglichen soll. Eine der verfolgten Strategien stellte dabei ein Antikörper vermitteltes *Drug Delivery* dar, aber auch die räumlich und zeitlich kontrollierbare Freisetzung eines biologisch aktiven CDNs durch Bestrahlung war von Interesse. Des Weiteren sollte ein strukturell zu natürlichem cGAMP möglichst ähnliches, jedoch fluoreszierendes cGAMP Analog durch organische Synthese zugänglich gemacht werden und dessen Eignung für die Anwendung in der Mikroskopie untersucht werden.

Die Krebsimmuntherapie und deren etablierte Methoden wie beispielsweise die Verwendung von monoklonalen Antikörpern und Immun-Checkpoint-Inhibitoren erlangen derzeit für die klinische Anwendung zunehmend Bedeutung. Allerdings stellen diese noch nicht einen etablierten Behandlungsstandard dar.^[131] Stattdessen kommen häufig Resektion, Chemo- und Strahlentherapie für die Behandlung von Krebs zum Einsatz. Die in der Chemotherapie verwendeten Zytostatika gehen häufig mit schweren Nebenwirkungen einher, was letztlich

darin begründet liegt, dass der Wirkmechanismus dieser Arzneimittel auf der unspezifischen Tötung von sich schnell teilenden Zellen beruht und dabei auch proliferierende, gesunde Zellen zerstört. Wie in der Einleitung beschrieben, ist im Fall des Medikaments Decitabin die Spezifität ebenfalls auf die Proliferation von Zellen beschränkt. Jedoch ist davon auszugehen, dass hier für die teils schweren Nebenwirkungen die geringe Stabilität gegenüber Hydrolyse von entscheidender Bedeutung ist. Das von *Wildenhof et al.* beschriebene carbozyklische Derivat weist eine deutlich verbesserte Stabilität in wässriger Umgebung auf. Beim Einbau ins Genom sowie der beobachteten Hypomethylierung als Folge der DNMT-Inhibierung wurde festgestellt, dass höhere Konzentrationen von cAzadC im Vergleich zu Decitabin benötigt wurden um vergleichbare Effekte zu erzielen, was eine langsamere Umsetzung zum biologisch aktiven Triphosphat im Falle des carbozyklischen Derivats vermuten ließ.^[171]

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten *Prodrugs* des cAzadC-Monophosphats (cAzadCMPs) entwickelt und synthetisch zugänglich gemacht werden um den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Monophosphorylierung zu umgehen und die Bioverfügbarkeit des biologisch aktiven cAzadCTP in den Zellen zu erhöhen. Hierfür sollten gängige *Prodrug*-Motive wie *ProTide* und *CycloSal* zur Anwendung kommen. Basierend auf der synthetischen Zugänglichkeit solcher cAzadCMP *Prodrugs*, sollten deren Wirkung auf die mdC Level von vorrangig Leukämie Krebszelllinien, aber auch Leber- und Lungenkrebszellen *in vitro* getestet werden.

5 Resultate und Diskussion

5.1 cGAMP Analoga

5.1.1 Biologisch aktive zyklische Dinucleotide

Viele der bekannten zyklischen Dinucleotide humanen, bakteriellen sowie synthetisch modifizierten Ursprungs wurden in Bezug auf deren Bindungsaffinität an STING und deren Fähigkeit, eine Immunantwort in Form einer Interferon Expression zu generieren, bereits getestet.^[111] Im Zuge dieser Arbeit waren insbesondere natürliches 2',3'-cGAMP (**1**) sowie das synthetische Analog 2',3'-c-di-AMP (**28**) als wichtige Referenzverbindungen in biologischen und biochemischen Assays von Bedeutung. Darüber hinaus war 2',3'-dideoxy-c-di-AMP (2',3'-dd-c-di-AMP, **29**) eine essentielle Vergleichssubstanz, welche sich in einer vorangegangenen Doktorarbeit von *Dr. Samuele Stazzoni* als vielversprechender Kandidat und Grundbaustein *Prodrug*-modifizierter CDNs herauskristallisierte (Abbildung 19).^[214]

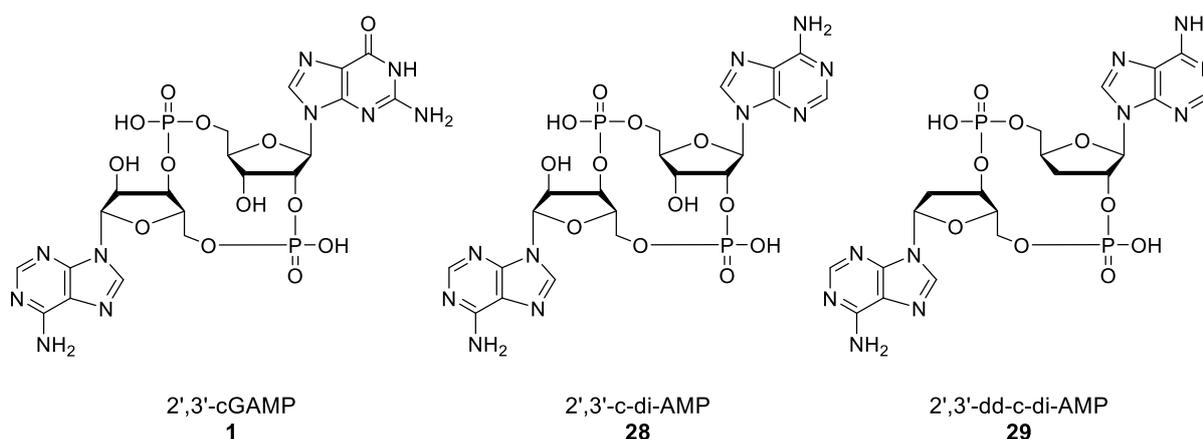
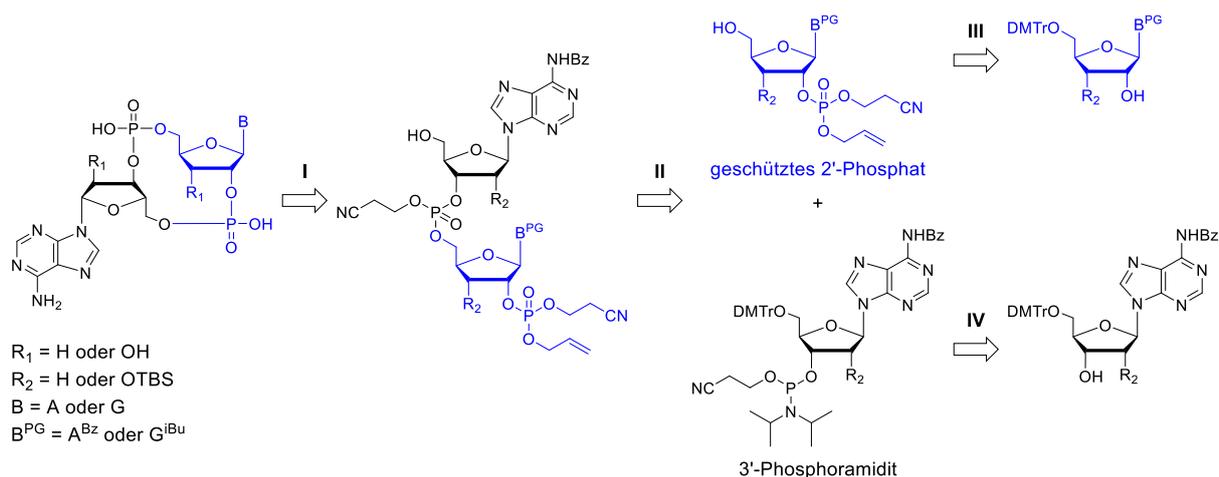


Abbildung 19: Chemische Strukturen von 2',3'-cGAMP (**1**) sowie der entwickelten CDN-Analoga.

Wie natürliches 2',3'-cGAMP weisen die CDNs **28** und **29** die nicht kanonische 2'-5'-Phosphordiesterbindung auf, die für die außerordentlich hohe Bindungsaffinität von 2',3'-cGAMP an das STING-Protein von zentraler Bedeutung ist. Das synthetische 2',3'-Derivat (**28**) des bakteriellen 3',3'-c-di-AMP stellt eine durch Austausch der Base Guanin zu Adenin erhaltene Modifikation zu 2',3'-cGAMP dar. Neben der Abwandlung der Base zu Adenin, setzt sich 2',3'-dd-c-di-AMP (**29**) aus einem DNA-Nucleosid sowie einem 3'-Deoxynucleosid zusammen. Diese Modifikation der Riboseeinheiten war besonders im Hinblick auf die Synthese *Prodrug*-maskierter cGAMP-Analoga interessant. Über die Hintergründe, warum besonders die strukturelle Vereinfachung durch vollständige Entfernung der 2'- und 3'-OH Gruppen für die Überwindung synthetischer Herausforderungen von *Prodrugs* der cGAMP-Analoga geeignet war, gibt die vorliegende Arbeit an späterer Stelle Aufschluss (siehe Kapitel 5.1.4).

Aufgrund der zu erwartenden, großen Verbrauchsmengen der Referenzverbindungen 2',3'-cGAMP (**1**) und 2',3'-c-di-AMP (**28**) in biologischen und biochemischen Assays, war ein erstes Ziel dieser Arbeit die Etablierung von ertragreichen Synthesewegen dieser beiden

Verbindungen (z.B. 100 mg Maßstab für 2',3'-cGAMP). Da es sich um kostspielige, jedoch kommerziell erhältliche Substanzen handelt, wird deren Synthese hier nur retrosynthetisch diskutiert (Schema 1) und für detaillierte Synthesevorschriften an eine andere Stelle dieser Arbeit verwiesen (siehe Kapitel 6.4). Die gezeigte Retrosynthese basierend auf Phosphoramidit- und Phosphat-Chemie beschreibt neben dem synthetischen Zugang zu 2',3'-cGAMP (**1**) und 2',3'-c-di-AMP (**28**) auch die von *Dr. Samuele Stazzoni* bereitgestellte Verbindung **29**.



Schema 1: Retrosynthetische Analyse für den synthetischen Zugang zu cGAMP-Analoga. **I)** Allyl Entschützung, Zyklisierung und finale Entschützung, **II)** Lineare Kupplung, Oxidation und DMTr Entschützung, **III)** Phosphortriester-Synthese mit Schutzgruppen und DMTr Entschützung, **IV)** Phosphoramidit Synthese.

Die gezeigte Retrosynthese wurde nach einer Vielzahl von Testreaktionen und Optimierungen standardmäßig für die Synthese von CDNs ohne *Prodrug*-Motiv angewendet, da diese reproduzierbar sowohl die ertragreiche und saubere Isolation von Zwischenstufen, als auch effiziente Aufreinigung der finalen Produkte ermöglichte. Die gängigste Alternative über *H*-Phosphonat-Chemie wurde aufgrund der schnelleren Durchführbarkeit untersucht, jedoch aufgrund niedrigerer Ausbeuten und schwieriger Aufreinigungen nicht weiterverfolgt.

Für die Synthese wurden zwei in geeigneter Weise mit Schutzgruppen versehene Nucleoside als Ausgangssubstanzen verwendet und in ein geschütztes 2'-Phosphat beziehungsweise ein 3'-Phosphoramidit überführt. Nach Kupplung dieser beiden Vorläuferverbindungen zu geschützten, linearen Dinucleotiden, konnten diese im Anschluss an selektive Entfernung einer Schutzgruppe am Phosphat mittels P(V)-Chemie zyklisiert werden. Nach Abspaltung aller Schutzgruppen der erhaltenen, zyklischen Zwischenprodukte und Aufreinigung durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden cGAMP und die designten Analoga in hoher Reinheit erhalten.

Um die Bindungseigenschaften der synthetisierten CDNs zu evaluieren, wurden in Kollaboration mit *Dr. David Drexler* (*Prof. Hopfner* Gruppe) *Thermal Shift Assays* (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC) durchgeführt. Mit dieser Methode wurden Veränderungen in der Schmelztemperatur der verwendeten C-terminalen Domäne von humanem STING als Resultat der Interaktion des Proteins mit einem Liganden gemessen (Abbildung 20).

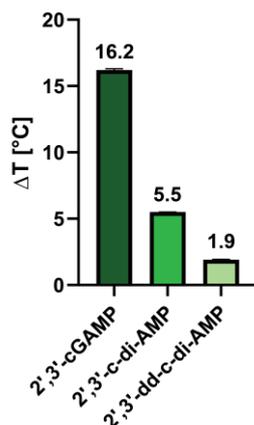


Abbildung 20: Ergebnisse des *Thermal Shift Assays* unter Verwendung der C-terminalen Domäne von humanen STING. Die Werte oberhalb der Säulen geben die durchschnittliche Verschiebungen der Schmelztemperaturen von STING nach Inkubation mit dem jeweiligen CDN an. Die Daten wurden in Kollaboration mit *Dr. David Drexler* erhoben.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich im direkten Vergleich zum endogenen Agonisten 2',3'-cGAMP ($\Delta T = 16.2$ °C) der zunehmende Grad an Modifikationen in 2',3'-c-di-AMP (**28**) und 2',3'-dd-c-di-AMP (**29**) drastisch auf die Bindungsaffinität der Analoga auswirkt. So führte das Ersetzen der G-Purinbase zu einem A in **28** zu einer vergleichsweise kleinen thermischen Verschiebung von 5.5 °C, was auf eine gegenüber **1** deutlich reduzierte Bindungsaffinität schließen lässt. Das desoxygenierte Analog **29** induzierte eine thermische Verschiebung von nur noch 1.9 °C.

Um die Dissoziationskonstanten (k_D) zu bestimmen, wurden isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) Experimente durchgeführt, in denen Lösungen der CDNs **28** und **29** jeweils zu einer Lösung der C-terminalen Domäne (CTD) von STING in der Instrumentenzelle titriert wurden (Abbildung 21). Aus den erhobenen Messergebnissen einer ITC lassen sich die thermodynamischen Parameter der Änderung von Bindungsenthalpie (ΔH), Gibbs'scher Enthalpie (ΔG) und Entropie (ΔS) berechnen.

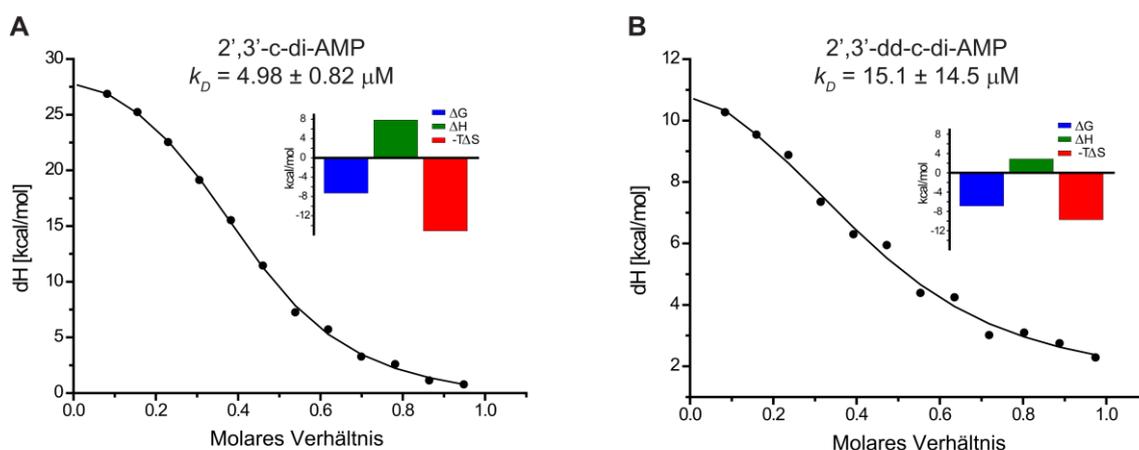


Abbildung 21: ITC Kurven und thermodynamische Parameter für **A)** 2',3'-c-di-AMP (**28**) und **B)** 2',3'-dd-c-di-AMP (**29**). Die Daten wurden in Kollaboration mit *Dr. David Drexler* erhoben.

Die Ergebnisse der Experimente zeigten in Übereinstimmung mit den Daten des *Thermal Shift Assays*, dass 2',3'-c-di-AMP (**28**) mit einem k_D -Wert von 4.98 μM der stärkere Bindungspartner als das desoxygenierte Analog **29** ($k_D = 15.1 \mu\text{M}$) ist. In beiden Fällen handelt es sich um Wechselwirkungen mit Dissoziationskonstanten im μM -Bereich. Verglichen mit der in der Literatur^[23] beschriebenen Bindungsdissoziationskonstante von 2',3'-cGAMP ($k_D = 3.79 \text{ nM}$) ist somit für die Analoga **28** und **29** eine signifikant schwächere Interaktion mit dem STING-Rezeptor bewiesen. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass durch ITC bestimmte Dissoziationskonstanten nicht zwingend mit den Beobachtungen eines biochemischen und zellulären Assays in vollständigen Einklang gebracht werden können. Beispielsweise berichteten *Ergun et al.*, dass für das in Bakterien vorkommende 3',3'-c-di-AMP, keine Bindung an STING durch ITC nachgewiesen werden konnte.^[28] Dennoch konnte bereits 2011 gezeigt werden, dass dieses CDN bakteriellen Ursprungs in Makrophagen zu einer STING-abhängigen Interferon Antwort führt.^[215] Darüber hinaus gelang 2019 die Kristallisation des Protein-Ligand Komplexes, was bewies, dass STING durch die Bindung von 3',3'-c-di-AMP die gleiche Konformation wie durch Interaktion mit 2',3'-cGAMP einnimmt. Mehrere Studien belegten außerdem, dass 3',3'-c-di-AMP die Expression von IFN in humanen Lymphozyten auslöst.^[28, 121] Für das oben diskutierte, synthetische 2',3'-c-di-AMP (**28**) berichteten *Wang et al.*, dass dieses CDN trotz des deutlich höheren k_D -Werts im Vergleich zu 2',3'-cGAMP (**1**) zur Induktion ähnlicher Interferonantworten in einer auf HEK293T basierten Reporterzelllinie führte.^[216] Um die Fähigkeit der oben genannten Verbindungen zu testen, eine STING-abhängige Expression von Interferonen auszulösen, wurden diese in einem *in vitro* Assay an Immunzellen untersucht. Hierzu wurde eine kommerziell erhältliche Reporterzelllinie (THP-1-Dual™ von *InvivoGen*) verwendet, die sich von THP-1 Monozyten ableitet und ein Gen der Lucia Luciferase unter der Kontrolle eines Promoters mit 5 IFN-stimulierten Antwortelementen besitzt. Diese Zelllinie erlaubt die Quantifizierung des immunstimulierenden Effekts durch 2',3'-cGAMP sowie der Analoga durch Messung der Intensität der resultierenden Lumineszenz in Abhängigkeit von der induzierten Immunantwort. Als Kontrollexperimente wurde die resultierende Lumineszenz von ungefütterten THP-1 Zellen sowie der STING-Knockout (KO) Zelllinie untersucht (Abbildung 22).

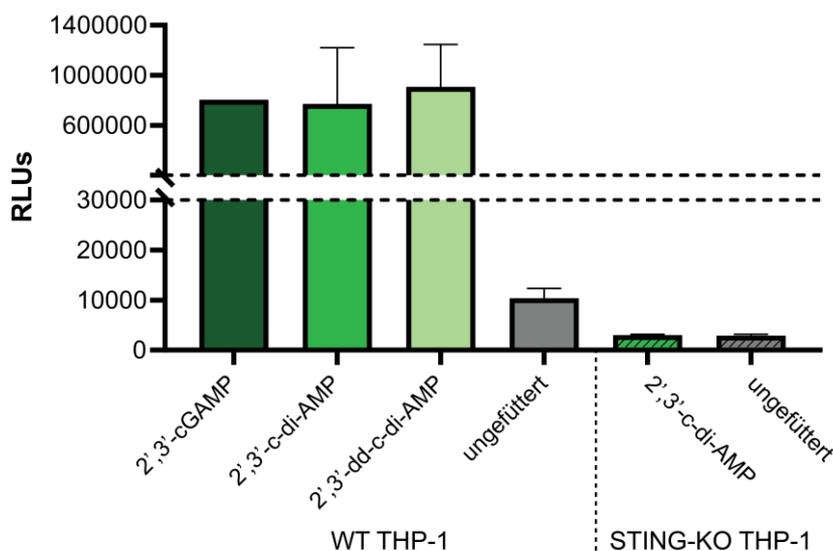


Abbildung 22: Erhaltene Intensitäten der Lumineszenz in Folge der Zugabe von CDN-Lösungen (50 μM) zu WT THP-1 Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (links) sowie die Fütterung von 2',3'-c-di-AMP (**28**, 300 μM) an STING KO Zellen (rechts). Die Daten wurden in Kollaboration mit *Dilara Özdemir* erhoben.

Die Zellstudien zeigten, dass neben 2',3'-cGAMP (**1**) auch bei der Anwendung von 2',3'-c-di-AMP (**28**) als auch für das desoxygenierte 2',3'-dd-c-di-AMP (**29**) bei Wildtyp (WT) THP-1 Zellen eine ähnliche Immunantwort hervorgerufen wurde. Darüber hinaus wurde in Abbildung 22 beispielhaft an **28** veranschaulicht, dass die resultierende Immunantwort STING-abhängig ist, da in STING-KO Zellen keine erhöhte Lumineszenz gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu beobachten war.

Die Zellen wurden anschließend mit Konzentrationen der CDNs im Bereich von 10 nM bis 300 μM stimuliert um den EC_{50} -Wert berechnen zu können. Dieser Wert gibt die Konzentration des Agonisten an, die benötigt wird um eine halbmaximale Immunantwort zu erzeugen. Die Bestimmung des Wertes erlaubt es, die Aktivität eines Agonisten zu beschreiben und verschiedene Agonisten zu vergleichen. In den hier beschriebenen Untersuchungen ist der EC_{50} -Wert nicht nur von der Interaktion des Enzyms mit dem Agonisten, sondern darüber hinaus von der Zellmembranpermeabilität der jeweiligen Verbindung sowie deren Stabilität unter physiologischen Bedingungen abhängig.

Hierfür wurden THP-1 Zellen mit dem jeweiligen CDN für 24 Stunden inkubiert und die resultierende Lumineszenz mit einem *TECAN Reader* bestimmt. Die erhaltenen, relativen Lichteinheiten (RLUs) wurden für die Vergleichbarkeit auf die maximale Antwort normiert ($E_{\text{max}} = 100$) und gegen die Konzentration aufgetragen. Der resultierende, sigmoidale Kurvenverlauf konnte durch die *Hill* Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{E}{100} = \frac{c^{n_H}}{\text{EC}_{50}^{n_H} + c^{n_H}}$$

In dieser Gleichung repräsentiert E die gemessenen und normalisierten RLUs, c die eingesetzte Konzentration des CDNs und n_H den *Hill*-Koeffizienten, welcher ein Maß dafür ist, wie steil die Kurve verläuft. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 23 zusammengefasst.

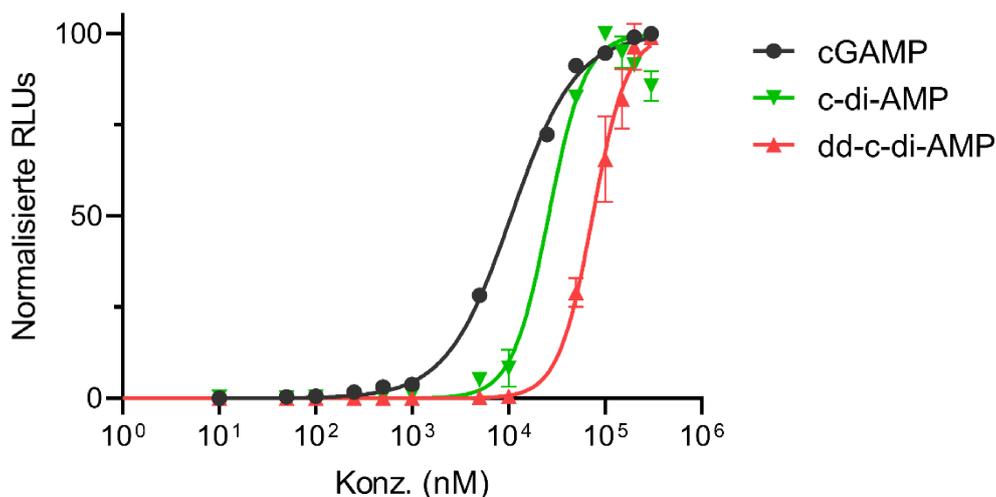


Abbildung 23: EC₅₀-Kurven der CDNs cGAMP (EC₅₀ = 10.7 ± 1.0 µM, schwarz), 2',3'-c-di-AMP (EC₅₀ = 26.6 ± 4.9 µM, grün) und 2',3'-dd-c-di-AMP (EC₅₀ = 74.4 ± 4.6 µM, rot). Die Daten wurden in Kollaboration mit *Dilara Özdemir* erhoben.

Durch diesen Assay wurde für cGAMP ein EC₅₀-Wert von 10.7 µM bestimmt, was mit dem bereits beschriebenen Wert für enzymatisch synthetisiertes cGAMP übereinstimmt.^[217] Für die Analoga 2',3'-c-di-AMP (**28**) und 2',3'-dd-c-di-AMP (**29**) wurden jeweils höhere EC₅₀-Werte von 26.6 µM beziehungsweise 74.4 µM erhalten. Dies lässt sich mit den gemessenen ITC-Daten in Einklang bringen, da bei nahezu unveränderter Polarität und somit Zellpermeabilität die Bindungsaffinität ausschlaggebend ist.

Die Daten zeigen schlüssig, dass natürliches cGAMP (**1**) gegenüber den CDNs **28** und **29** sowohl eine höhere Bindungsaffinität zu STING besitzt als auch eine bessere Wirksamkeit in THP-1 Zelllinien zeigt. Für die Entwicklung *Prodrug*-modifizierter Analoga sollte zusätzlich in Erwägung gezogen werden, dass Adenosin gegenüber Guanodin verbesserte Arzneimitteleigenschaften (Löslichkeit, Verteilung und Transport) sowie ertragreichere, synthetische Zugänglichkeit, insbesondere in Phosphoramidit-basierten Kupplungsreaktionen, verspricht.^[111, 218-219] Da die biologische Aktivität der beiden Adenin-basierten Analoga **28** und **29** in den soeben beschriebenen Experimenten und Assays gezeigt werden konnte, wurden diese im Nachfolgenden als Grundgerüst für das Design von zellmembranpermeablen *Prodrugs* verwendet.

5.1.2 *Prodrug*-Design und *Targeting*-Konzepte für cGAMP Analoga

Wie einleitend beschrieben, wurden bereits verschiedene Strategien verfolgt um cGAMP-Analoga mit verbesserter Zellmembranpermeabilität zu generieren. Für die angestrebte Etablierung zelltyp-spezifischer *Targeting*-Mechanismen reicht jedoch die simple Maskierung der Phosphordiester und die damit einhergehende Reduzierung der Polarität nicht aus. Um sowohl das Ziel des *Targetings* als auch die verbesserte Zellmembranpermeabilität gleichsam zu verfolgen, wurden daher CDN-Analoga entwickelt, in

denen die Phosphordiester-Gruppen durch Phosphortriester mit biologisch spaltbaren Linkern substituiert wurden. Die Anforderungen an das Linker-Motiv waren dabei, dass dieses möglichst einfach an eine für den *Targeting*-Mechanismus geeignete Molekülstruktur (*Targeting*-Einheit) gekoppelt werden kann, möglichst selektiv intrazellulär gespalten wird und so zur Freisetzung des STING-aktivierenden, freien CDNs führt (Abbildung 24).

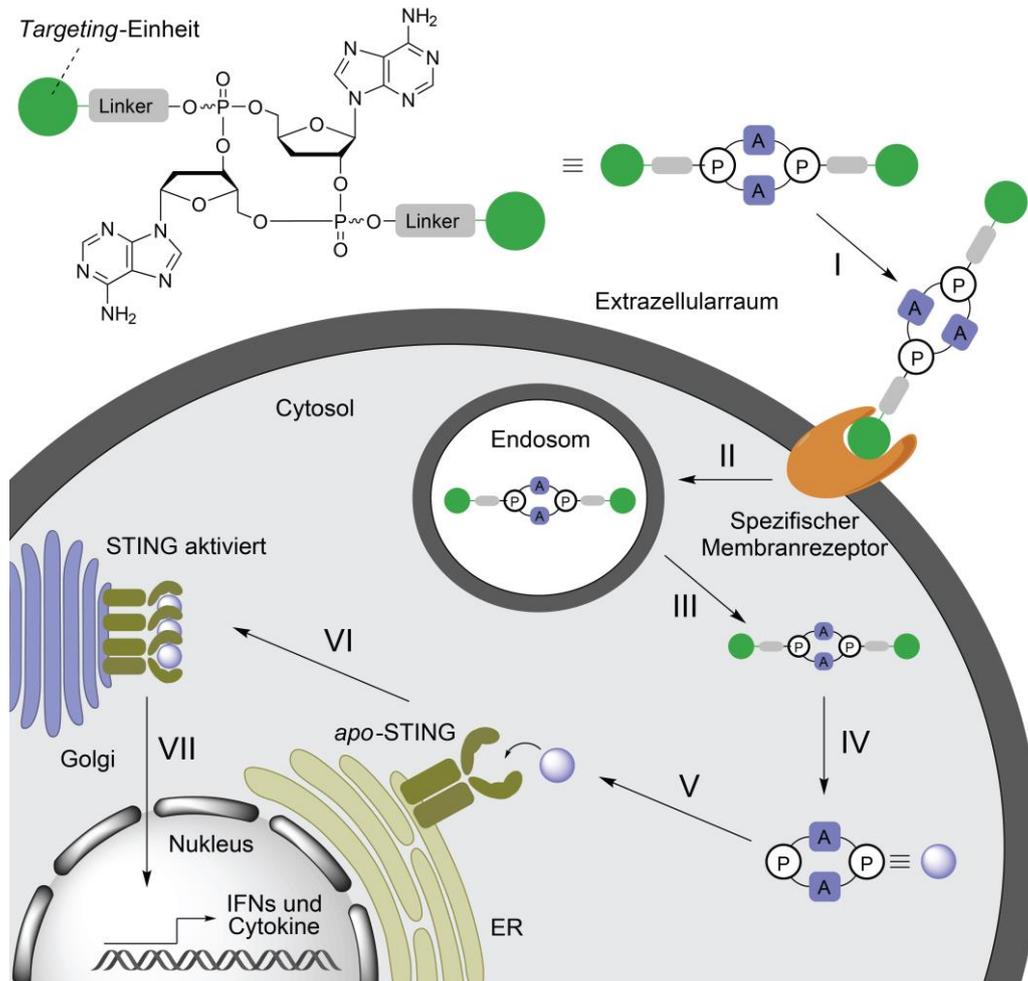


Abbildung 24: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Wirkmechanismus der designten CDN-*Prodrugs*. **I)** Interaktion von CDN-*Prodrugs* mit Zellrezeptoren, **II)** Rezeptor-vermittelte Endozytose der *Prodrugs*, **III)** Freisetzung des Prodrugs ins Cytosol nach Entkommen des Endosoms, **IV)** Enzymatische Spaltung der Linker und daraus resultierende Freisetzung eines CDNs, **V)** Interaktion des freien, biologisch aktiven CDNs mit STING, **VI)** Aktivierung von STING durch Bindung des CDNs, resultierend in STING-Oligomerisierung und Translokation, **VII)** Induktion der Signalkaskade resultierend in der Induktion von IFN- und Cytokin-Expression.

Um die Freisetzung eines biologisch aktiven CDNs zu gewährleisten, muss der Freisetzungsmechanismus eine selektive Abspaltung des Linker-Motivs sicherstellen. Mechanismen, die beispielsweise auf der Hydrolyse durch nukleophilen Angriff von Wasser auf den Phosphortriester basieren, erlauben ohne Selektivität drei mögliche Bindungsbrüche (Optionen a, b und c, Abbildung 25A). Zwei dieser Optionen (a, b) führen zur Öffnung der Ringstruktur und zu linearen Dinucleotiden, welche STING nicht aktivieren können. Aus diesem Grund wurde ein *Prodrug*-Motiv gewählt, dessen Spaltungsmechanismus

in Zellen nicht auf der direkten Reaktion am Phosphoratom beruht. Als solches Motiv, welches für die Maskierung von Phosphordiestern geeignet ist und die gewünschten Anforderungen an die Selektivität in der Abspaltung erfüllen sollte, wurde die SATE-Einheit in Betracht gezogen. Diese Molekülstruktur enthält einen durch cytosolische Esterasen spaltbaren Thioester, der in einem ersten Schritt durch die enzymatische Hydrolyse ein Thiol freisetzt. Dieses Thiol führt in einem zweiten Schritt durch spontanen, nukleophilen Angriff auf das erste Kohlenstoffatom neben dem Phosphat unter der Bildung von Ethylensulfid zum freien Phosphordiester. Des Weiteren wurde das Design des SATE-Linkers durch ein terminales Alkin bestimmt, welches eine, in Anbetracht der Syntheseplanung, möglichst späte Funktionalisierung der *Prodrug*-modifizierten CDN-Analoga durch Cu(I)-katalysierte Cycloaddition mit Aziden (Click-Chemie) ermöglicht. Über Click-Reaktionen sollten die für das *Targeting* gewünschten Molekülstrukturen in das Gesamtkonstrukt eingeführt werden (Abbildung 25B).

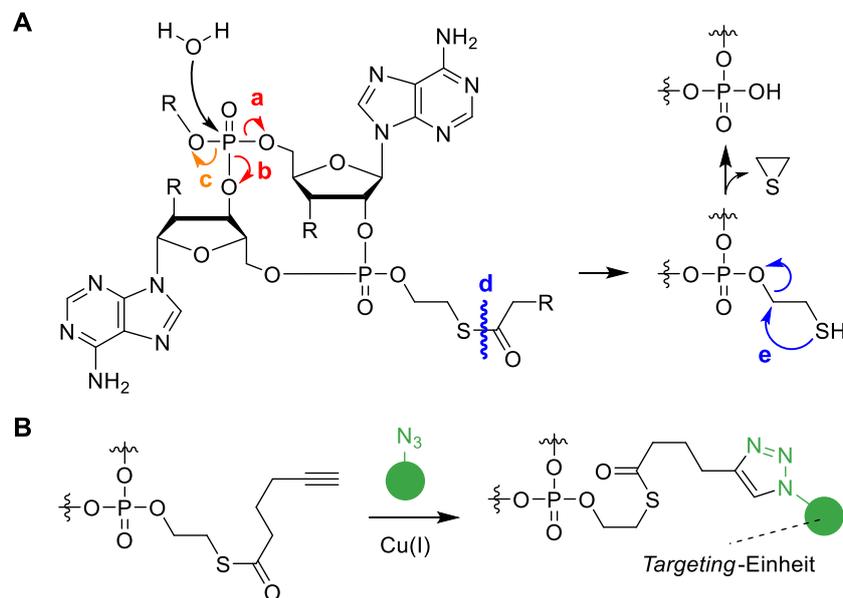


Abbildung 25: A) Mögliche Spaltungsmechanismen eines Phosphortriesters mit und ohne SATE-Motiv. Am linken Phosphortriester wird veranschaulicht, dass der nukleophile Angriff von Wasser auf das Phosphoratom zur Öffnung der Ringstruktur (a, b in rot) oder ohne Selektivität zur gewünschten Freisetzung des CDNs führen kann (c in orange). Am rechten Phosphortriester ist die selektive Freisetzung (in blau) des CDNs durch enzymatische Hydrolyse (d) und anschließende, spontane Zersetzung (e) der SATE-Einheit angedeutet. **B)** Struktur des designten SATE-Linkers sowie die schematische Darstellung der Verknüpfung des Linkers an eine *Targeting*-Einheit (grün) durch Click-Chemie.

Allgemein ist die Substitution beider Phosphordiester und somit Einführung von zwei SATE-Linkern oder aber die Integration eines einzelnen Linkers denkbar. Wenn beispielsweise die Steigerung der Zellmembranpermeabilität eine wichtige Rolle spielt, ist die Maskierung beider Phosphordiester und die einhergehende Minderung der Polarität durch Eliminierung beider negativen Ladungen erstrebenswert. Darüber hinaus würde so die Reaktionsplattform geschaffen, um das CDN mit zwei kleinen Biomolekülen als *Targeting*-Einheiten für Rezeptor-vermittelte Endozytose auszustatten wie es bereits in Abbildung 25 angedeutet wurde.

Der designte SATE-Linker erlaubt auch die Verfolgung einer auf Antikörper basierten *Targeting*-Strategie. So sollte sich durch Click-Chemie ein verlängerter Linker generieren lassen, der die Einführung einer funktionellen Gruppe zur Kupplung an die Oberfläche eines Antikörpers erlaubt. Das resultierende Antikörper-CDN-Konjugat (ACK) sollte ähnlich zu *Antibody-Drug-Conjugates* (ADCs), wie diese in der Literatur^[76, 78] vor allem für den zielgerichteten Transport von zytotoxischen Substanzen in Tumorzellen beschrieben sind, ein zelltypspezifisches *Targeting* erlauben. Diese zielgerichtete Spezifität basiert auf der zelltypabhängigen Präsentation von Antigenen an der Zelloberfläche. Vergleichbar zur Funktionsweise der ADCs sollte die Interaktion des ACKs mit dem Antigen eine durch Antikörper-Antigen-Wechselwirkung vermittelte Endozytose auslösen und nach Internalisierung durch Spaltung des Linkers zu einer Freisetzung der CDNs führen (Abbildung 26).

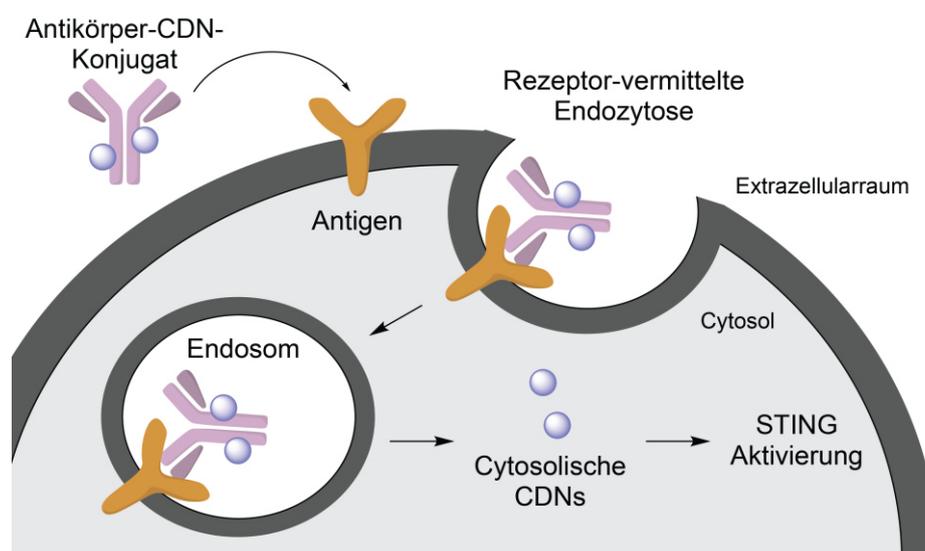
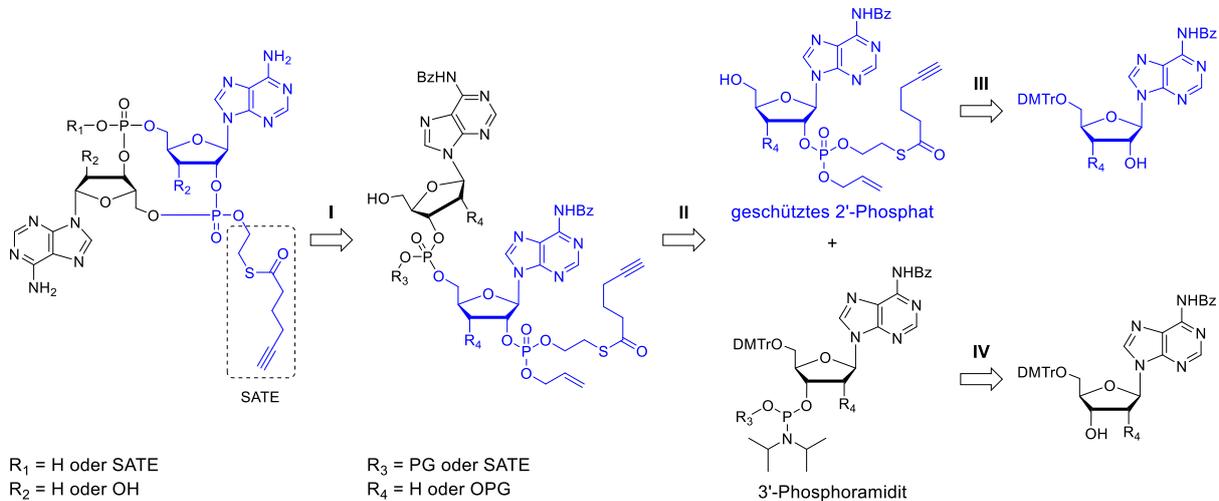


Abbildung 26: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Wirkmechanismus eines Antikörper-CDN-Konjugats *via* Internalisierung durch Rezeptor-vermittelte Endozytose, Abspaltung der CDNs, Entkommen aus dem Endosom und Aktivierung von STING in Anlehnung an das Wirkprinzip von ADCs.^[79]

Bei der Dekoration eines Antikörpers mit zu internalisierender Fracht ist es sinnvoll, mehrere CDN-Analoga an einen Antikörper zu koppeln, um eine erhöhte Bioverfügbarkeit zu gewährleisten. Der angestrebte *Targeting*-Mechanismus eines ACKs ist in erster Linie nicht mehr von der Zellmembranpermeabilität des CDN-Analogs abhängig. Dementsprechend ist die Substitution beider Phosphordiester eines CDNs nicht zwingend notwendig und ein einzelner Linker reicht für die gewünschte Anwendung aus. Darüber hinaus wären mit zwei reaktiven Linkern bei der Herstellung eines ACKs unerwünschte Nebenreaktionen wie Protein-Protein *cross-links* denkbar.

Um die so entwickelten *Prodrugs* je nach Anforderung und Zielsetzung mit einem oder zwei SATE-Linkern zu synthetisieren, wurde eine Synthesestrategie ausgearbeitet, die der bereits für die Referenzverbindungen gezeigten Retrosynthese ähnlich ist. Wieder basiert die Synthese auf Phosphoramidit- und P(V)-Chemie und startet mit zwei in geeigneter Weise mit Schutzgruppen versehenen Nucleosiden. Bei der Umsetzung dieser Nucleoside in ein geschütztes 2'-Phosphat beziehungsweise ein 3'-Phosphoramidit wird die Zahl der

eingeführten Linker und dementsprechend Phosphortriester im finalen Produkt festgelegt (Schema 2). Es folgt vergleichbar zu der Synthese der freien CDNs eine lineare Kupplung, Zyklisierung und finale Entschützung.



Schema 2: Retrosynthetische Analyse für den synthetischen Zugang zu *Prodrugs* der cGAMP-Analoga unter Verwendung geeigneter Schutzgruppen (PG). **I)** Allyl Entschützung, Zyklisierung und finale Entschützung, **II)** Lineare Kupplung, Oxidation und DMTr Entschützung, **III)** Einführung eines SATE-Motivs durch Phosphortriester-Synthese mit Allyl-Schutzgruppe und DMTr Entschützung, **IV)** Phosphoramidit Synthese, welche die Zahl der SATE-Linker im finalen Produkt bestimmt.

Der modulare Aufbau der entwickelten CDN-*Prodrugs* erlaubt sowohl eine direkte Anwendung der erhaltenen CDN-*Prodrugs* auf Zellen als auch eine anschließende Modifikation *via* Click-Chemie für die Etablierung verschiedener *Targeting*-Konzepte (Abbildung 27). Im nachfolgenden Kapitel wird die Synthese und Evaluierung eines CDN-*Prodrugs* diskutiert, welches für die Anwendung als Antikörper-CDN-Konjugat geeignet ist.

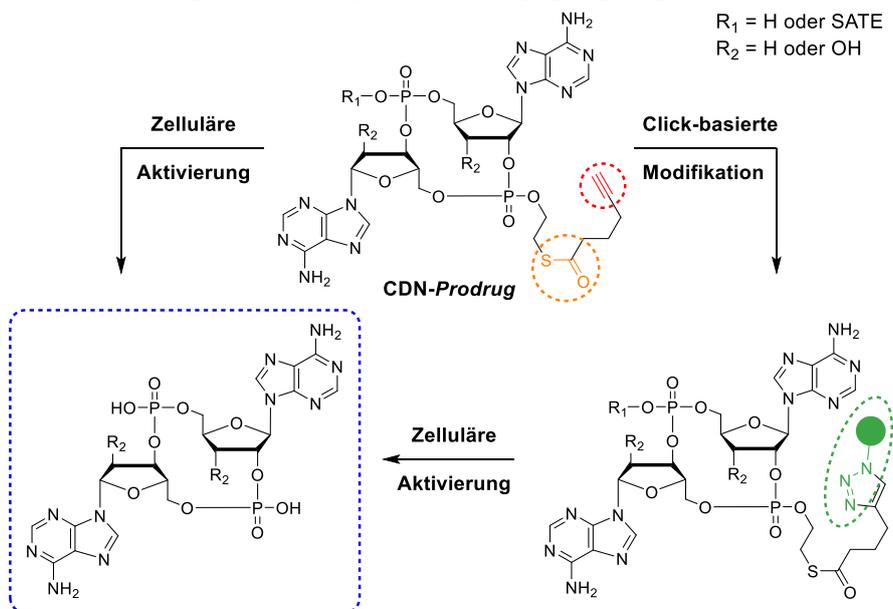


Abbildung 27: Allgemeines Design der CDN-*Prodrugs* und die Möglichkeiten der Aktivierung. Wichtige Schlüsselemente sind farbig hervorgehoben: der enzymatisch, spaltbare Thioester (orange), das terminale Alkin für Funktionalisierung (rot), eine durch Click-Chemie eingeführte *Targeting*-Einheit (grün) und die nach intrazellulärer Prozessierung bioaktiven CDNs (blau).

5.1.3 Mono-SATE-*Prodrug* als Leitstruktur für ein Antibody-Drug-Conjugate

Um eine für die Anwendung als Antikörper-CDN-Konjugat geeigneten Vorläuferverbindung zu synthetisieren, wurde ein entsprechendes *Prodrug*-modifiziertes CDN-Analog mit einem SATE-Linker designiert (**30**, Abbildung 28). Dieses wird nachfolgend auch mono-SATE-*Prodrug* genannt. Für die Etablierung des generellen Konzepts wurde als zugrundeliegendes CDN-Gerüst das strukturell stark vereinfachte 2',3'-dd-c-di-AMP (**29**) als geeignetes cGAMP-Analog ausgewählt.

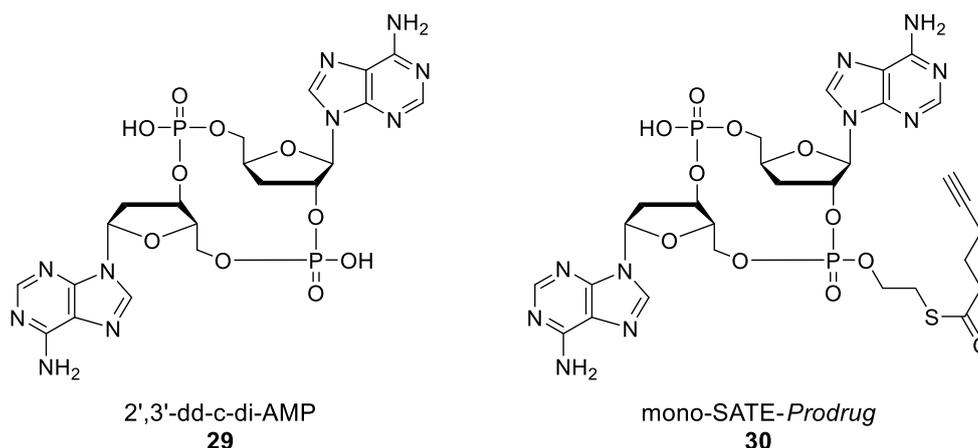
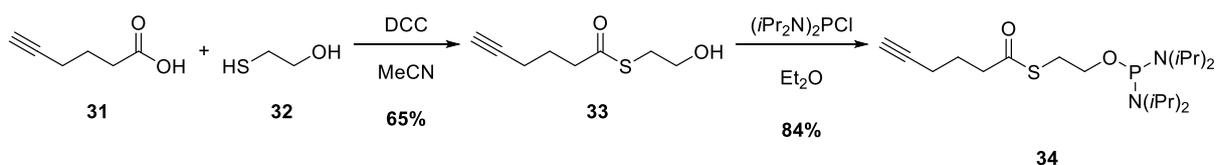


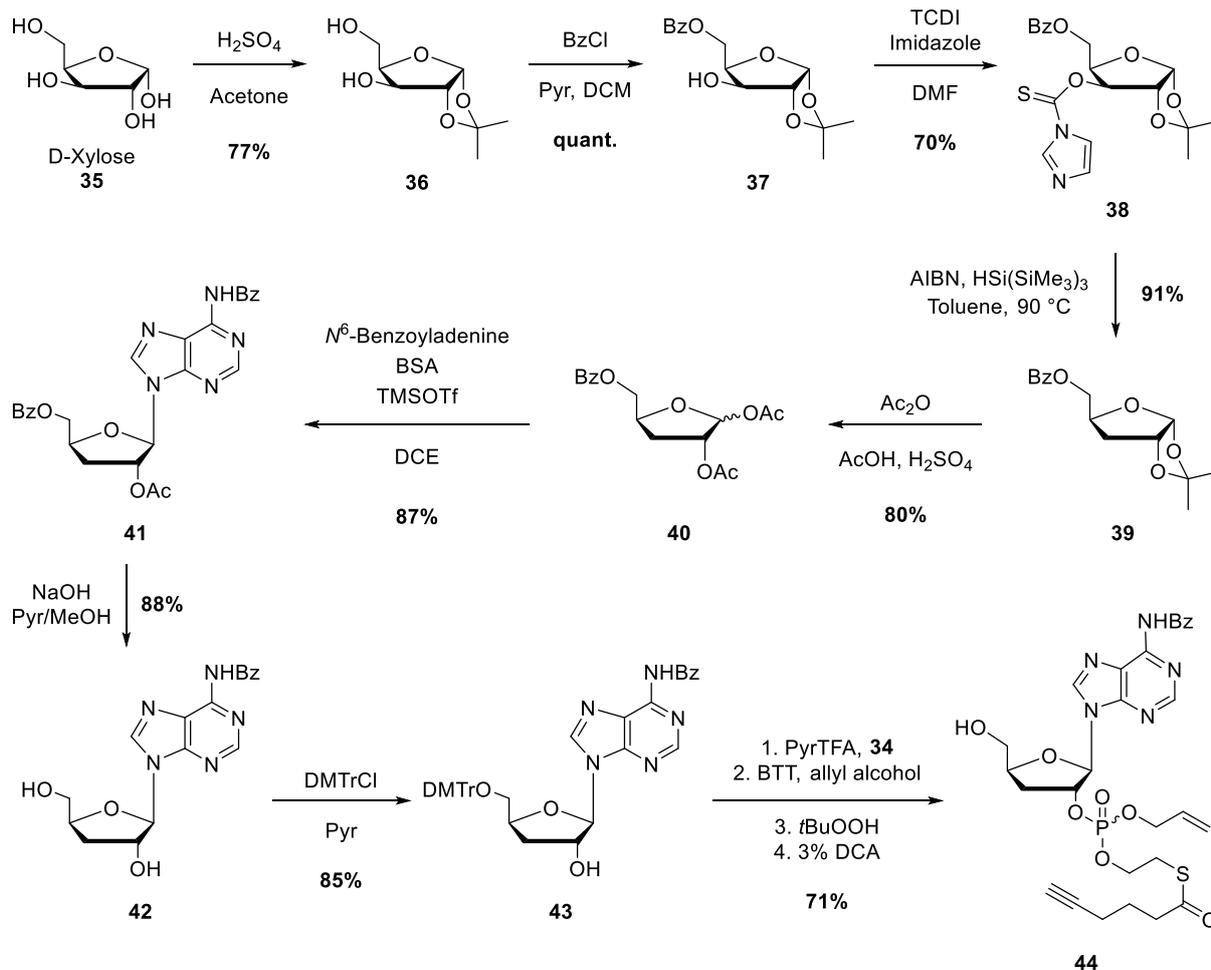
Abbildung 28: Chemische Strukturen von 2',3'-dd-c-di-AMP (**29**) und dem einfach maskierten *Prodrug* Derivat **30**.

Um das *Prodrug*-Motiv in die Zielstruktur einführen zu können, war zunächst die Synthese des SATE-Phosphorodiamidit **34** notwendig. Dieses wurde in zwei Schritten von kommerziell erhältlicher 5-Hexinsäure (**31**) und β -Mercaptoethanol (**32**) durch Veresterung und anschließende Phosphitylierung erhalten (Schema 3).



Schema 3: Synthese des SATE-Phosphorodiamidits (**34**) aus kommerziell erhältlichen Startmaterialien.

Die Darstellung des mono-SATE-*Prodrugs* **30** erfordert zunächst die Synthese eines 3'-Deoxyadenosins (**42**), welches nach selektiver Schützung der 5'-Hydroxygruppe die Einführung des *Prodrug*-Motivs in Form eines geschützten 2'-Phosphats ermöglichte. So wurde der essentielle Baustein **44** für die anschließende Darstellung eines linear gekuppelten Dinukleotids generiert (Schema 4).



Schema 4: Synthese des essentiellen Phosphortriester-Bausteins **44** unter Verwendung des SATE-Phosphorodiamidits (**34**).

Ausgehend vom Zucker D-Xylose (**35**) wurde nach der Methode von *Moravcová et al.*^[220] zunächst das 1,2-Isopropyliden-geschützte Derivat **36** hergestellt. Dieses wurde selektiv an der 5-OH Gruppe mit einer Benzoyl-Schutzgruppe versehen, um die Verbindung **37** zu erhalten, welche selektive Modifikationen an der 3-Position ermöglicht. Nach Herstellung des Thiocarbonylimidazol-Derivats **38** wurde eine *Barton-McCombie* Deoxygenierung mit Tris(trimethylsilyl)silan und AIBN als thermischer Radikalstarter in exzellenter Ausbeute durchgeführt. Das deoxygenierte Acetonid **39** wurde durch simultane Isopropyliden-Entschützung und Acetylierung in ein geeignetes Substrat (**40**) für die β -selektive *Vorbrücken* Glykosylierung überführt. Die Glykosylierung erfolgte unter klassischen Bedingungen mit silyliertem *N*-Benzoyladenin und Trimethylsilyltrifluormethansulfonat um das geschützte 3'-Deoxyadenosin **41** in guter Ausbeute zu erhalten. Die Acyl-Schutzgruppen der Ribose wurden selektiv unter Verwendung von NaOH in Pyridin und Methanol in 88% Ausbeute entfernt ohne die Benzoyl-Schutzgruppe des Adenins anzugreifen. Die anschließende, quantitative Schützung der 5'-OH-Gruppe des Nucleosids **42** durch quantitative Umsetzung mit DMTrCl in Pyridin resultierte in dem 5'-O-DMTr geschützten 3'-Deoxyadenosins **43**, welches einen wichtigen Ausgangspunkt für die mehrstufige Reaktionssequenz zur Synthese des Phosphats **44** darstellte. Hierzu wurde zunächst das Phosphorodiamidit **34** und Pyridiniumtrifluoroacetat als Aktivator verwendet um das *Prodrug*-Linker modifizierte

2'-Phosphoramidit herzustellen. Dieses wurde direkt mit Allylalkohol unter Verwendung von 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (BTT) Aktivator gekuppelt und die resultierende, trialkylierte P(III)-Spezies durch Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) in das Trialkylphosphat überführt. Nach saurer Entschützung der DMTr-Gruppe mit 3%iger DCA in DCM wurde der gewünschte Phosphortriester **44** in guter Ausbeute erhalten. In Summe ließ sich dieser wichtige Baustein mit 18% Ausbeute über zwölf Schritte herstellen und NMR-spektroskopisch verifizieren (Abbildung 29). Aufgrund der Chiralität von trisubstituierten Phosphaten wurde **44** als Gemisch aus zwei Diastereomeren erhalten, welches sich nicht säulenchromatographisch trennen ließ und als solches weiterverwendet wurde.

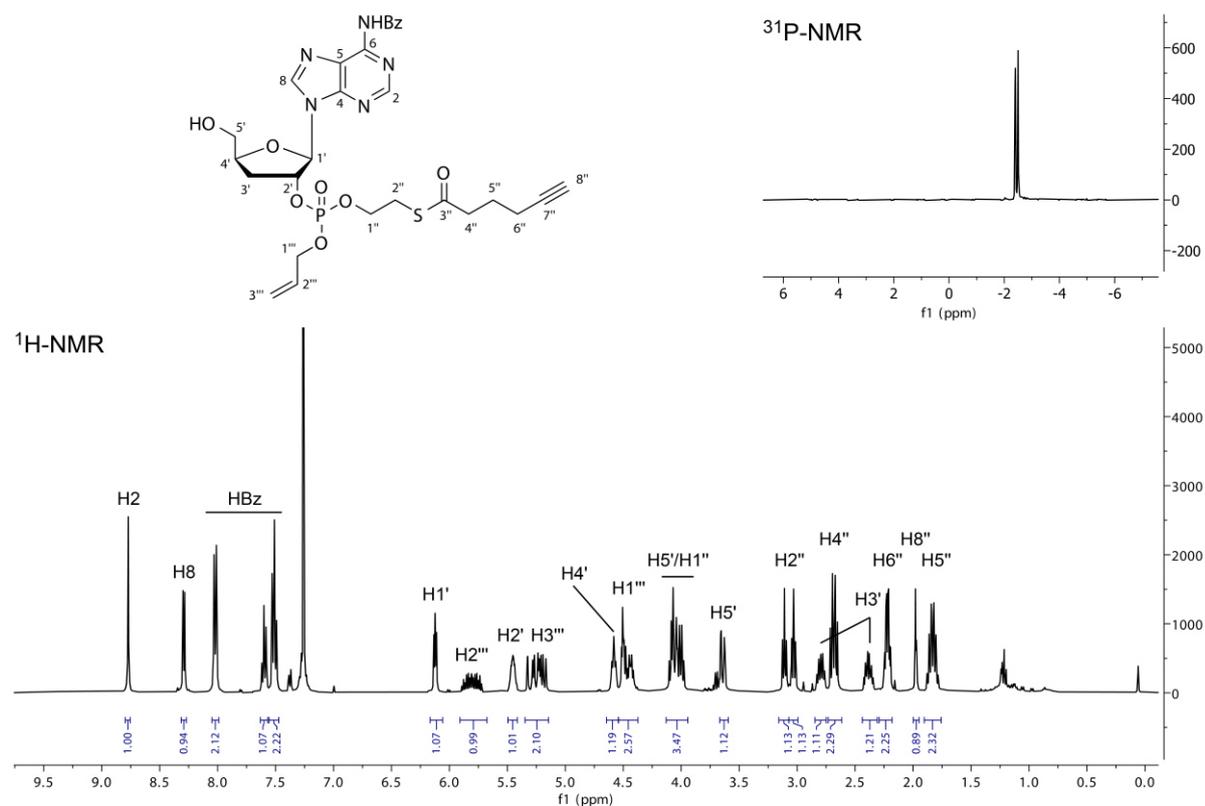
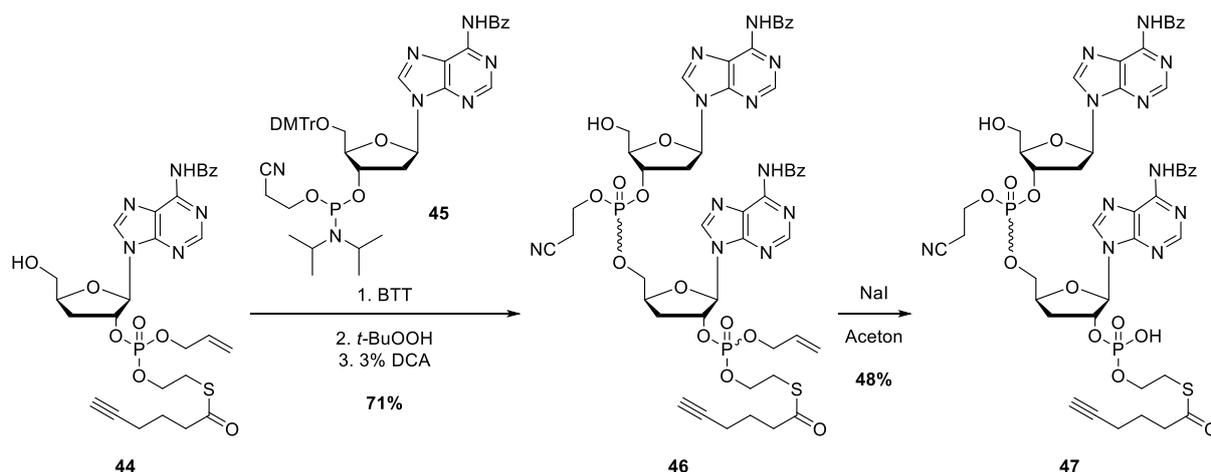


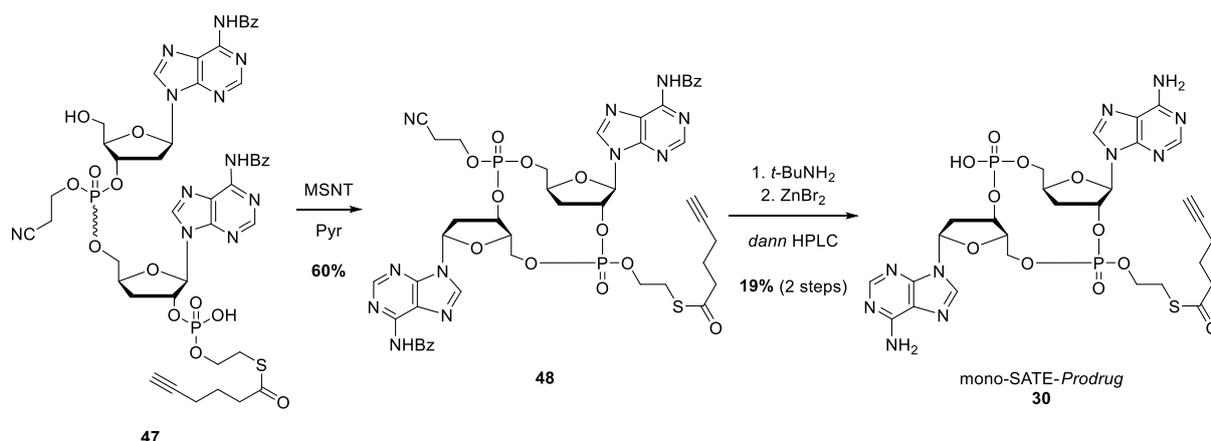
Abbildung 29: Struktur, 400 MHz ¹H-NMR- und 162 MHz ³¹P-NMR Spektren des Gemisches beider Diastereomere der Verbindung **44**.

Da sich das entwickelte mono-SATE-*Prodrug* **30** neben dem 3'-deoxygenierten Nukleosidbaustein **44** aus einem kommerziell erhältlichen DNA Adenosinphosphoramidit **45** aufbauen lässt, wurden diese beiden Bausteine *via* BTT Aktivierung gekuppelt. Das intermediär gebildete Trialkylphosphit wurde wie bereits zuvor beschrieben zunächst durch Zugabe von TBHP oxidiert und anschließend die DMTr-Schutzgruppe mit 3%iger DCA im sauren Milieu abgespalten (Schema 5). Das linear gekuppelte Dinukleotid **46** wurde in 71% Ausbeute über drei Schritte erhalten und setzte sich aufgrund zwei chiraler Zentren (zwei Phosphortriester) aus vier Diastereomeren zusammen. Nach der Entschützung der Allyl-Schutzgruppe durch Reaktion mit Natriumiodid in refluxierendem Aceton wurde das Rohprodukt **47** gefällt und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.



Schema 5: Synthese des linearen Dinucleotid **46** sowie Entschützung der Allyl-Schutzgruppe zur Darstellung der Vorläuferverbindung **47** für die anschließende Zyklisierung.

Die Zyklisierung wurde mit 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol (MSNT) zur Aktivierung des Phosphats durchgeführt und das zyklisierte Dinucleotid **48** in moderater Ausbeute erhalten (Schema 6). Bei dem isolierten Produkt handelte es sich erneut um ein Gemisch aus vier Diastereomeren, welche in zwei finalen Schritten der Entschützung zur Zielverbindung umgesetzt werden konnten.



Schema 6: Synthese des mono-SATE-Prodrugs **30** durch Zyklisierung von **47** und finale Entschützung der Vorläuferverbindung **48**.

Die abschließende Entschützung konnte nicht mit Basen wie Methylamin oder Ammoniak durchgeführt werden, wie dies beispielsweise für Oligonucleotidsynthesen üblich ist, da bei Verwendung dieser Reagenzien eine rasche Spaltung des Thioesters zu beobachten war. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass durch ein zweistufiges Protokoll, welches zunächst die Entschützung der Cyanoethyl-Gruppe mit der sterisch anspruchsvollen Base *t*-BuNH₂ und nachfolgender Abspaltung der Benzoyl-Schutzgruppen mit einer Lösung von Zinkbromid in Methanol/Chloroform (4:1) über 24 Stunden das finale Produkt **30** erhalten werden konnte. Die zwei erhaltenen Diastereomere **30a** und **30b** konnten mittels RP-HPLC unter Verwendung eines Gradienten mit steigendem MeCN-Gehalt in H₂O und Zusatz von 0.1% TFA separiert ($t_R(\mathbf{30a}) = 21.2$ Minuten, $t_R(\mathbf{30b}) = 26.2$ Minuten) und jeweils vollständig durch NMR-

und Massenspektrometrie charakterisiert werden (exemplarisch gezeigt für **30b**, Abbildung 30).

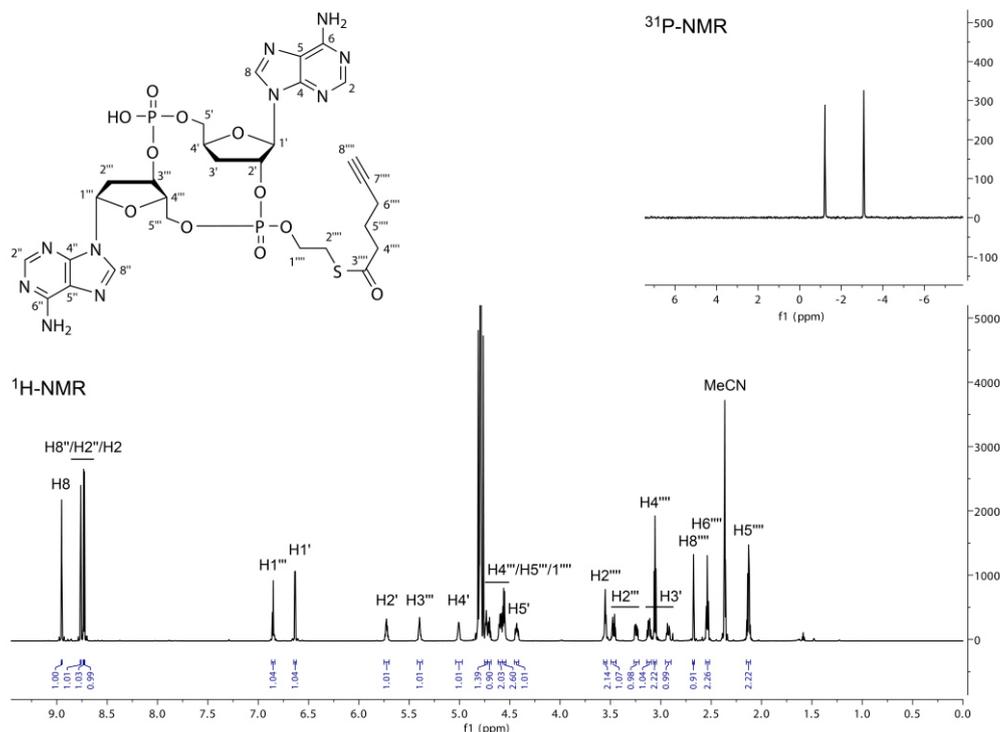


Abbildung 30: Struktur, 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ und 162 MHz $^{31}\text{P-NMR}$ Spektren des Diastereomers **30b**.

Um die Eigenschaften der Freisetzung des biologisch aktiven CDNs aus dem *Prodrug*-Vorläufer zu untersuchen, wurde zunächst ein biochemischer Assay entwickelt, durch den die Esterasebasierte, selektive Spaltung des *Prodrug*-Linkers ersichtlich werden sollte. Hierfür wurde das *Prodrug*-Analog **30** mit einer Carboxylesterase (CES) inkubiert. Vertreter der Enzymfamilie der Carboxylesterasen sind hydrolytisch aktive Enzyme, die an der Spaltung und Aktivierung zahlreicher Esterase-abhängiger *Prodrugs* und der Arzneimittelverstoffwechslung beteiligt sind.^[221] Es sind hauptsächlich die zwei Isoenzyme CES1 und CES2 bekannt, die sich vor allem in deren Verteilung in unterschiedlichen Geweben unterscheiden. So finden sich hohe Expressionslevel der Isoformen von CES1 vor allem in der Leber, der Lunge und in Immunzellen wie beispielsweise Monozyten und Makrophagen, wohingegen CES2 neben der Leber vor allem im Darm und in den Nieren stärker exprimiert wird.^[221] Der Wirkmechanismus, wie Ester und andere Carbonsäurederivate durch CES1 oder CES2 gespalten werden, unterscheidet sich für CES1 und CES2 nicht. In beiden Fällen basiert die Hydrolyse auf einer katalytischen Triade der Aminosäuren Ser-His-Glu im aktiven Zentrum, wie dies auch von anderen hydrolytisch aktiven Enzymen bekannt ist.^[222] Trotz einer Aminosäuresequenzidentität von 47% für CES1 und CES2 weisen beide Isoformen teils stark unterschiedliche Substratspezifität auf. Beispielsweise spalten CES1-Isoenzyme vor allem Substrate mit einer strukturell kleinen Alkoholgruppe und einer räumlich anspruchsvolleren Acylgruppe effizient, wohingegen Enzyme der Kategorie CES2 besonders für die Hydrolyse von Substraten einer strukturell anspruchsvollen Alkoholgruppe und vergleichsweise kleinen Acylgruppe geeignet sind. Die

relativ breite aktive Tasche von CES1 erlaubt dieser Isoform jedoch auch die Hydrolyse einer Bandbreite weniger geeigneter Substrate.^[223]

Da es sich bei CES1 um das Isoenzym mit hohen Expressionsleveln in Immunzellen wie Monozyten handelt und eine relativ breite Substratspezifität aufweist, wurde die Umsetzung des *Prodrugs* **30** zum freien CDN (**29**) mit der kommerziell erhältlichen Carboxylesterase 1c (CES1c) untersucht. In dem angewendeten Assay wurden je 10 nmol des mono-SATE-*Prodrugs* **30** mit fünf Enzymeinheiten CES1c bei 37 °C in HEPES Puffer (0.1 M, pH = 7.5) inkubiert. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels analytischer HPLC untersucht und zeigte, dass die Spaltung des *Prodrug*-Motifs sehr spezifisch verlief, da nur ein Reaktionsprodukt detektiert werden konnten (Abbildung 31). Darüber hinaus wurde zugleich bewiesen, dass **30** eine hohe Stabilität in wässrigen Puffern aufweist, da in den Vergleichsproben ohne CES1c weder eine signifikante Abspaltung des *Prodrug*-Motivs noch sonstige Zersetzung zu beobachten war.

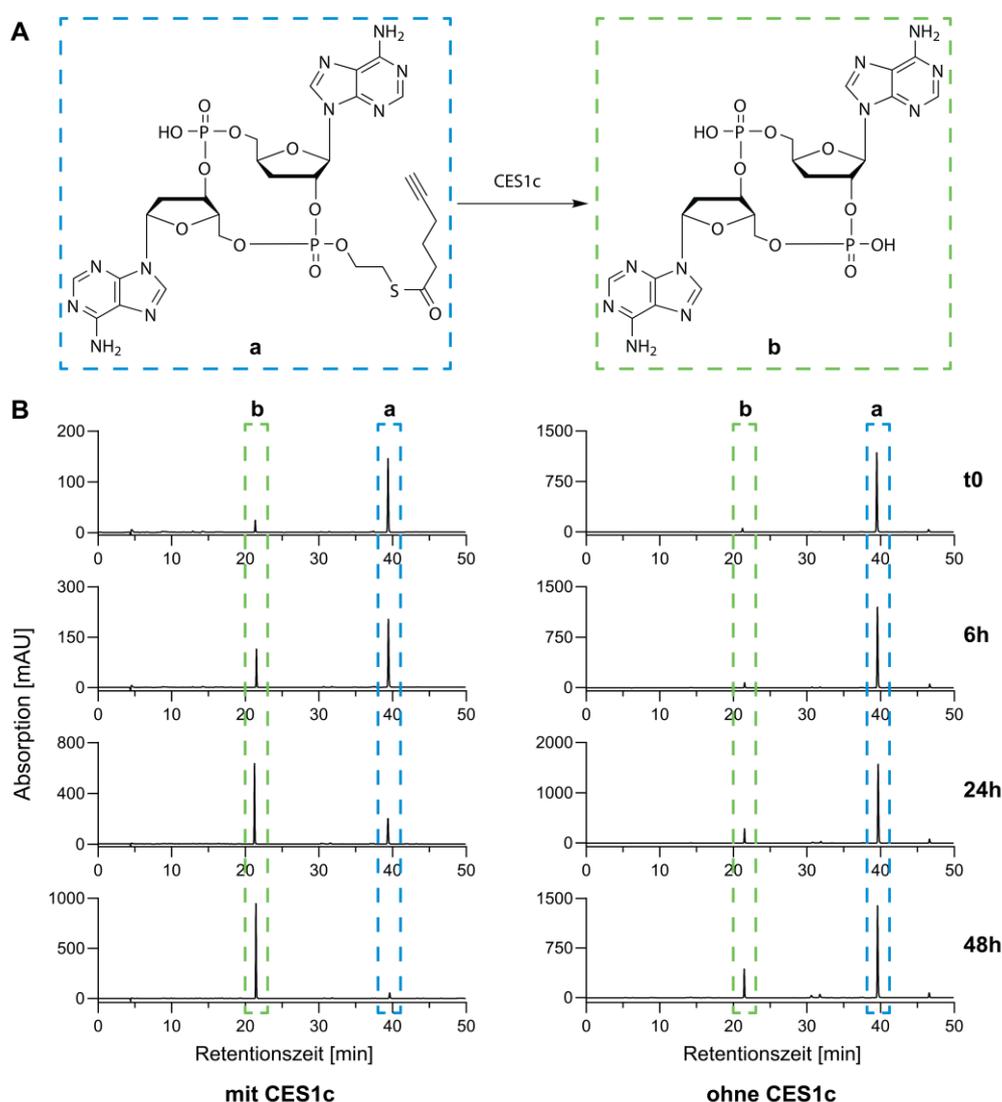


Abbildung 31: Enzymatischer Spaltungs-Assay von **30a**. **A)** Schematische Darstellung der durch CES1c katalysierten Hydrolyse und Freisetzung des CDNs **b** (in grün) aus dem *Prodrug* **a** (in blau). **B)** Ergebnisse der analytischen HPLC des durchgeführten, enzymatischen Assays bei t₀ sowie nach 6 h, 24 h und 48 h. HPLC Bedingungen: 0% auf 40% Puffer B in Puffer A über 45 Minuten. Puffer A: 0.1 M NEt₃/HOAc in H₂O, Puffer B: 0.1 M NEt₃/HOAc in MeCN/H₂O (4:1).

Das Reaktionsprodukt wurde bei der durchgeführten HPLC-Analyse aufgefangen und anschließend mittels Massenspektrometrie als freies CDN 2',3'-dd-c-di-AMP (**29**) identifiziert (Abbildung 32). Dieses Ergebnis bestätigte, dass das entwickelte *SATE-Prodrug* durch CES Enzyme spezifisch in das freie CDN umgesetzt wird.

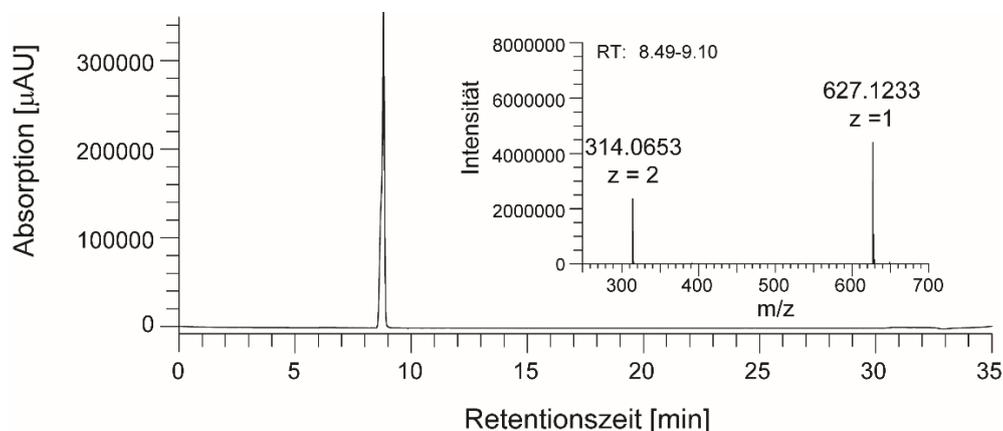


Abbildung 32: LC-MS Analyse des an der HPLC isolierten Produkts des enzymatischen Assays. Berechnete Masse für das erwartete Produkt 2',3'-dd-c-di-AMP (**29**): 627.1225 [M+H]⁺.

Die zwei Diastereomere **30a** und **30b** zeigten eine unterschiedlich schnelle Umsetzung durch CES1c. So war für **30b** die Freisetzung des CDNs **29** unter den gewählten Bedingungen des Assays bereits nach 6 Stunden nahezu vollständig, wohingegen für **30a** auch nach 48 Stunden Inkubation Spuren von *SATE*-maskiertem *Prodrug* detektiert werden konnten (Abbildung 33).

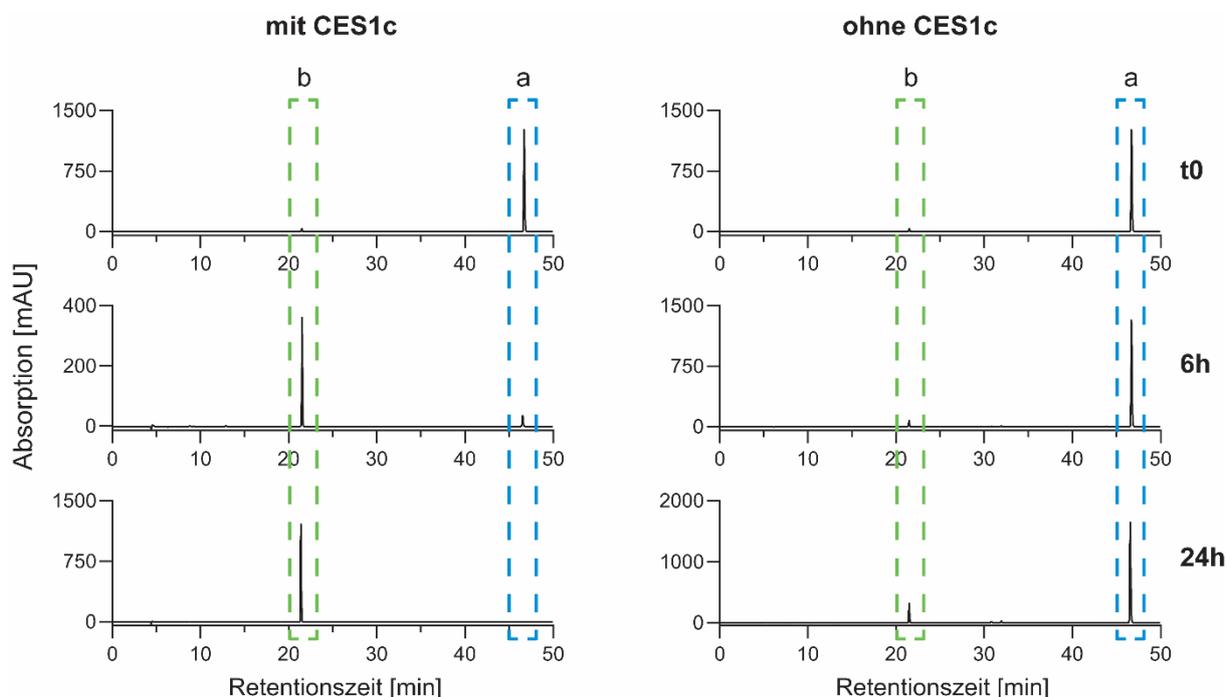


Abbildung 33: HPLC-Ergebnisse des enzymatischen Spaltungs-Assays des zweiten Diastereomers **30b**.

Mit den durch den Carboxylesterase Assay gewonnenen Erkenntnissen war der nächste Schritt, das *SATE Prodrug* in einem komplexeren und biologisch relevanteren System zu testen. Hierfür wurden Zellfütterungsexperimente mit der bereits zuvor beschriebenen THP-1

Reporterzelllinie durchgeführt. Dabei wurden die THP-1-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Verbindung **30** für 24 Stunden inkubiert, anschließend die IFN Expression mittels des Luciferase Assays gemessen und der EC_{50} -Wert analog zur Vorgehensweise in Kapitel 5.1.1 berechnet (Abbildung 34).

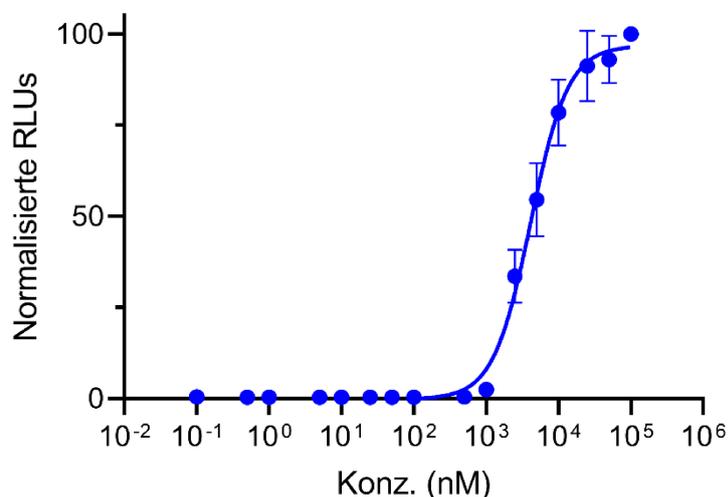


Abbildung 34: EC_{50} Kurve des mono-SATE-Prodrugs **30** ($EC_{50} = 4.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$). Die Daten wurden in Kollaboration mit *Dilara Özdemir* erhoben.

Die Einführung eines SATE-Motivs resultiert in einer deutlich effizienteren Induktion der zellulären Immunantwort ($EC_{50} = 4.2 \mu\text{M}$) gegenüber der Referenzverbindung 2',3'-dd-c-di-AMP **29** ($EC_{50} = 74.4 \mu\text{M}$). Den Erwartungen entsprechend blieb **30** jedoch für die Eignung eine Immunantwort zu stimulieren gegenüber dem von *Dr. Samuele Stazzoni* beschriebene bis-SATE-Prodrug **49** ($EC_{50} = 47.6 \text{ nM}$) im direkten Vergleich weit zurück (Abbildung 35).^[214] Es lässt sich schlussfolgern, dass die hohe Polarität einer einzigen, freien Phosphatgruppe die Zellpermeabilität gegenüber einem vollständig maskierten CDN drastisch reduziert.

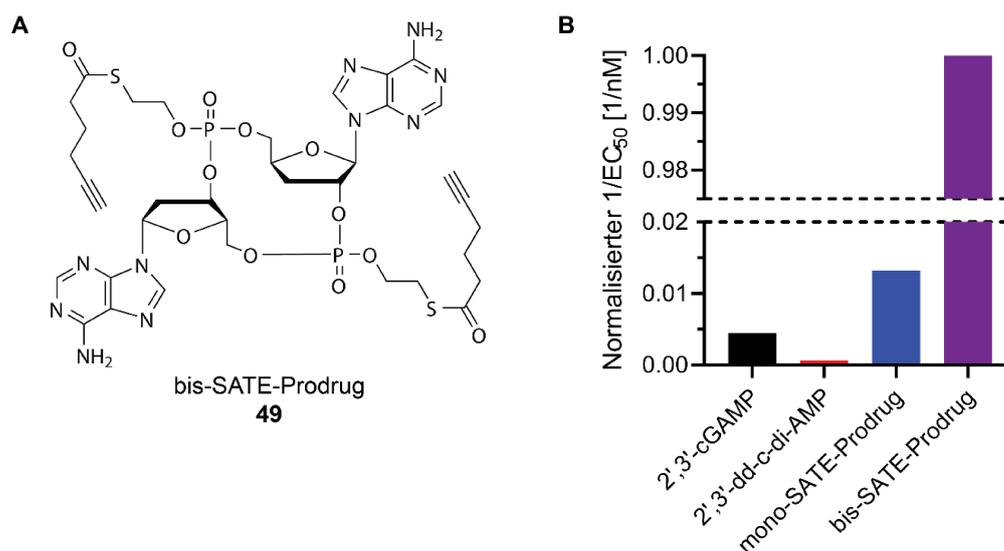


Abbildung 35: A) Chemische Struktur des bis-SATE-Prodrug **49**. **B)** Normalisierte sowie reziproke EC_{50} -Werte als vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Potenzen der Verbindungen 2',3'-cGAMP (**1**), 2',3'-dd-c-di-AMP (**29**), mono-SATE-Prodrug (**30**) und bis-SATE-Prodrug (**49**). Die Daten wurden in Kollaboration mit *Dilara Özdemir* erhoben.

Wie zuvor beschrieben, eignet sich das Design des mono-SATE-*Prodrugs* **30** besonders für die Weiterentwicklung hin zur Anwendung als Antikörper-CDN-Konjugat. Hierzu ist es zunächst erforderlich eine geeignete Methode zu verfolgen, welche die Kupplung des CDN-Analogs an die Oberfläche eines Proteins ermöglicht.

Proteine weisen auf natürliche Art und Weise reaktive Gruppen auf, die seit Jahrzehnten für die Darstellung von Konjugaten aus Proteinen und kleinen Molekülen wie zum Beispiel Farbstoffen und *Cross-Linking* Reagenzien genutzt werden.^[224] Besonders häufig werden Lysine und Cysteine aufgrund der relativ hohen Nucleophilie ihrer Reste (Amin beziehungsweise Thiol) für das Einbringen von Modifikationen verwendet, da diese sehr spezifisch mit *N*-Hydrosuccinimid (NHS) Estern beziehungsweise Maleimiden umgesetzt werden können (Abbildung 36).

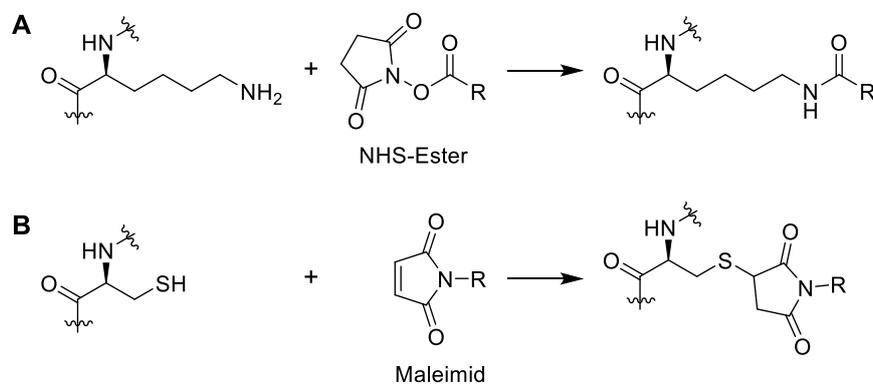


Abbildung 36: Reaktionen für die Konjugation an natürliche Aminosäuren eines Polypeptids. **A)** Kupplung eines Lysin-Rests mit einem NHS-Ester, **B)** Kupplung eines Cystein-Rests mit einem Maleimid.

Das freie Thiol von Cysteinen stellt dabei allgemein die reaktivste funktionelle Gruppe in natürlichen Proteinen dar. Aufgrund der hohen Reaktivität liegen die Reste von Cysteinen jedoch selten frei zugänglich an der Proteinoberfläche, sondern existieren nur in deren oxidierten Form als Disulfidbrücken innerhalb eines Polypeptids oder als Verknüpfung zweier verschiedener Oligomere.^[224] Um Konjugate an Cysteinen zu etablieren, müssen daher häufig die Disulfide zunächst durch Reduktion mit Dithiothreitol (DTT) gespalten oder durch Protein-Engineering artifizell eingeführt werden.^[76, 225] Die artifizelle Einführung reaktiver Gruppen in ein Protein erlaubt die Etablierung einheitlicher, ortsspezifischer Konjugationsstellen, wie dies auch für die Entwicklung von ADCs Anwendung findet.^[226] Die überwiegende Mehrheit aller ADCs, die sich in klinischen Studien befinden, basiert jedoch auf der stochastischen Konjugation der biologisch aktiven Substanz mit den natürlichen, reaktiven Stellen der Antikörperoberfläche.^[76] Hierzu wurden beispielsweise zytotoxische Maytansinoide mit einem NHS-Ester derivatisiert und in einem definierten, molaren Verhältnis mit den Lysinen eines Antikörpers zur Reaktion gebracht.^[227] Da eine Überladung des Antikörpers durch Konjugation der bioaktiven Moleküle an alle verfügbaren Reaktionsstellen häufig negative Auswirkungen auf die Pharmakokinetik mit sich bringt, werden die reaktiven NHS-Ester jedoch meist in einem substöchiometrischen Verhältnis zu den für die Reaktion zur Verfügung stehenden Lysinen eingesetzt. Daraus resultiert eine zufällige Derivatisierung der reaktiven

Reste des Antikörpers, was zur Folge hat, dass das ADC zwar ein bekanntes Zytostatika-zu-Antikörper Verhältnis besitzt, sich jedoch aus einer Vielzahl individueller Konstrukte zusammensetzt.^[228]

Das Prinzip einer stochastischen Konjugation eines CDN-Analogs an einen Antikörper sollte auch im Umfang dieser Arbeit und der Darstellung eines Antikörper-CDN-Konjugats verfolgt werden. Dementsprechend bot sich die Methode der NHS-Ester Kupplung an Lysine an. Hierfür wurde zunächst die Derivatisierung des mono-SATE-*Prodrugs* **30** mit einer Carbonsäure angestrebt, die sich dann durch Umsetzung in einen NHS-Ester aktivieren lässt. Das terminale Alkin des *Prodrug*-Motivs stellt hierfür die geeignete Reaktionsplattform dar. Als Reaktionspartner wurde die kommerziell erhältliche 6-Azidohexansäure **50** ausgewählt, da sich somit die Gesamtlänge des Linkers durch die Click-Reaktion nahezu verdoppelt. Die Länge des Linkers und der daraus resultierende Abstand des enzymatisch spaltbaren Thioesters zur Oberfläche des Antikörpers ist insofern von Bedeutung, da bei zu kleinem Abstand der Zugang von Esterasen zum Thioester sterisch gehindert sein könnte.

Die Click-Reaktion des Alkin-*Prodrugs* mit 6-Azidohexansäure **50** wurde in H₂O/THF unter Verwendung von CuSO₄ als Cu(I) Quelle durch *in situ* Reduktion mit Natriumascorbat (NaAsc) durchgeführt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels LC-MS verfolgt, nach vollständiger Umsetzung das Produkt mittels RP-HPLC aufgereinigt und die Carbonsäure **51** in sehr guten Ausbeuten erhalten. Die hohe Reinheit des Produkts konnte durch LC-MS bestätigt werden (Abbildung 37).

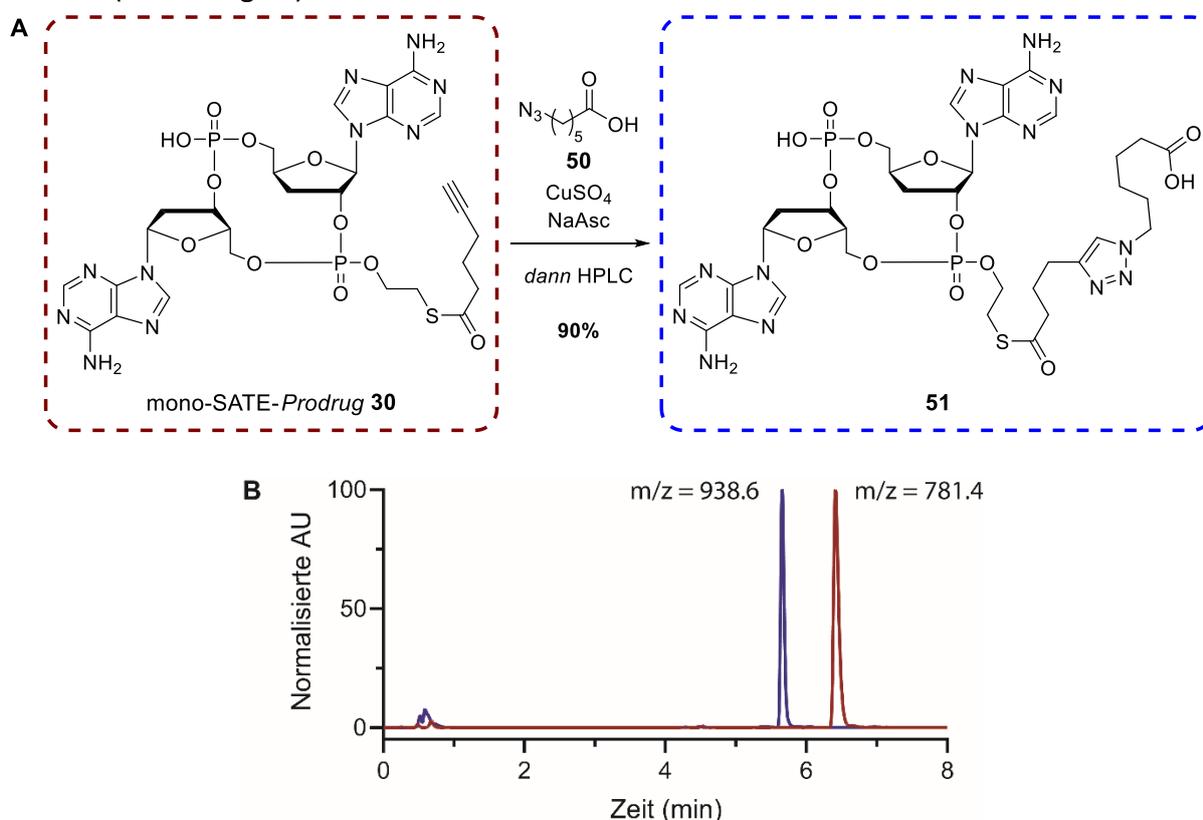


Abbildung 37: Click-Chemie basierte Funktionalisierung des mono-SATE-*Prodrugs* **30**. **A)** Reaktionsbedingungen der Click-Reaktion, **B)** LC-MS Analyse (ESI, Positiv-Modus) des Startmaterials **30** (in rot, berechnet für [M+H]⁺: 781.2) und des geklickten Produkts **51** (in blau, berechnet für [M+H]⁺: 938.3).

Die erhaltene Carbonsäure **51** wurde unter trockenen Bedingungen mit NHS unter Verwendung von EDC-HCl verestert. Die Hydrolyse von NHS-Estern findet in wässriger Umgebung vor allem für pH-Werte im Bereich zwischen 8.0 und 9.0 statt, weshalb für die Aufreinigung des Produkts **52** mittels HPLC Trifluoressigsäure zu den Eluenten H₂O und MeCN hinzugefügt wurde. Die erfolgreiche Umsetzung und Aufreinigung wurde erneut durch LC-MS bestätigt (Abbildung 38).

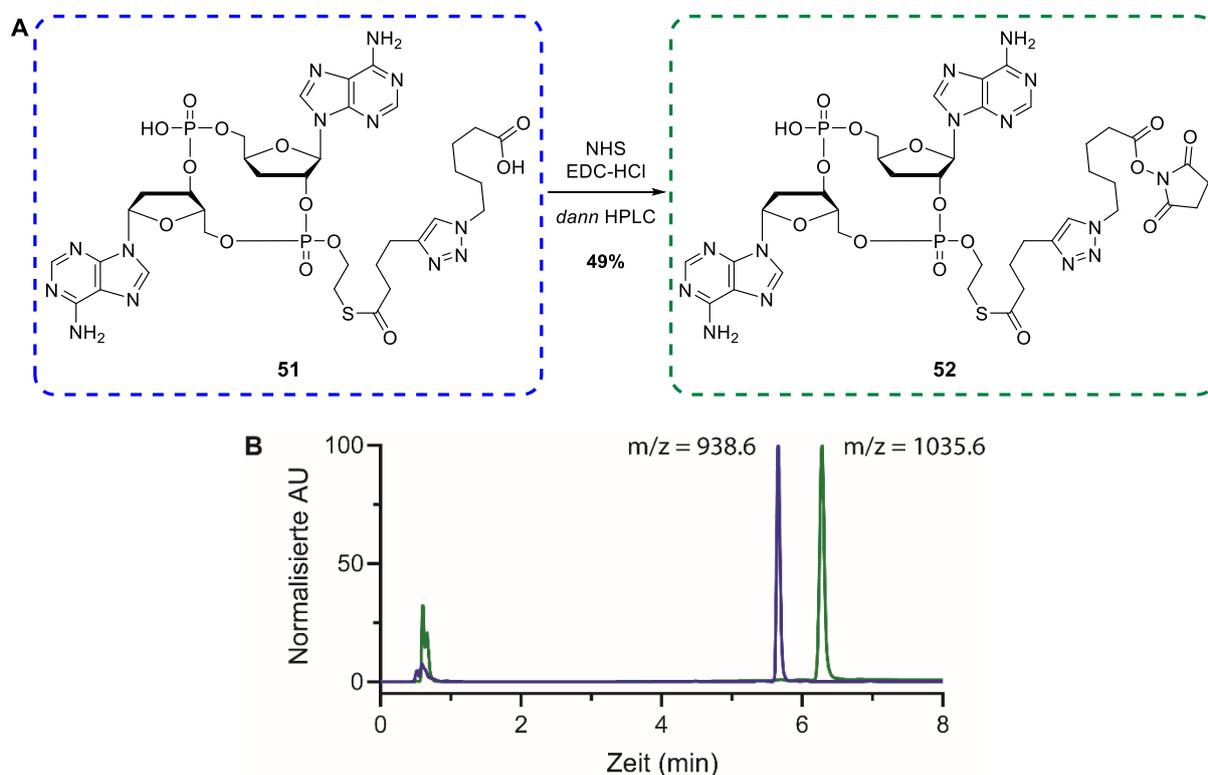


Abbildung 38: Umsetzung des geklickten Prodrugs **51** zum NHS-Ester **52**. **A)** Reaktionsbedingungen der NHS-Veresterung, **B)** LC-MS Analyse (ESI, Positiv-Modus) des Startmaterials **51** (in blau, berechnet für $[M+H]^+$: 938.6) und des NHS-Esters **52** (in grün, berechnet für $[M+H]^+$: 1035.3).

Nach der erfolgreichen Etablierung des synthetischen Zugangs zu einem als NHS-Ester aktivierten CDN-Analog, wurde die stochastische Konjugation exemplarisch an einen Anti-CD40-Antikörper in der Kollaboration mit *Dr. David Drexler* getestet. Hierzu wurde eine Lösung des NHS-Esters **52** in Dimethylacetamid (DMA) zu einer Lösung des Antikörpers in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Puffer) gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Aufreinigung wurde eine Affinitätschromatographie mit Protein A verwendet. Die erhaltenen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert (Abbildung 39A) sowie mittels UV-VIS Spektroskopie untersucht (Abbildung 39B). Für die Fraktionen der Elution, die gemäß des Gels Protein enthalten, wurde ein Absorptionsmaximum bei 260 nm identifiziert, was mit dem Absorptionsmaximum des eingesetzten CDN-Analogs übereinstimmt und auf eine erfolgreiche Konjugation hindeutet.

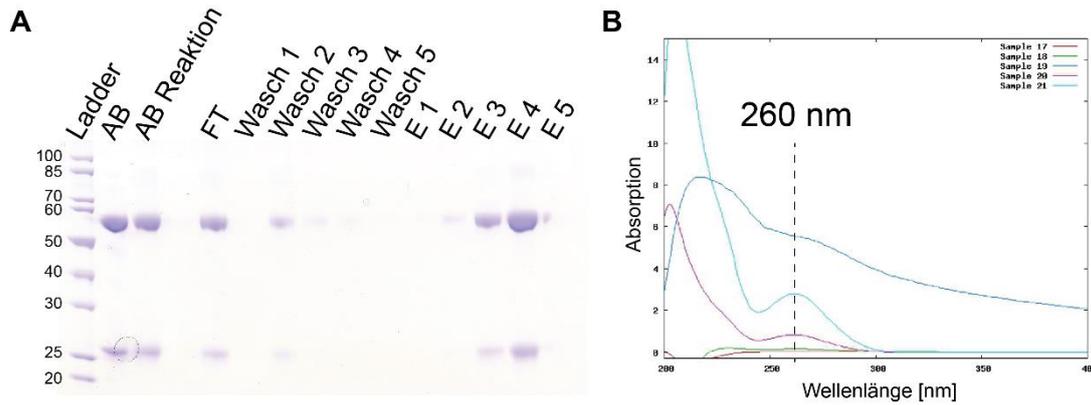


Abbildung 39: **A)** Analyse der Protein A Affinitätschromatographie durch Gelelektrophorese, **B)** UV-VIS Absorption der Elutionsfraktionen (E1 – E5).

Um die Konjugation weiter zu analysieren und verifizieren, wurde eine Esterase-abhängige Abspaltung der CDNs vom Antikörper untersucht. Hierzu wurde das Antikörper-CDN-Konjugat mit CES1c für fünf Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend durch einen Ultrazentrifugalfilter mit einem Größenausschluss von 30 kDa zur Abtrennung des Antikörpers sowie der Esterase filtriert. Das gefundene Absorptionsmaximum war erneut bei 260 nm, wohingegen das Filtrat einer Negativkontrolle der enzymatischen Reaktion an einem unbehandelten Anti-CD40-Antikörper keine solche Absorption aufwies (Abbildung 40). Das abgespaltene Produkt im Filtrat konnte durch hochaufgelöste Massenspektrometrie (HRMS, Direktinjektion) als das erwartete 2',3'-dd-c-di-AMP **29** (berechnet für $C_{20}H_{23}N_{10}O_{10}P_2^-$: 625.1079 [M-H]⁻, gefunden 625.1090) identifiziert werden.

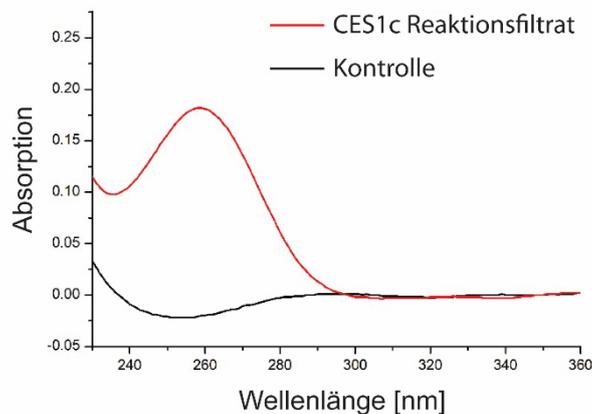


Abbildung 40: UV-VIS Spektren der Filtrate aus der Inkubation von CES1c mit dem durch NHS-Ester behandelten (rot) und unbehandelten (schwarz) Anti-CD40-Antikörper.

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit eine verlässliche Syntheseroute für ein *Prodrug*-modifiziertes cGAMP-Analog auf Basis eines deoxygenierten 2',3'-c-di-AMP entwickelt. Für dieses *Prodrug* wurde gezeigt, dass dieses durch enzymatische Spaltung des *Prodrug*-Motivs ein biologisch aktives cGAMP-Analog freigesetzt werden kann. Die biologische Relevanz des *Prodrugs* wurde in THP-1 Zellen durch STING-abhängige Induktion von IFN-Expression nachgewiesen. Das beschriebene *Prodrug* wurde des Weiteren erfolgreich zu einem NHS-Ester derivatisiert, was die Darstellung eines Antikörper-CDN-Konjugats ermöglichte. Die erfolgreiche Abspaltung des CDNs durch CES1c aus dem Konjugat konnte

ebenfalls bestätigt werden. Untersuchungen, ob dieses Antikörper-CDN-Konjugat die Induktion einer zellulären Immunantwort ermöglicht, sind Aufgabe zukünftiger Forschung.

5.1.4 Photolabiles CDN-*Prodrug*

Aus Gründen der synthetischen Zugänglichkeit wurde bisher die Entwicklung eines *Prodrugs* auf Basis eines desoxygenierten CDNs beschrieben und diskutiert. Im Nachfolgenden wird der synthetische Zugang zu *Prodrugs* auf der Basis von biologisch aktiven CDNs, welche die 2'- und 3'-OH Gruppen besitzen, thematisiert.

Die Entfernung der OH-Gruppen an den Ribosen geht, wie zuvor gezeigt, mit einer verringerten Bindungsaffinität der desoxygenierten Variante 2',3'-dd-c-di-AMP **29** ($k_D = 15.1 \mu\text{M}$) gegenüber 2',3'-c-di-AMP **28** ($k_D = 4.98 \mu\text{M}$) einher. Die Darstellung eines 2',3'-c-di-AMP-*Prodrug* **53** ist demzufolge erstrebenswert (Abbildung 41).

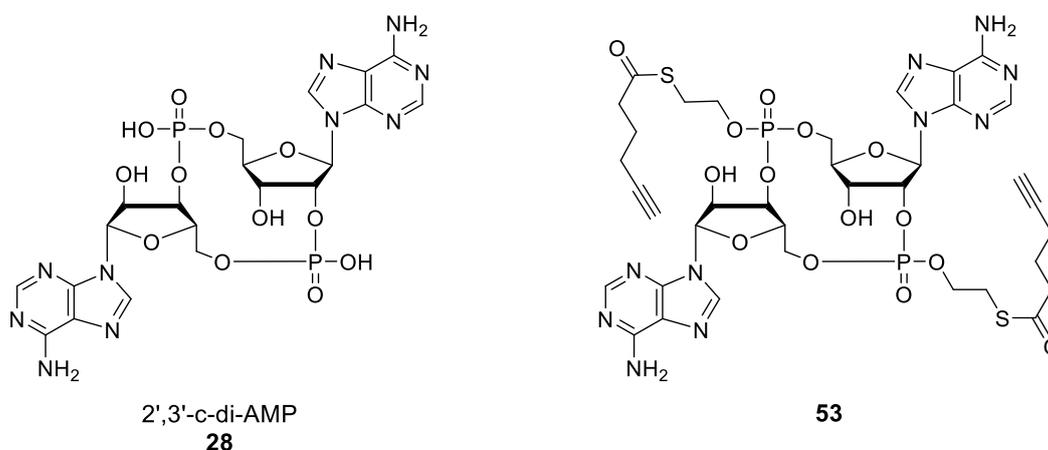
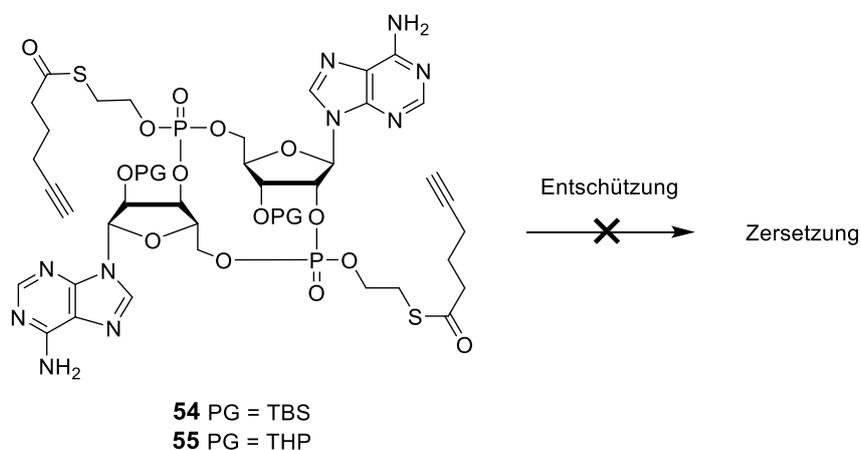


Abbildung 41: Chemische Strukturen von 2',3'-c-di-AMP (**28**) und einem SATE-maskierten *Prodrug*-Derivat (**53**).

Um ein solches *Prodrug* **53** synthetisch zugänglich zu machen, sind für die Hydroxylgruppen der Ribose permanente Schutzgruppen erforderlich, die in einem letzten Schritt abgespalten werden müssen (Schema 7). Im Rahmen dieser Dissertation wurde anfänglich der Zugang über die Nutzung von sauer zu spaltenden Tetrahydropyranyl (THP)-Schutzgruppen versucht, nachdem vorangegangene Studien mit *tert*-Butyldimethylsilyl (TBS)-Schutzgruppen erfolglos blieben.^[214]



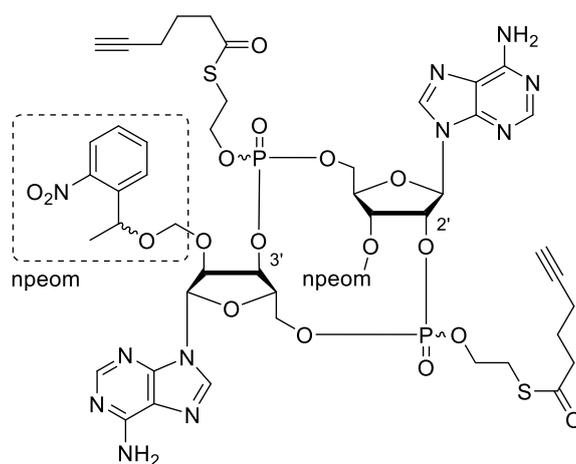
Schema 7: In Zersetzung resultierende finale Entschützung von THP- oder TBS-geschützten Vorläuferverbindungen **54** und **55**.

Die durchgeführten Versuche der Entschützung führten wie auch im Fall der Verwendung von TBS-Schutzgruppen zu komplexen Reaktionsmischungen durch Zersetzung. Da die erhaltenen Zersetzungsprodukte bei diesen Experimenten nicht identifiziert werden konnten, waren eindeutige Schlussfolgerungen zu den Ursachen nicht möglich und machten weiterführende Untersuchungen erforderlich. Zu vermutende Ursachen waren die Inkompatibilität der für die Entschützung benötigten Reagenzien mit dem Thioester des *Prodrug*-Motivs sowie des Phosphortriesters selbst, aber auch die Freisetzung der Hydroxylgruppen in Nachbarschaft zu den Phosphortriestern.

Um den Einfluss von Reagenzien möglichst ausschließen zu können, wurde für eine neue Syntheseroute die Verwendung photolabiler Schutzgruppen in Betracht gezogen. Des Weiteren stellte diese Art von Schutzgruppe eine interessante Möglichkeit dar, um die Hydroxylgruppen, dem *Prodrug*-Konzept folgend, zu maskieren. Bei der Wahl der photolabilen Schutzgruppe wurde daher darauf geachtet, dass diese neben erstrebenswerter Eigenschaften in der Photolyse auch für biologisch relevante Anwendungen geeignet sein sollte.

Zu den allgemein am häufigsten verwendeten photolabilen Schutzgruppen gehören die *o*-Nitrobenzyl-Gruppen.^[212] Auch in Bezug auf biologische und biochemische Anwendungen wurde diese Art von Schutzgruppe trotz bekannter Nachteile, wie der Freisetzung von potentiell toxischen *o*-Nitrosobenzcarbonyl-Verbindungen, bereits mehrfach verwendet.^[229-232] Darüber hinaus stellt diese Art von Schutzgruppe eine der wenigen photolabilen Schutzgruppen dar, für die der ertragreiche, synthetische Zugang zu 2'- oder 3'-OH geschützten Nukleosid-Analoga in Form von [(*R,S*)-1-(2-nitrophenyl)ethoxy]methyl (npeom) Einheiten bereits ausführlich beschrieben ist.^[233-235]

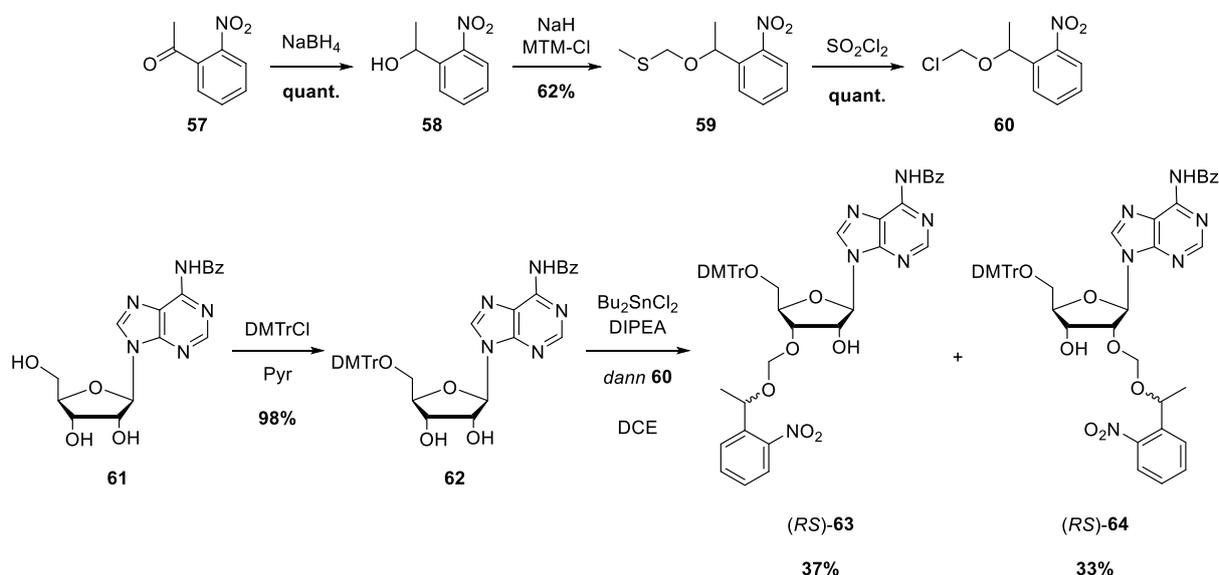
Aufgrund dieser Umstände wurde ein *Prodrug* design, welches neben zwei SATE-Linkern zur vollständigen Maskierung der Phosphate auch zwei npeom-Schutzgruppen zur Maskierung der Hydroxylgruppen besitzt (Abbildung 42). In seiner zyklischen Grundstruktur geht es dabei auf 2',3'-c-di-AMP zurück.



56

Abbildung 42: Struktur des designten 2',3'-c-di-AMP-*Prodrug*s **56** mit zwei SATE-Motiven und zwei photolabilen Schutzgruppen (npeom).

Für die Synthese des in Abbildung 42 gezeigten *Prodrugs* **56** war neben der Einführung der SATE-Linker die Synthese von 2'- beziehungsweise 3'-npeom geschütztem Adenosin von zentraler Bedeutung (Schema 7). Dies stellte die essentielle Grundvoraussetzung dar, um anschließend die SATE-geschützten Phosphortriester in der gewünschten 2',3'-Verknüpfung des CDNs zu etablieren.



Schema 8: Synthese des Chloromethyl-Reagenzes **60** und dessen Verwendung zur Darstellung von 2'-O-beziehungsweise 3'-O-npeom geschützten Adenosin **63** und **64**.

Ausgehend von 2'-Nitroacetophenon (**57**) wurde zunächst durch Reduktion mit NaBH_4 quantitativ der entsprechende Alkohol **58** generiert, welcher nach Deprotonierung durch NaH mit Chlorodimethylsulfid (MTM-Cl) in moderater Ausbeute in den Methylthiomethylether **59** überführt wurde. Durch Umsetzung mit SO_2Cl_2 wurde quantitativ das Chloromethyl-Reagenz **60** erhalten, welches nach Aktivierung des 5'-O-DMTr geschützten N⁶-Benzoyladenins **62** mit Bu_2SnCl_2 und DIPEA die Synthese der 2'-O- sowie 3'-O- substituiertes Regioisomere durch Alkylierung ermöglichte. Die Derivate **(R,S)-63** und **(R,S)-64** (jeweils ein Gemisch zweier Diastereomere) konnten säulenchromatographisch getrennt und über die beschriebene Syntheseroute in insgesamt guten Ausbeuten erhalten werden. Zur Unterscheidung der Regioisomere wurde 2D-NMR Spektroskopie verwendet. Die Messungen wurde in $\text{DMSO-}d_6$ durchgeführt, was den intermolekularen Austausch der Protonen von freien Alkoholen reduziert und zu einer beobachtbaren Kopplungsaufspaltung führt. Die damit im COSY sichtbare 3J -Kopplung des Alkoholprotons zu H-2' beziehungsweise H-3' konnte für die Unterscheidung der Derivate **(R,S)-63** und **(R,S)-64** genutzt werden (Abbildung 43).

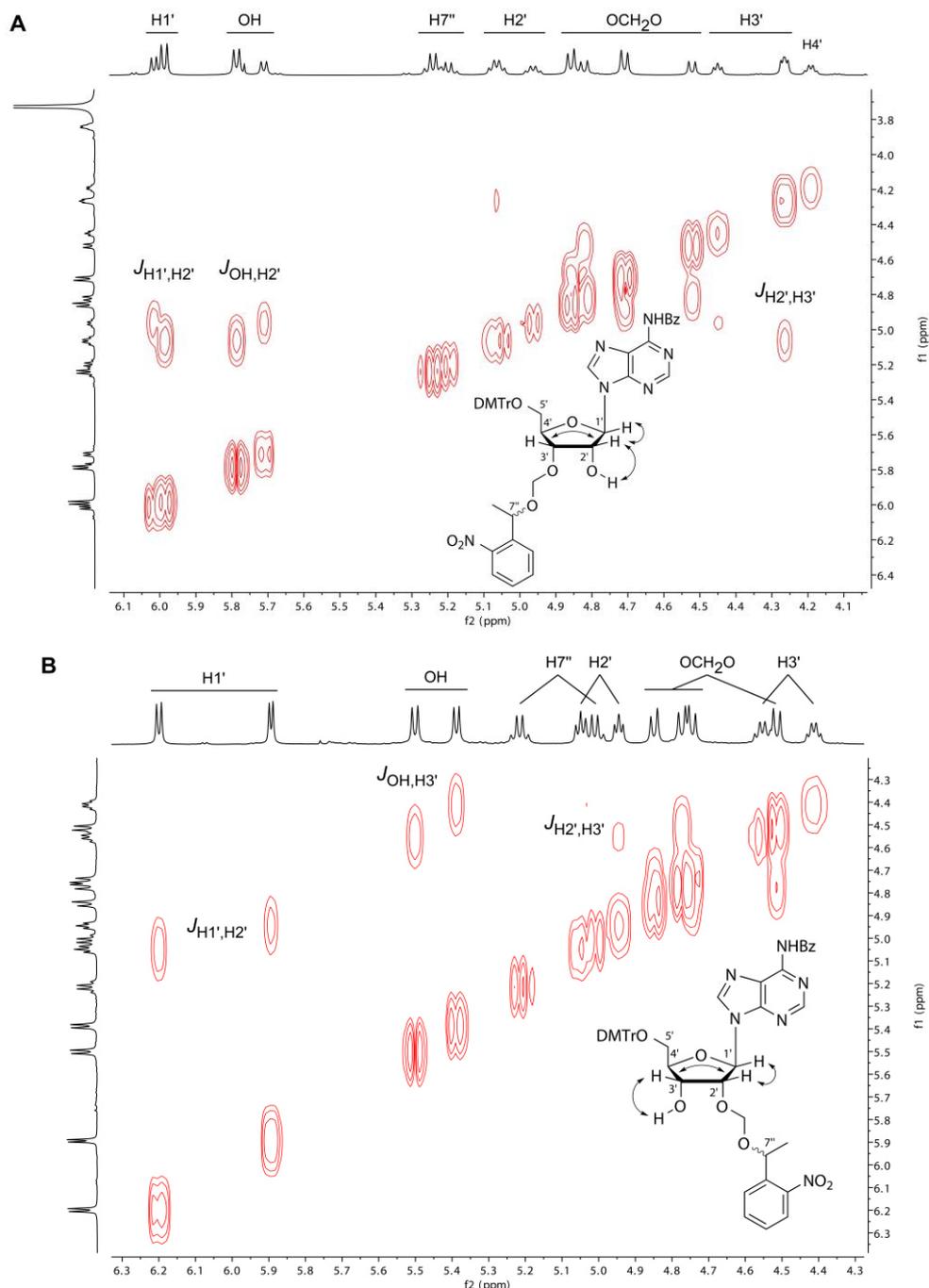
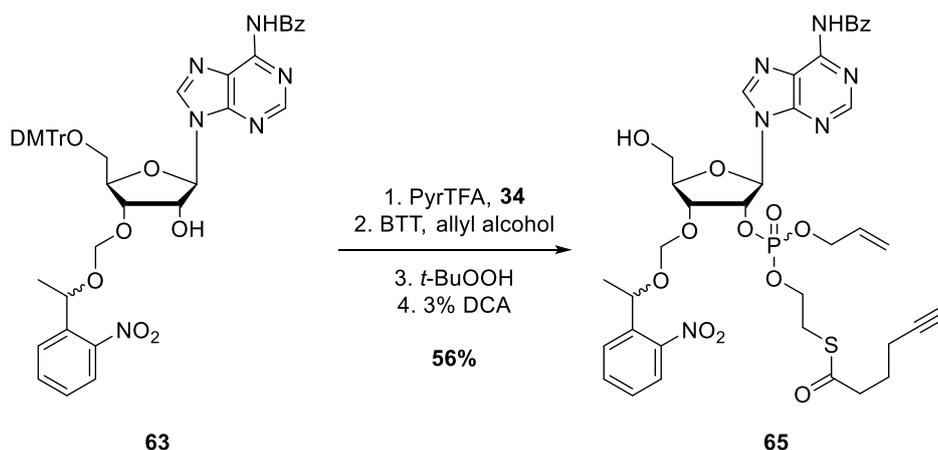


Abbildung 43: Überprüfung der Konnektivität der regioisomeren Verbindungen **A)** (*R,S*)-**63** und **B)** (*R,S*)-**64** mittels COSY. Die in den Strukturen durch Doppelpfeile angedeuteten Kopplungen sind im gezeigten Ausschnitt des COSY-Spektrums sichtbar.

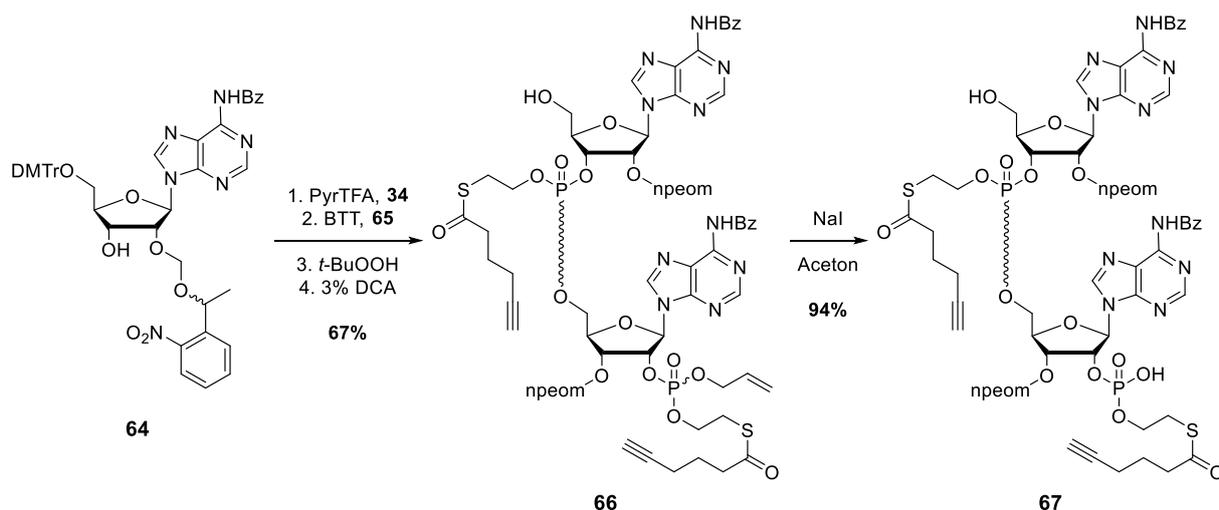
Die NMR-spektroskopische Strukturaufklärung wurde zudem durch die vollständige Zuordnung aller Signale mithilfe zusätzlicher 2D-NMR Methoden (HSQC, HMBC) untermauert (siehe Kapitel 6.3). Auf die exakte Unterscheidung von (*RS*)-**63** und (*RS*)-**64** wurde an diesem Punkt insofern besonders Wert gelegt, da im Fortlauf der Synthese die steigende Zahl von Diastereomeren durch Bildung von Phosphortriestern NMR-basierte Analysen deutlich erschwerte.

Um an der 2'-Position von (*R,S*)-**63** das SATE-modifizierte Phosphat zu generieren, wurde die bereits in Kapitel 5.1.3 beschriebene, mehrstufige Reaktionssequenz angewendet, deren vier Schritte bis auf eine wässrige Aufarbeitung ohne Aufreinigung von Zwischenprodukten erfolgte. Zunächst wurde das SATE-Phosphorodiamidit **34** unter Aktivierung durch Pyridiniumtrifluoroacetat mit (*R,S*)-**63** umgesetzt. Das resultierende Nukleosid-Phosphoramidit wurde direkt mit Allylalkohol unter Verwendung von BTT-Aktivator gekuppelt und die resultierende, trialkylierte P(III)-Spezies durch Oxidation mit TBHP in das Trialkylphosphat überführt. Nach saurer Entschützung der DMTr-Gruppe mit 3%iger DCA in DCM und säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das gewünschte 2'-Phosphat **65** aufgrund der Chiralität von trisubstituierten Phosphaten als Gemisch aus vier Diastereomeren in guter Ausbeute erhalten (Schema 9). Die Trennung der Diastereomere stellte sich als schwierig heraus, weshalb diese Verbindung sowie alle nachfolgend diskutierten Verbindungen mit vier oder mehr Diastereomeren lediglich mittels LC-MS untersucht wurden und auf die Charakterisierung *via* NMR-Spektroskopie verzichtet wurde.



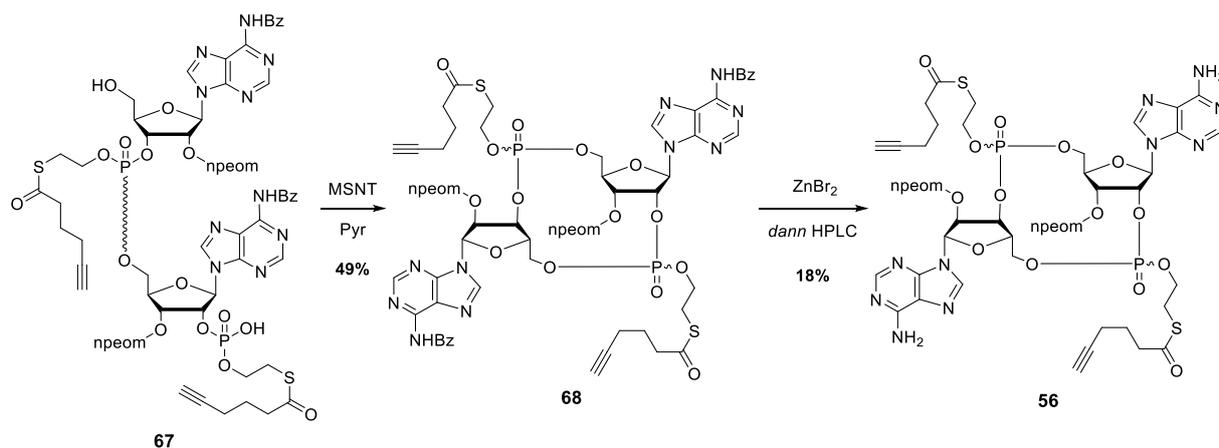
Schema 9: Synthese des 2'-Phosphat **65** ausgehend von **63** durch eine mehrstufige Reaktionssequenz unter Verwendung des SATE-Phosphorodiamidits **34**.

Mit einer vergleichbaren Reaktionssequenz wurde die lineare Kupplung zum 3',5'-verknüpften Dinukleotid durchgeführt. Das Regioisomer (*R,S*)-**64** wurde dazu mit Phosphorodiamidit **34** und Pyridiniumtrifluoroacetat zum SATE-modifizierten 3'-Phosphoramidit umgesetzt. Dieses wurde direkt mit dem Phosphat **65** unter Verwendung von BTT-Aktivator gekuppelt und die erhaltene P(III)-Spezies mit TBHP zu P(V) oxidiert. Es erfolgte erneut eine Entschützung der DMTr-Gruppe mit 3%iger DCA, um das durch zwei *Prodrug*-Linker sowie zwei photolabile Schutzgruppen modifizierte Dinukleotid **66** in sehr guter Ausbeute zu erhalten (Schema 10). Aufgrund von vier Stereozentren handelte es sich bei dem isolierten Produkt um ein untrennbares Gemisch aus 16 Diastereomeren. Nach der Entschützung der Allyl-Schutzgruppe durch Reaktion mit Natriumiodid in refluxierendem Aceton wurde das Rohprodukt **67** gefällt und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.



Schema 10: Synthese des linearen Dinucleotid **66** sowie Entschützung der Allyl-Schutzgruppe zur Darstellung der Vorläuferverbindung **67** für die anschließende Zyklisierung.

Die Zyklisierung wurde mit dem Kondensationsreagenz MSNT zur Aktivierung des Phosphats durchgeführt und das zyklisierte Dinucleotid **68** in moderater Ausbeute erhalten. Die finale Entschützung der Nucleobasen konnte mit einer Lösung von Zinkbromid in Methanol über 24 Stunden durchgeführt werden (Schema 11).



Schema 11: Synthese des angestrebten *Prodrugs* **56** durch Zyklisierung von **67** und Entschützung der Nucleobasen.

Die Aufreinigung des finalen Produkts **56** erfolgte mittels präparativer RP-HPLC unter Verwendung eines Gradienten mit steigendem MeCN-Gehalt in H₂O (50% → 70%) und ermöglichte die Trennung der erwartenden 16 Diastereomere in zwei Peak-Cluster (PC1 und PC2, Abbildung 44). Die Separation einzelner Diastereomere wurde jedoch nicht erzielt.

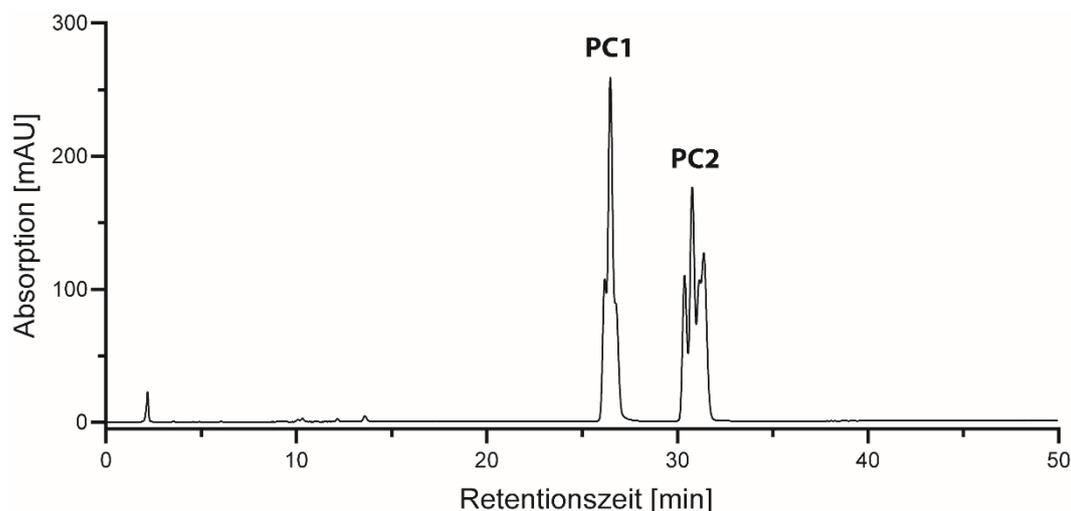


Abbildung 44: HPLC-Analyse des *Prodrugs 56* nach präparativer Aufreinigung mittels RP-HPLC und Auftrennung der 16 erwarteten Diastereomere in zwei Peak-Cluster (PC1 und PC2).

Die Peak-Cluster wurden separiert mittels LC-MS analysiert, um über hochaufgelöste Massenspektrometrie die erfolgreiche Synthese und die Reinheit des gewünschten CDN-*Prodrugs 56* zu verifizieren (Abbildung 45). Löslichkeitsbedingt war es notwendig die Gradienten der HPLC- und LC-MS-Analysen mit einem MeCN-Gehalt von 50% zu starten, was die Möglichkeiten der Methodenentwicklung für eine verbesserte Auftrennung des Diastereomerengemischs limitierte.

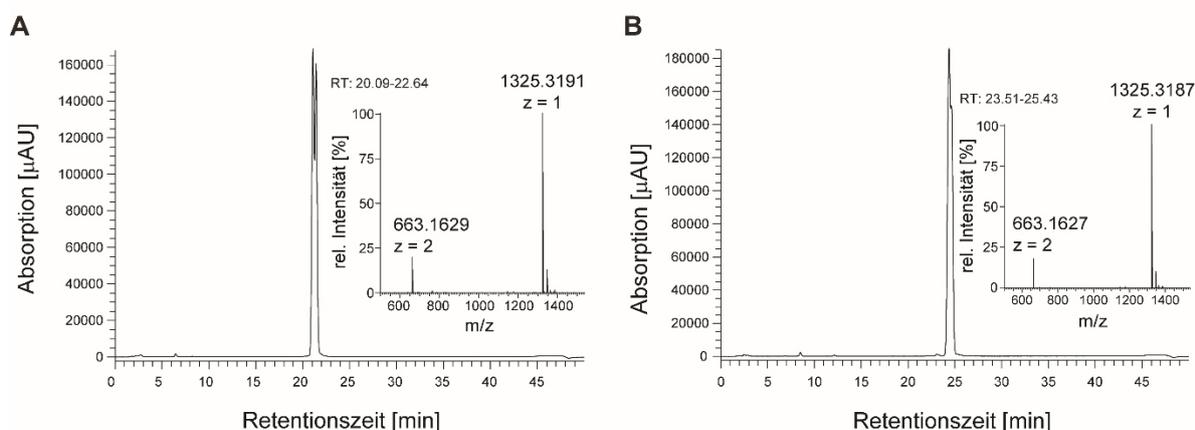


Abbildung 45: LC-MS Chromatogramme sowie Massenspektren der an der HPLC isolierten Peak-Cluster (**A:** PC1, **B:** PC2). Berechnete Masse für das erwartete *Prodrug 56*: 1325.3193 [M+H]⁺.

Mit dem erhaltenen, photolabilen *Prodrug 56* wurde zunächst die Entschützung der npeom-Gruppen durch Bestrahlung untersucht, um an die vorangegangenen Studien der finalen Entschützung mit anderen Schutzgruppen anzuschließen. Da photochemische Reaktionen von einer Vielzahl von Faktoren, inklusive der eingesetzten Substratkonzentration, abhängig sind, wurde zunächst der Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{263\text{nm}} = 40700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, siehe Kapitel 6.3) des synthetisierten *Prodrugs 56* bestimmt.

Um die Photolyse der npeom-Schutzgruppen zu untersuchen, wurde anfänglich ein Bestrahlungsexperiment mit einer laborüblichen UV-Handlampe mit zwei UV-Lichtquellen (260 nm, 366 nm), wie diese für die Untersuchung von

Dünnschichtchromatographien verwendet werden, durchgeführt. Da das bestrahlte Substrat zwei npeom-Gruppen enthält und deren Spaltungsmechanismus zweistufig verläuft, waren mehrere Produkte zu erwarten. Wie in Abbildung 46 gezeigt, wird durch die Bestrahlung einer npeom-Gruppe zunächst die *ortho*-Nitrobenzyl-Einheit abgespalten und es resultiert die Bildung eines Formaldehyd-Halbacetals. In wässriger Umgebung und insbesondere unter sauren Bedingungen folgt ein rascher Abbau des Halbacetals zum Alkohol.^[233, 236]

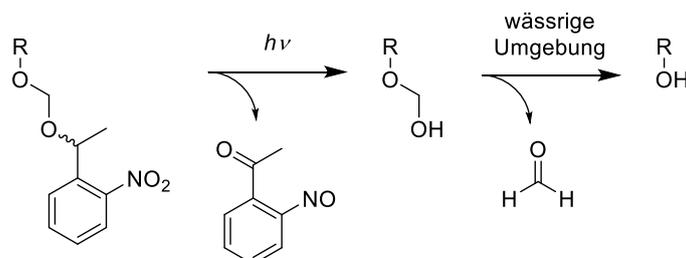


Abbildung 46: Stufenweise Spaltung der npeom-Gruppe durch Bestrahlung und Zerfall des Formaldehyd-Halbacetals in wässriger Umgebung.^[233, 237]

Für das Photolyse-Experiment wurde eine Lösung von **56** (200 μM) in Acetonitril gerührt, für zwei Stunden mit der UV-Lampe (1.89 kJ/cm^2) bestrahlt und der Reaktionsverlauf mittels LC-MS untersucht. Eine Übersicht der denkbaren Produkte sowie der berechneten Massen sind in Abbildung 47A gegeben. Neben den Massen der Formaldehyd-Halbacetale wurden bei den selben Retentionszeiten auch die entsprechenden, freigesetzten Alkohole detektiert (Abbildungen 47C und 47D). Da für die Photolyse in dem gewählten, aprotischen Lösemittel primär die Bildung der Formaldehyd-Halbacetale erwartet wurde, war die Detektion der freien Alkohole überwiegend auf die wässrige sowie leicht saure Umgebung des verwendeten RP-LC-Systems zurückzuführen. Die Vielzahl der erhaltenen Produkte ließ sich im Wesentlichen in drei Kategorien unterteilen. Neben der Ausgangsverbindung (**a**) wurden verschiedene Spezies der einfach (**b₁₋₄**) sowie zweifach (**c₁₋₄**) npeom-entschützten Spezies erhalten (Abbildung 47D).

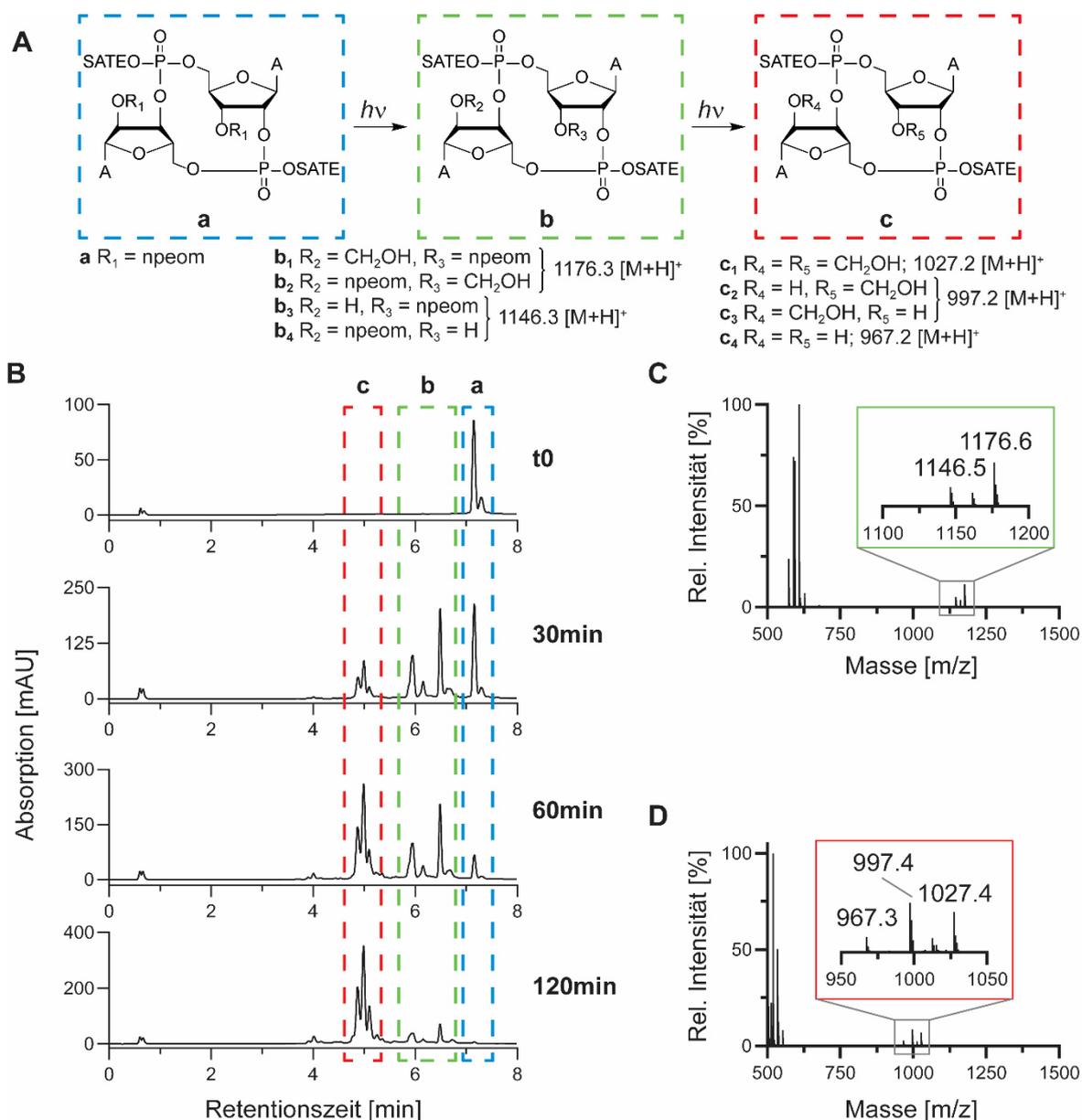


Abbildung 47: LC-MS Analyse des Photolyse Experiments. **A)** Übersicht der zu beobachtenden Spezies des Startmaterials (a, in blau), der einfach (b, in grün) sowie zweifach (c, in rot) npeom-entschützten Verbindungen sowie die für den ESI-positiv Modus berechneten Massen. **B)** LC-MS Chromatogramme bei t_0 sowie nach 30, 60 und 120 min Bestrahlung. **C)** Exemplarisches Massenspektrum (ESI, positiv) für den Retentionsbereich von b. **D)** Exemplarisches Massenspektrum (ESI, positiv) für den Retentionsbereich von c.

Mithilfe der erhobenen LC-MS-Daten konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine vollständige Entschützung der *ortho*-Nitrobenzyl-Einheit für das gewählte Setup innerhalb von zwei Stunden erfolgte. Im Anschluss an die Photolyse in MeCN sollte die Zersetzung der erhaltenen Formaldehyd-Halbacetale und somit die Freisetzung der Hydroxylgruppen an den Ribosen des CDN-*Prodrugs* näher untersucht werden. Hierzu wurde Wasser zu der Lösung des Photolyse-Produkts (100 μM Endkonzentration in 1:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$) gegeben, bei Raumtemperatur für vier Tage inkubiert und regelmäßig mittels LC-MS untersucht (Abbildung 48A). In einem Kontrolleexperiment wurde die Ausgangsverbindung **56**, die keiner Bestrahlung ausgesetzt war, in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ inkubiert (Abbildung 48B).

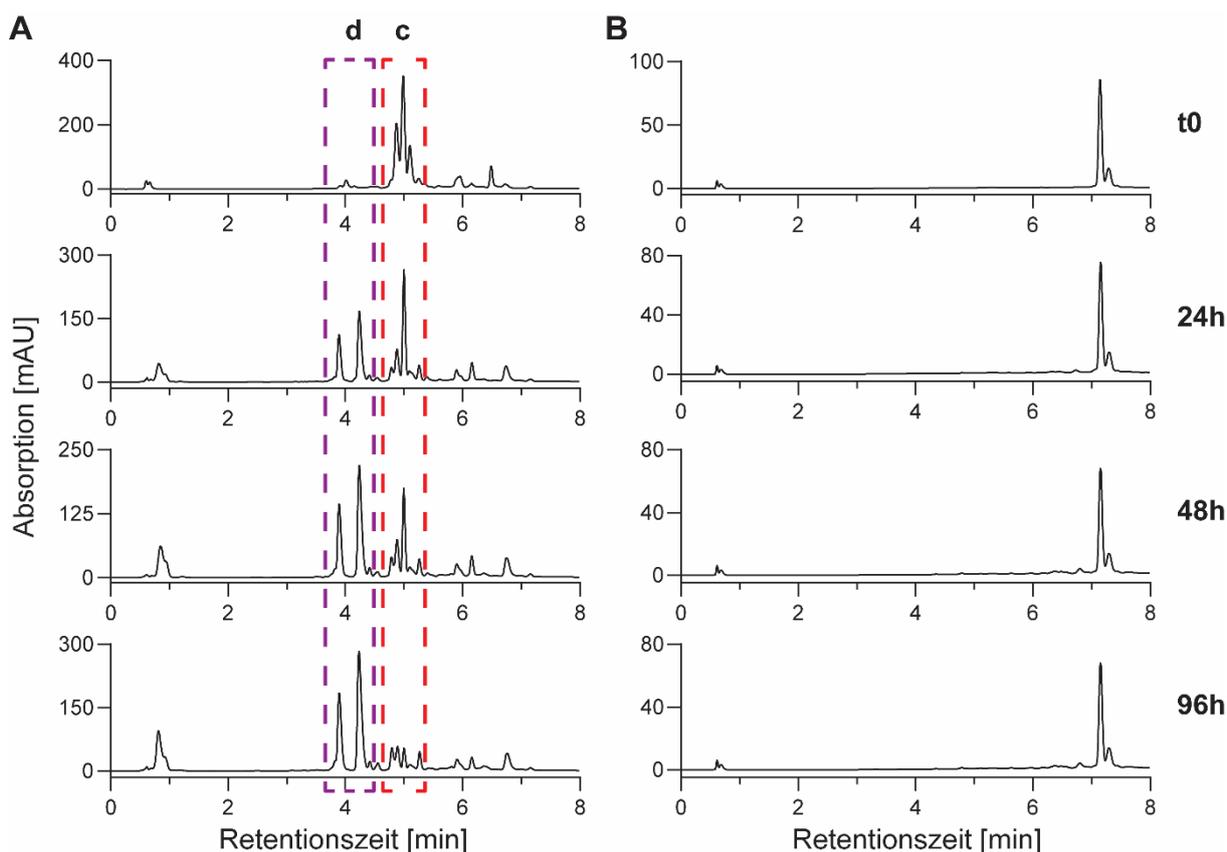


Abbildung 48: LC-MS Chromatogramme bei t_0 sowie nach 24, 48 und 96 h Inkubation in $H_2O/MeCN$ bei Raumtemperatur vom **A**) Photolyse Produkt (c, in rot) sowie der neuen Spezies (d, in lila) und **B**) unbestrahltem Startmaterial **56**.

Durch Zugabe von Wasser war nach 24 Stunden deutlich die Umsetzung des Photolyse Produkts (c) in neue Verbindungen (d) zu beobachten. Nach 96 Stunden war diese Umsetzung nahezu vollständig. Die gefundenen Massen im ESI-Positivmodus ($m/z = 502.3$ und $m/z = 1003.4$) deuteten jedoch an, dass es sich bei der neu gebildeten Spezies nicht um das angestrebte, vollständig npeom-entschützte CDN-*Prodrug* **53** handelte. Stattdessen konnten die detektierten Massen plausiblen Zersetzungsprodukten zugeordnet werden, die eine Spaltung des Dinukleotids zu Mononukleotiden aufzeigten (Abbildung 49). Massen, die eine Abspaltung des SATE-Motivs andeuten, konnten für die Hauptprodukte der Zersetzung (d) nicht identifiziert werden.

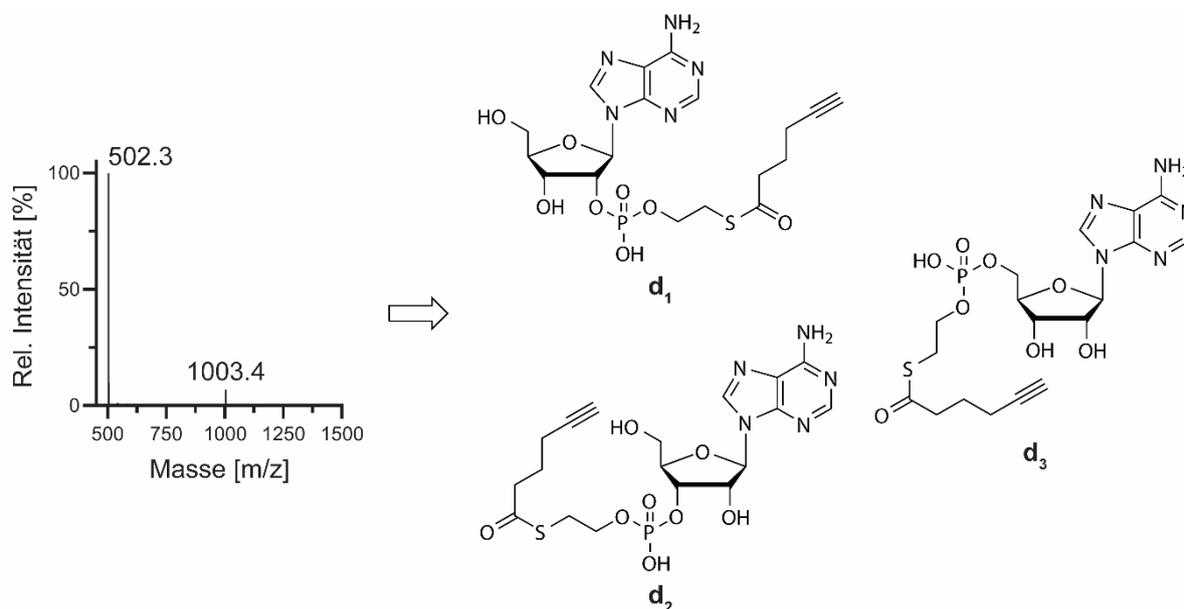


Abbildung 49: Exemplarisches Massenspektrum (ESI, positiv) für den Retentionsbereich von d (siehe Abbildung 48A) und zugeordnete, plausible Zersetzungsprodukte d_1 – d_3 (berechnet für $[M+H]^+$ = 502.1; für $[2M+H]^+$ = 1003.2).

Da sowohl die Ausgangssubstanz **56** als auch deoxygenierte Derivate wie das mono-SATE-*Prodrug* **30** aus dem Kapitel 5.1.3 eine hohe Stabilität in wässriger Umgebung aufwiesen, war die Schlussfolgerung naheliegend, dass sich die Instabilität erst durch die Freisetzung der 2'- beziehungsweise 3'-OH Gruppe ergibt. Dies ließe sich auch mit den zu Beginn dieses Kapitels beschriebenen Schwierigkeiten bei der Verwendung von Schutzgruppen wie THP oder TBS im finalen Entschützungsprozess in Einklang bringen. Da im Rahmen dieser Arbeit die Aufklärung des Zersetzungsmechanismus nicht Teil der Zielsetzung war, soll an dieser Stelle hervorgehoben werden, dass eine vollständige Charakterisierung der Zersetzungsprodukte nicht vorgenommen wurde. Die gezeigten Strukturen und nachfolgend diskutierter Mechanismus leiten sich somit zwar von Beobachtungen ab, sind jedoch als Hypothese zu betrachten.

In Folge der Freisetzung der sekundären Alkohole wäre ein nukleophiler Angriff auf den Phosphortriester denkbar, der zu einer Ringöffnung und letztendlich zur Spaltung des Dinukleotids in zwei SATE-modifizierte Adenosin-2',3'-monophosphate (**69**) führen kann. Alternativ führt der Angriff zu 2',3'-Isomerisation oder zur Eliminierung des SATE-Linkers, wobei Letzteres aufgrund des gefundenen LC-Chromatogramms und zugehöriger Massenspektren nicht den favorisierten Reaktionsverlauf widerzuspiegeln scheint. Kommt es zur Ringöffnung und Spaltung des Dinukleotids, wird ein fünfgliedriger, zyklischer Phosphortriester **69** erhalten. Für solche Phosphortriester wurde eine rasche Ringöffnung unter basischen Bedingungen ausführlich beschrieben,^[238-239] aber auch in Wasser/Acetonitril ohne Zusatz von Base beobachtet.^[240] Die Hydrolyse von **69** zu den zwei Zersetzungsprodukten d_1 und d_2 erscheint somit naheliegend und deckt sich mit der Beobachtung, dass zwei dominante Signale mit ähnlicher Retentionszeit (Bereich d) im LC-Chromatogramm erhalten wurden. Eine Übersicht des möglichen Mechanismus ist in Abbildung 50 zusammengefasst. Eine mechanistische Herleitung für d_3 ist hiermit nicht gegeben.

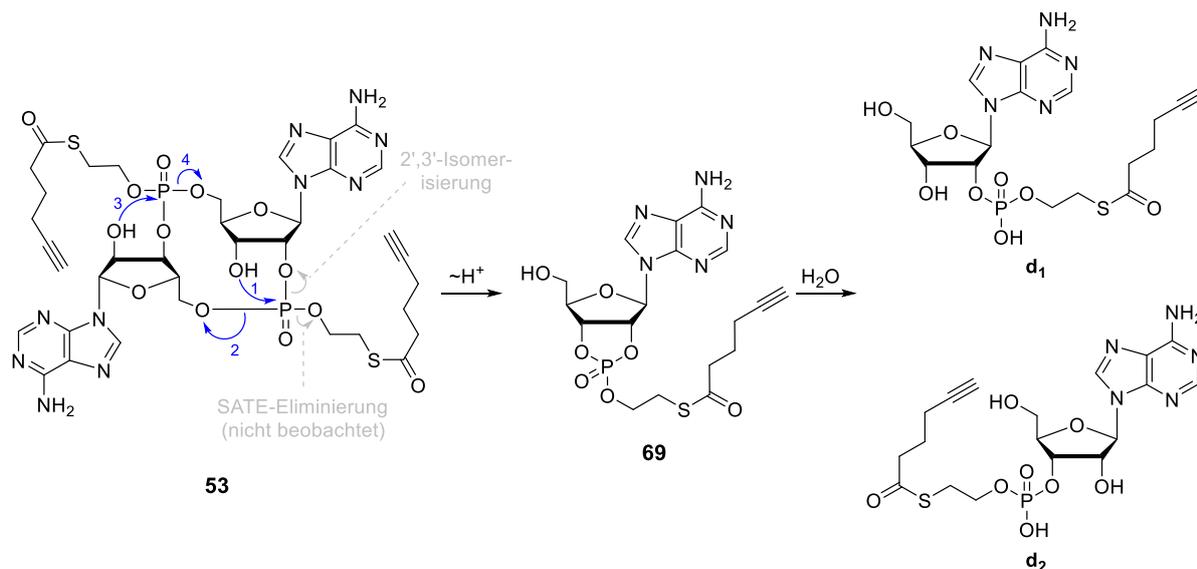


Abbildung 50: Schematische Darstellung eines möglichen Mechanismus zur Generierung der Zersetzungsprodukte **d1** und **d2**.

Aufgrund der Instabilität des photolysierten Produkts **53** in wässriger Umgebung, gestaltete sich eine saubere Isolation des Produkts mittels RP-HPLC als schwierig und auch eine Anwendung in Zellfütterungsexperimenten erschien wenig vielversprechend. Stattdessen wurde angestrebt, die Verbindung **56** als photolabiles *Prodrug* zu verwenden. Die zugrundeliegende Idee war, das *Prodrug* an THP-1-Zellen zu verfüttern, die Spaltung der SATE-Motive durch zelleigene Esterasen abzuwarten und erst dann durch Bestrahlung der Zellen die *npeom*-Schutzgruppen zu entfernen. Diese Strategie sollte eine zeitlich und räumlich kontrollierbare Freisetzung des biologisch aktiven 2',3'-c-di-AMPs (**28**) ermöglichen.

Um die Anwendung dieses Konzepts zu untersuchen, wurde die Photolyse von **56** als 10 μM -Lösung in farblosem Nährmedium durchgeführt und mittels analytischer HPLC untersucht. Für die Vergleichbarkeit verschiedener Bedingungen wurde die Abnahme der Ausgangsverbindungen **56** mit zunehmender Bestrahlungszeit in Betracht gezogen.

Im Zuge der Probenvorbereitung für die Analyse mittels RP-HPLC war zunächst die Etablierung einer geeigneten Extraktionsmethode des *Prodrugs* **56** aus Nährmedium notwendig. Eine gängige Methode für die Extraktion aus Nährmedium, aber auch aus Zelllysat, ist die Verwendung von Acetonitril, was bei Zentrifugation in der Kälte eine Phasentrennung ergeben sollte. Zwar konnte für den Fall, dass gute Phasentrennung erhalten wurde, eine Extraktion von 37% des eingesetzten Materials erzielt werden, jedoch stellte sich regelmäßig keine oder eine von Probe zu Probe stark schwankende Phasentrennung ein. Diese Problematik der schlechten Reproduzierbarkeit in der Durchführung veranlasste die Suche nach einer alternativen Extraktionsmethode. Die häufig für DNA und RNA verwendete Chloroform-Phenol-Extraktion wurde für das photolabile *Prodrug* **56** als ungeeignet befunden. Stattdessen wurde eine Extraktion mit Ethylacetat/Acetonitril (1:1) entwickelt, welche mit guter Reproduzierbarkeit die Extraktion von 46% des eingesetzten Materials ermöglichte und zugleich eine strikte Abtrennung von Bestandteilen des Nährmediums erlaubte, die für HPLC-basierte Analysemethoden ungeeignet sind (Abbildung 51). Als Kontrolle in diesen

Experimenten diente das Signalintegral der HPLC-Analyse einer definierten Stoffmenge von **56**, welche auch für die Extraktionstests als 10 μM -Lösung in Nährmedium zum Einsatz kam.

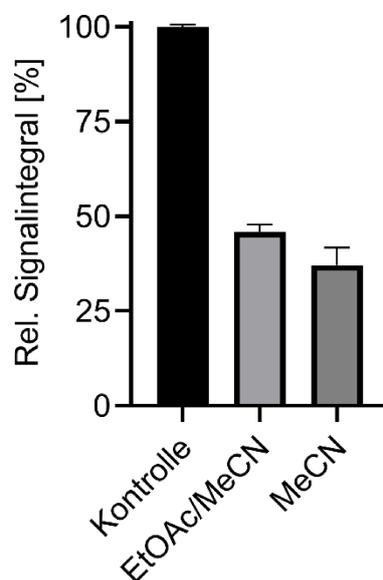


Abbildung 51: Vergleich der relativen Signalintegrale von 5 nmol **56** (Kontrolle, 100%) mit den aus 500 μL einer 10 μM -Lösung extrahierten Mengen von **56** durch EtOAc/MeCN- (46%) beziehungsweise MeCN-Extraktion (37%). Die Daten wurden in Kollaboration mit *Dilara Özdemir* erhoben.

Anschließend wurde ein Stabilitätstest des *Prodrugs* **56** in Nährmedium durchgeführt. Hierfür wurde **56** in Nährmedium für 24 und 48 Stunden bei 37 °C inkubiert, extrahiert und mittels analytischer RP-HPLC untersucht (Abbildung 52).

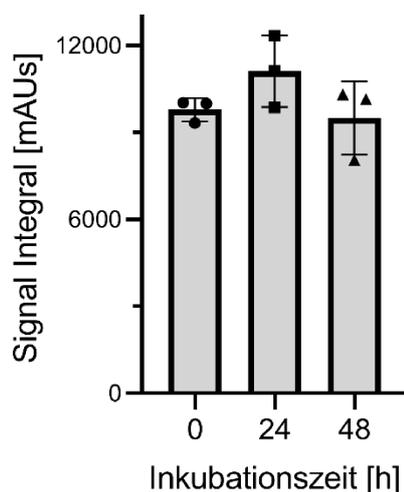


Abbildung 52: Ergebnisse der analytischen RP-HPLC zum Stabilitätstest des *Prodrug* **56** in Nährmedium bei 37 °C über 48 Stunden.

Aus dem Stabilitätstest wurde ersichtlich, dass *Prodrug* **56** eine hohe Stabilität im verwendeten Nährmedium aufweist. Um die Abspaltung der *npeom*-Gruppen unter Bedingungen zu testen, die auch für die Anwendung in Zellen möglichst relevant sind, wurden Lösungen von **56** (10 μM) in farblosem Nährmedium in einer 96-Well Platte mit einer UV-

Lampe bei 312 nm (26.2 nJ/cm^2 , gemittelt) für bis zu 20 Minuten bestrahlt. Die Auswertung der HPLC-Daten (Abbildung 53A) ergab, dass unter diesen Bedingungen eine rasche Spaltung von mindestens einer npeom-Gruppe erfolgt. So war nach fünf Minuten 54% und nach 20 Minuten nur noch 13% der Ausgangssubstanz detektierbar. Allerdings zeigte ein Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen (MTT-Test), dass die Viabilität von THP-1-Zellen unter diesen Bedingungen stark beeinträchtigt wurde (Abbildung 53B).

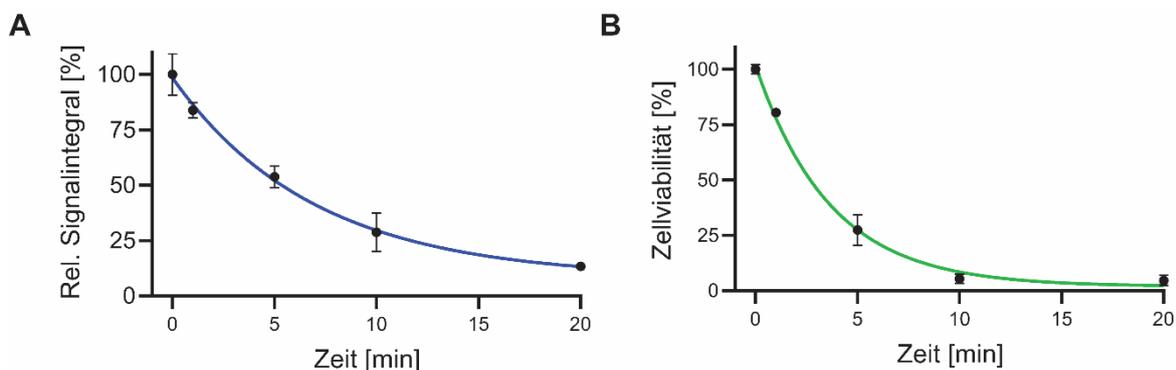


Abbildung 53: A) Ergebnisse der analytischen RP-HPLC nach Bestrahlung mit einer UV-Lampe (312 nm) von **56** über 20 Minuten. **B)** Durch MTT-Assay bestimmte Viabilität von THP-1-Zellen nach Bestrahlung mit einer UV-Lampe (312 nm) über 20 Minuten. Die Daten wurden in Kollaboration mit *Dilara Özdemir* erhoben.

Die Bestrahlung mit 312 nm war dementsprechend nicht zielführend. Stattdessen wurde eine Bestrahlung mit einer anderen UV-Lampe bei 365 nm vorgenommen. Für Bestrahlungen mit Wellenlängen dieses Bereichs (350-365 nm) wurden bereits erfolgreiche Anwendung photolabiler *Prodrugs* basierend auf sehr ähnlichen Nitrobenzyl-Schutzgruppen in Pflanzenzellen und humanen Brustkrebszellen beschrieben.^[241-242] Bestrahlungen des *Prodrugs 56* mit der zur Verfügung stehenden UV-Lampe (365 nm, 2.54 nJ/cm^2) zeigten jedoch auch nach 3,5 Stunden keine signifikante Photolyse der npeom-Gruppen (Abbildung 54). Als Ursache ist hierfür vermutlich vor allem die verwendete UV-Lampe zu nennen, da beispielsweise für die fast 50%ige Photolyse eines *o*-Nitrobenzyl-basierten *Anticancer Prodrugs* innerhalb von zwölf Minuten eine wesentlich stärkere UV-Lampe (16 mJ/cm^2) verwendet wurde.^[242]

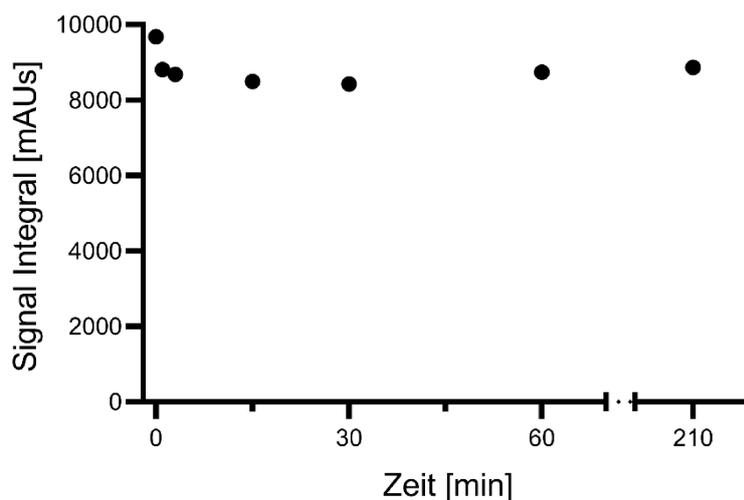


Abbildung 54: Ergebnisse der analytischen RP-HPLC nach Bestrahlung mit einer UV-Lampe (365 nm) des *Prodrugs* **56** über 210 Minuten. Die Daten wurden in Kollaboration mit *Dilara Özdemir* erhoben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Synthese eines durch UV-Licht freisetzbaren *Prodrugs* erfolgreich durchgeführt werden konnte. Studien zur Bestrahlung in Acetonitril und die anschließende Zugabe von Wasser konnten zeigen, dass eine intrinsische Instabilität des SATE-modifizierten Photolyse-Produkts **53** eine Anwendung in Zellfütterungsexperimenten ausschließt. Eine Anwendung von **56** als photolabiles *Prodrug* ist denkbar, erfordert jedoch speziell in Bezug auf Bestrahlungen mit möglichst langwelligem UV-Licht weiterführende Studien mit leistungsstärkeren UV-Lampen oder aber die Verwendung photolabiler Schutzgruppen mit einem rotverschobenen Absorptionsmaximum.

5.1.5 Ausblick zu CDN-*Prodrugs*

Mit dem Design und der Entwicklung einer robusten Synthese der Verbindungen von **30** und **56** konnten zwei neuartige CDN-*Prodrugs* hergestellt werden, welche mit Thioester-basierten Linkern maskierte Phosphatverknüpfungen enthalten und intrazellulär durch Esterasen selektiv in die freien Phosphordiester der CDNs umgesetzt werden können. Durch die terminalen Alkin-Funktionalitäten des *Prodrug*-Motivs können diese Konstrukte für zelltypspezifisches *Targeting* modifiziert werden und durch den modularen Aufbau in einem späten Stadium der Synthese verschiedenen Anforderungen angepasst werden.

Für das mono-SATE-*Prodrug* **30** konnte die stochastische Kupplung mit den Lysinresten einer Antikörperoberfläche erfolgreich durchgeführt werden sowie die Spaltung durch eine Carboxylesterase und die Freisetzung des biologisch aktiven 2',3'-dd-c-di-AMP gezeigt werden. Die Evaluierung, ob sich durch stochastische Konjugation ein funktionales Antikörper-CDN-Konjugat generieren lässt, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung. Neben der Interaktion des Antikörper-CDN-Konjugats mit dem entsprechenden Antigen bleibt darüber hinaus zu untersuchen, ob nach Rezeptor-vermittelter Endozytose eine effiziente Freisetzung der CDNs ins Cytosol erfolgt. Einen besonders kritischen Schritt stellt dabei allgemein bei ADCs der Austritt aus dem Endosom oder Lysosom dar.^[78] Aufgrund des modularen Designs des

CDN-Prodrugs ließen sich relativ schnell und einfach Anpassungen vornehmen, um diesen Anforderungen gerecht zu werden. Beispielsweise wäre denkbar, dass sich durch die Einführung eines durch Peptidasen abbaubaren Valin-Citrullin (Val-Cit) Linkers mittels Click-Chemie ein beschleunigter lysosomaler Austritt erzielen lassen könnte.^[243]

Mit der Entwicklung des photolabilen *Prodrugs* **56** wurde versucht auch CDN-*Prodrugs*, die im Gegensatz zu dem für das mono-SATE-Prodrug verwendeten, desoxygenierten CDN-Grundgerüst, Hydroxylgruppen an den Zuckereinheiten aufweisen, synthetisch zugänglich zu machen. Es wurde jedoch ersichtlich, dass das 2',3'-c-di-AMP-*Prodrug* nach Photolyse aufgrund intrinsischer Instabilität, die aus der Freisetzung einer nukleophilen Funktionalität in räumlicher Nähe zu einem Phosphortriester resultiert, für die Anwendung in biologischen Systemen ungeeignet ist. Zugleich eröffnet die zeitlich und räumlich kontrollierbare Freisetzung einer durch Licht spaltbaren *Prodrug* Komponente interessante Ansätze für zusätzliche Spezifität im *Targeting*. Die ersten Photolyse-Experimente zeigten allerdings, dass entweder ein Bestrahlungssetup mit deutlich höherer Strahlungsintensität ($>10 \text{ mJ/cm}^2$) bei 365 nm oder aber die Verwendung von photolabilen Schutzgruppen mit rotverschobenen Absorptionsmaximum notwendig ist, um die Zellviabilität weniger stark zu beeinträchtigen.

5.1.6 Synthese fluoreszenter cGAMP-Analoga

Abseits von den Synthesen und Studien zu *Prodrug*-Analoga wurde der synthetische Zugang von fluoreszenten cGAMP-Analoga basierend auf Thieno[3,4-*d*]-pyrimidin untersucht. Arbeiten hierzu wurden bereits veröffentlicht und sind mit freundlicher Genehmigung auf den folgenden Seiten dargestellt (Copyright 2022, publiziert durch Wiley-VCH GmbH).

Mein Beitrag war die Konzeption der Syntheseroute, die Durchführung der Synthese und Entwicklung von Strategien zur Aufreinigung der Zielverbindungen.

Chemical Synthesis of the Fluorescent, Cyclic Dinucleotides $c^{th}GAMP$

Simon Veth⁺,^[a] Adrian Fuchs⁺,^[a] Dilara Özdemir⁺,^[a] Clemens Dialer,^[a] David Jan Drexler,^[b] Fabian Knechtel,^[a] Gregor Witte,^[b] Karl-Peter Hopfner,^[b] Thomas Carell,^{*[a]} and Evelyn Ploetz^{*[a]}

The cGAS-STING pathway is known for its role in sensing cytosolic DNA introduced by a viral infection, bacterial invasion or tumorigenesis. Free DNA is recognized by the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) catalyzing the production of 2',3'-cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate (2',3'-cGAMP) in mammals. This cyclic dinucleotide acts as a second messenger, activating the stimulator of interferon genes (STING) that finally triggers the transcription of interferon genes and inflammatory cytokines. Due to the therapeutic potential of this pathway, both the production and the detection of cGAMP via

fluorescent moieties for assay development is of great importance. Here, we introduce the paralleled synthetic access to the intrinsically fluorescent, cyclic dinucleotides 2',3'- $c^{th}GAMP$ and 3',3'- $c^{th}GAMP$ based on phosphoramidite and phosphate chemistry, adaptable for large scale synthesis. We examine their binding properties to murine and human STING and confirm biological activity including interferon induction by 2',3'- $c^{th}GAMP$ in THP-1 monocytes. Two-photon imaging revealed successful cellular uptake of 2',3'- $c^{th}GAMP$ in THP-1 cells.

Introduction

The innate immune system of eukaryotes is one of the first defense lines against invading pathogens.^[1] To detect pathogens, the discrimination of molecular patterns from "self" (host) and "nonself" (e.g., microorganisms) is a fundamental process and relies on an array of pattern recognition receptors (PRRs). These PRRs are cell surface or intracellular receptors that distinguish pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) from endogenous host patterns.^[2] In addition to PAMPs, some PRRs recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs) such as host-derived signals of cellular stress.^[3] During the last decade, a cyclic dinucleotide (CDN) 2',3'-cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate (2',3'-cGAMP, **1**) was identified to be crucially involved in transmitting innate immune system signaling (Figure 1a).^[4]

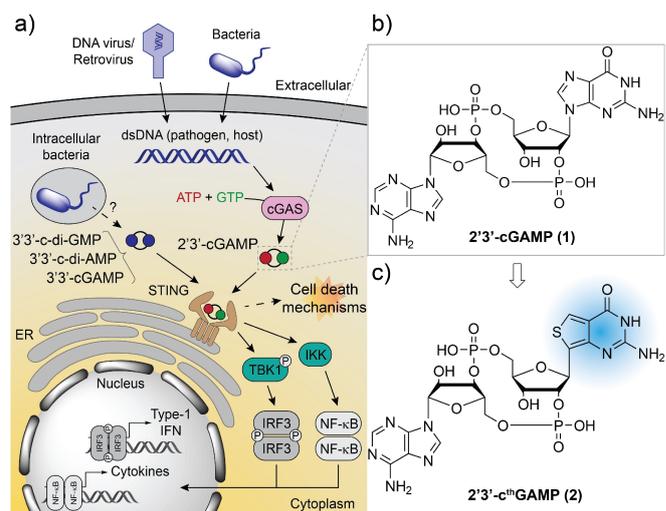


Figure 1. Biological role of CDNs. a) Molecular activation and regulation of the cGAS-cGAMP-STING pathway leading to interferon activation, inflammatory response and potential cell death. b) Structure of the CDN 2',3'-cGAMP. c) Chemical structure of the fluorescent analogue 2',3'- $c^{th}GAMP$ (**2**).

[a] S. Veth,⁺ A. Fuchs,⁺ D. Özdemir,⁺ Dr. C. Dialer, F. Knechtel, Prof. T. Carell, Dr. E. Ploetz
Department of Chemistry and Center for NanoScience (CeNS)
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandstr. 5–13, 81377 Munich (Germany)
E-mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de
evelyn.ploetz@cup.uni-muenchen.de

[b] Dr. D. J. Drexler, Dr. G. Witte, Prof. K.-P. Hopfner
Gene Center and Department of Biochemistry
Ludwig-Maximilians-Universität München
Feodor-Lynen-Straße 25, 81377 Munich (Germany)

[†] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbic.202200005>

© 2022 The Authors. ChemBioChem published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

CDNs are found in vertebrates and prokaryotes alike and play an important role as second messengers.^[5] While the CDNs from bacterial origin (e.g., 3',3'-c-di-GMP, 3',3'-c-di-AMP, 3',3'-cGAMP) are based on two canonical 3'-5' phosphodiester bonds,^[6] the only CDN found in mammalian cells possesses a mixed 2'-5' and 3'-5' phosphodiester linkage (2',3'-cGAMP).^[4]

2',3'-cGAMP plays a crucial role in the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) pathway, which has emerged as a critical mechanism for coupling the sensing of double-stranded DNA (dsDNA) in the cytosol to the induction of innate immune defense programs. cGAS, an

enzyme belonging to the family of DNA sensors, recognizes a broad repertoire of DNA species of both foreign (e.g., pathogens) and self-origin.^[7] Upon binding to dsDNA in the cytosol, cGAS from bacteria are sensed by STING at the endoplasmic reticulum (ER),^[8] triggering a signaling cascade by recruiting the kinases TBK1 and IKK, which results in the activation of interferon regulatory factor 3 (IRF3) and NF- κ B.^[9] IRF3 and NF- κ B consecutively induce the expression of type-1 interferons (IFN), inflammatory cytokines and other interferon-stimulated genes (ISGs),^[10] leading to a DNA-driven immune response. Depending on signaling strength, STING also results in the activation of other cellular processes such as apoptosis and necroptosis.^[11]

The modification of CDNs with fluorescently active moieties holds great promises for the development of novel activity assays and emissive probes for following these key compounds *in vivo*, in order to deepen our fundamental understanding on the life cycle of CDNs, including biosynthesis, distribution, and degradation or recycling. For instance, a fluorescently labeled ATP analogue based on 2-aminopurine (2AP) was used in the cGAS-catalyzed formation of a fluorescent CDN (fGAMP) to characterize the length-dependency of cGAS activity.^[12]

Depending on the desired application a drawback of many emissive nucleoside analogues, including the most prevalently used 2AP, could be their significant quenching upon incorporation into oligonucleotides and CDNs.^[13] The group of Yitzhak Tor developed a highly emissive RNA alphabet (thA, thG, thU, thC) with unparalleled structural isomorphism to the native purine and pyrimidine bases derived from thieno[3,4-*d*]-pyrimidine as the heterocyclic nucleus. Besides excellent structural isomorphism, good quantum yield ($\phi = 0.46$) and long excited-state lifetime (14.8 ns) were reported for thG in H₂O. Moreover, thG was found to show strong visible emission compared to 2AP even if "sandwiched" by two potential quenching guanosine residues in an oligonucleotide.^[14]

In 2019, the enzymatic synthesis of a 2'3'-CDN bearing the thG base (2'3'-cthGAMP, **2**; Scheme 1) among 32 other CDNs was published focusing on the substrate specificity of cGAS derived from human, mouse and chicken as well as immunostimulatory properties in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).^[15] One year later, the enzymatic synthesis of thG-modified derivatives of bacterial 3'3'-c-di-GMP (3'3'-c-di-thGMP and 3'3'-c-thGthGMP) were reported, highlighting their application in enzymatic assays and ability to induce a type-1 IFN response in THP-1 cells.^[16] Cell experiments require large scales of the fluorescent, structural isomorph cGAMP mimics, which are hard to achieve by enzymatic pathways. To date, the organic synthesis of these compounds, as well as their application for cellular assays and fluorescent characterization *in vivo*, are missing.

Herein, we report the paralleled synthetic access to the cyclic dinucleotides 2'3'-cthGAMP and 3'3'-cthGAMP (Scheme 1) based on phosphoramidite and phosphate chemistry, suited for large scale synthesis. We highlight the differences in affinity of these CDNs to human and murine STING and focus on the scope and limitations of 2'3'-cthGAMP for *in vivo* studies in THP-1 cells using two-photon excitation microscopy.

Results and Discussion

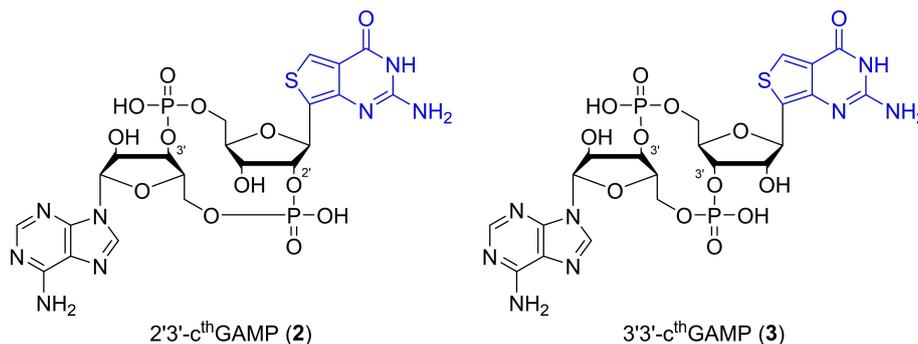
Synthesis

The paralleled synthesis of 2'3'-cthGAMP (**2**) and 3'3'-cthGAMP (**3**) is depicted in Scheme 1. Starting from the 5'-dimethoxytrityl (DMTr)- and dimethylformamido (dmf)-protected thG nucleoside **4** (for synthetic details see Shin et al.),^[14] TBS-protection did yield a regioisomeric mixture of the 3'-OTBS (**5**) and 2'-OTBS (**6**) protected nucleosides. Following a modified procedure from Ching et al.,^[17] these were converted to the corresponding phosphoramidites using commercially available 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite and pyridinium trifluoroacetate. The resulting 2'- and 3'-phosphoramidites were not isolated but instead the diisopropylamine functionality was directly displaced by allyl alcohol with the aid of 5-(benzylthio)-1*H*-tetrazole (BTT) activator followed by the *t*-BuOOH-mediated oxidation of the P(III)- to the P(V)-species and DMTr-deprotection in 3% dichloroacetic acid (DCA). In total, the four-step reaction sequence allowed to generate the allyl- and cyanoethyl-protected 2'-phosphate (**7**) and 3'-phosphate (**8**) in 56% yield. In a similar reaction sequence, commercially available DMTr-2'-O-TBS-rA(Bz) phosphoramidite was then coupled to the free 5' OH groups of **7** and **8** with the aid of BTT activator, followed by oxidation and DMTr deprotection as described before. The resulting linear coupled dinucleotides were isolated in moderate yields, possessing the desired 2'3'- (**9**) and 3'3'- (**10**) connectivity. The deprotection of the allyl group with sodium iodide in refluxing acetone gave the alkoxides, which were cyclized using *N*-methylimidazole as nucleophilic catalyst, 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride (TPSCI) as condensing agent and molecular sieves (4 Å) as moisture scavenger to yield **11** and **12** in 49% yield over two steps. To minimize the formation of undesired side products by dimer formation, the cyclization reaction was carried out in dilute conditions (4 mM referred to starting material) to promote the intramolecular reaction. Treatment of **11** and **12** with a 1:1 mixture of ammonium hydroxide and methanol followed by triethylammonium fluoride resulted in the deprotection of the nucleobase protecting groups (dmf, Bz), β -cyanoethyl and silyl groups. After precipitation in cold acetone the resulting crude product was purified by reverse-phase HPLCs to separate and purify 2'3'-cthGAMP (**2**) and 3'3'-cthGAMP (**3**) in 13% yield for each CDN. The correct phosphodiester connectivity was NMR spectroscopically verified by ¹H-³¹P-HMBC measurements (see Supporting Information).

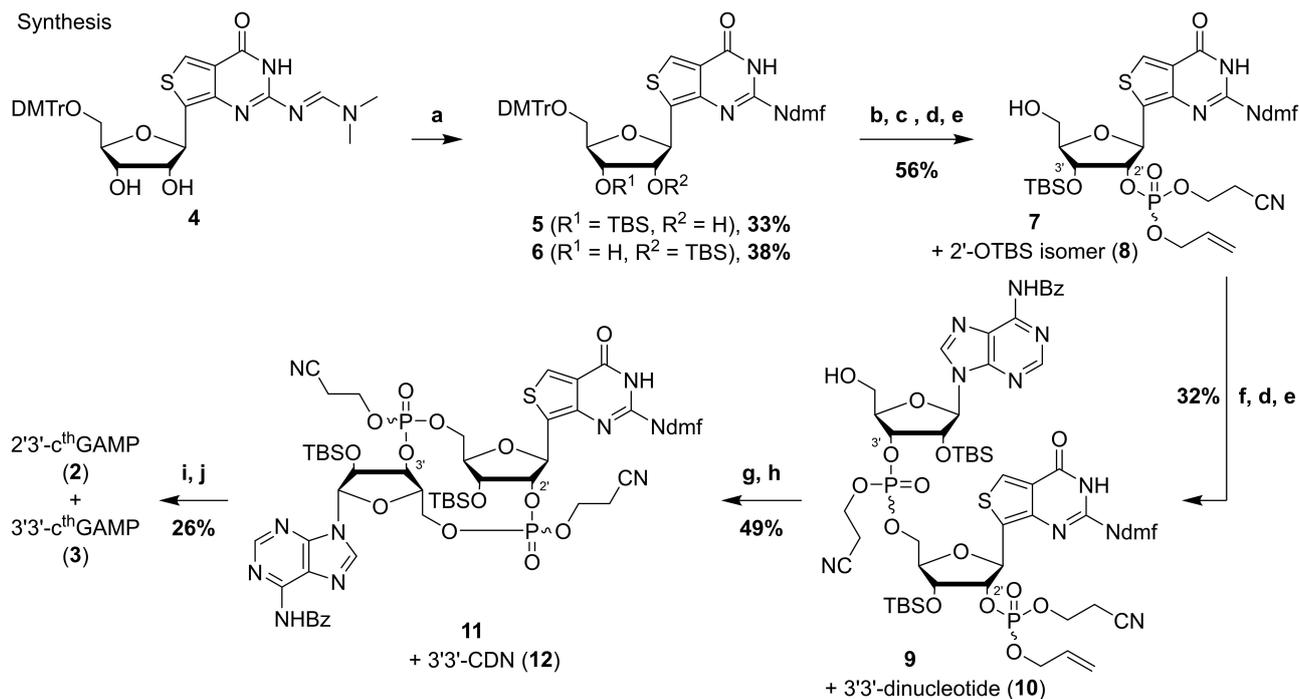
Biochemical characterization

With both target compounds in hands, we focused on evaluating their binding properties to murine and human STING. At first, we employed differential scanning fluorimetry (DSF) to determine the binding affinity of synthetic and natural CDNs to STING proteins by evaluating the difference in melting temperature of the STING protein with and without ligand (Supporting Figure S5.1). While 2'3'-cthGAMP shows reduced

Products



Synthesis



Scheme 1. Paralleled synthesis of 2'3'-cthGAMP and 3'3'-cthGAMP. Products 2'3'-cthGAMP (2) and 3'3'-cthGAMP (3) and synthetic overview. a) TBSCl, imidazole, pyridine; b) 2-cyanoethyl *N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite, pyridinium trifluoroacetate, MeCN; c) BTT, allyl alcohol; d) *t*-BuOOH, then NaHSO₃; e) 3% DCA in DCM; f) DMT-2'-O-TBS-rA(Bz) phosphoramidite, BTT, MeCN; g) NaI, acetone; h) TPSCI, *N*-Me-imidazole, THF; i) NH₄OH, MeOH; j) NEt₃·3HF, THF, then HPLC.

binding-affinity compared to natural 2'3'-cGAMP, the thermal shift assays revealed, that 3'3'-cthGAMP (3) does not possess favorable binding affinity to neither murine nor human STING. As a consequence, we focused on the characterization and application of 2'3'-cthGAMP (2) in the later part of this publication.

Using isothermal titration calorimetry (ITC; Figure 2), we found that 2'3'-cthGAMP (2) is a less potent binder than natural 2'3'-cGAMP ($k_D = \sim 4$ nM).^[18] It shows a 120- and 4000-fold reduced affinity to murine STING (mSTING; $k_D = 455$ nm) and human STING (hSTING; $k_D = 15$ μ m). The thermodynamic parameters highlight, that the binding of 2'3'-cthGAMP to both receptors is exergonic ($\Delta G_{mSTING} = -36.3$ kJ/mol, $\Delta G_{hSTING} = -27.9$ kJ/mol), however with opposite trend for enthalpy and entropy: binding to mSTING is favorable in terms of entropy ($-T\Delta S_{mSTING} = -59.3$ kJ/mol) and endothermic ($\Delta H_{mSTING} = 23.4$ kJ/mol). In contrast, binding to hSTING was found to be

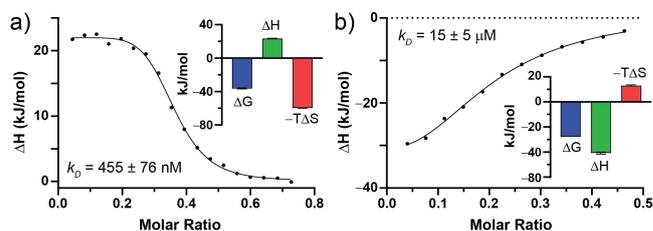


Figure 2. Binding to STING as measured by ITC. ITC curves and thermodynamic parameters for 2'3'-cthGAMP (2) bound to a) murine STING and b) human STING.

exothermic ($\Delta H_{hSTING} = -40.8$ kJ/mol) but entropically unfavorable ($-T\Delta S_{hSTING} = 13.1$ kJ/mol). Unlike the endothermic binding process of natural 2'3'-cGAMP to hSTING^[18], the data suggests that binding of 2'3'-cthGAMP might not trigger a full conforma-

tional change in STING and, hence, a stabilized enclosure of the ligand. This observation would be in line with the reduced affinity of the synthetic compound.

Despite its reduced affinity, we set out next to investigate, whether binding of 2'3'-cthGAMP still activates STING signaling and consecutively interferon production. For this, we monitored the expression of the reporter gene Lucia luciferase in THP-1 DualTM wild type (THP-1 monocytes) cells, which is under the control of the ISG54 promoter in conjunction with five IRF-stimulated response elements. Secretion of luciferase and hence activation of the IFN pathway was quantified by monitoring its luminescence in response to 2'3'-cGAMP and 2'3'-cthGAMP after transfection. 2'3'-cthGAMP showed a ~5-fold reduced but significant IRF activation compared to the natural compound (Supporting Information Figure S2).

Uptake in THP-1 cells

Having verified the biological potency of 2'3'-cthGAMP, we continued with THP-1 monocyte cells and monitored the uptake and effect on immune cells by following the fluorescent signature of the synthetic molecule *in vivo*. As reported, the 2'3'-cthGAMP features a broad absorption in the UV below 360 nm with a maximum around 315 nm (Figure 3a). Being excited at 310 nm, a blue photoluminescence was observed. The emission spectrum has a width of more than 200 nm, starting around 380 nm upwards with an emission maximum around 470 nm (Figure 3a). Since excitation sources in the UV and blue spectral range cause high background when being used for imaging cells due to scattering and autofluorescence, we employed two-photon imaging^[19] using a pulsed laser excitation at 774 nm (Supporting Information Figure S5.3a–b). The fluorescence emission of 2'3'-cthGAMP (2) in water between 400–650 nm clearly showed a quadratic dependence on the exciting laser power (Supporting Information Figure S5.3c) confirming the nonlinear nature of the two-photon excitation.

Figure 3b (upper panels) shows the emitted autofluorescence of two THP-1 DualTM cell lines, wild type (wt) and STING knock-out (STING KO), after two-photon excitation in the spectral range between 417 and 477 nm. Upon the addition of 2'3'-cthGAMP (2) to THP-1 wt cells, we expected an increase in overall brightness due to the intrinsic fluorescence of the compound. Instead, we observed a significant change in cell morphology combined with a strong decrease in emission (Figure 3c, upper panel, N=91/129). In contrast, THP-1 STING-KO cells (Figure 3b, lower panel), which do not enter the consecutive immune response cascade, showed no morphological changes but only a slight swelling of the cell volume. Here, a significant increase in fluorescence intensity after 2'3'-cthGAMP uptake was monitored (Figure 3c, lower panel, N=85/72). Both observations suggest, that 2'3'-cthGAMP is successfully taken up by both cell lines, however with different biological response: while cellular accumulation of 2'3'-cthGAMP leads to the expected brightness increase in THP-1 STING KO cells due to unavailability of the STING receptor and hence missing cellular response, the uptake in THP-1 wt cells triggered downstream

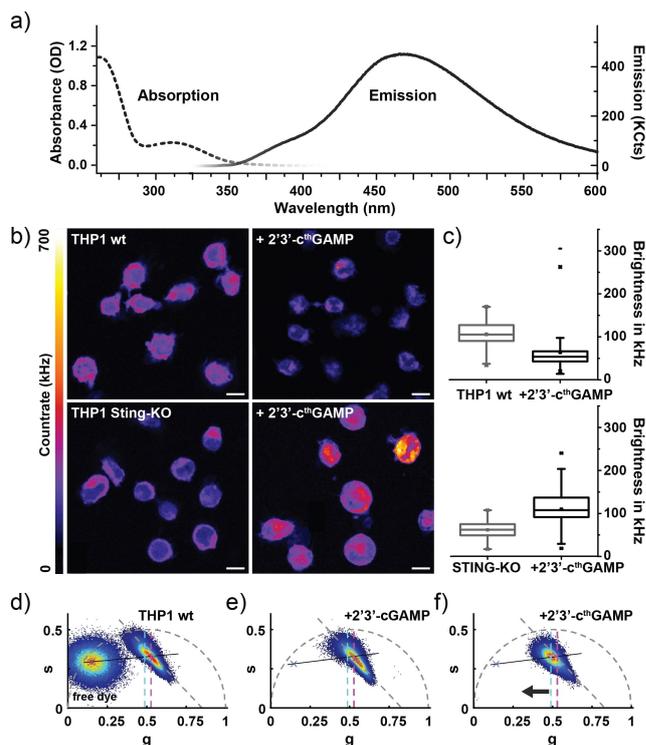


Figure 3. Fluorescence microscopy probing the cellular uptake of 2'3'-cthGAMP in THP-1 cells. a) Absorption (dotted line) and emission spectrum (solid line) of 52 μM 2'3'-cthGAMP in water after excitation at 310 nm. b–c) Two-photon images (b) and average cell brightness (c) of THP-1 wt cells (upper panel) and THP-1 STING-KO cells (lower panel) in absence and presence of 2'3'-cthGAMP. 2'3'-cthGAMP is biologically active in THP-1 wt cells leading to morphological changes and brightness decrease. In contrast, uptake of 2'3'-cthGAMP in STING knockout cells leads to a fluorescence increase. The emission was recorded between 417–477 nm and evaluated on average for 70–130 cells per condition. d–f) Phasor analysis of the average lifetime observed for THP-1 wt cells before (d) and after uptake of 50 μM 2'3'-cGAMP (e) and 200 μM 2'3'-cthGAMP (f). d) Phasor representation of the fluorescence signature of THP-1 wt cells and free 2'3'-cthGAMP in cell medium. The angled dotted line (grey) marks the multicenter autofluorescent background in THP-1 wt cells. The center positions of the populations before (pink) and after (cyan) addition of 2'3'-cthGAMP (f) is marked with dotted lines. e) The addition of the non-fluorescent compound cGAMP triggers a shift in cellular autofluorescence towards shorter lifetimes and reduced brightness. f) The addition of 2'3'-cthGAMP leads to an off-axis shift towards free 2'3'-cthGAMP (along the black line), confirming the successful uptake.

processes due to activity of 2'3'-cthGAMP. Consecutive changes in cellular environment could affect the autofluorescent background, but also alter the photochemistry of the environmentally sensitive 2'3'-cthGAMP compound (see Supporting Information Figure S5.4.) by cellular interactions, leading to a decrease in fluorescence (if we anticipate the short time-window for free 2'3'-cthGAMP diffusion before binding to STING).

The autofluorescence signature of THP-1 overlaps with the emission spectrum of 2'3'-cthGAMP (2). To investigate whether the fluorescence increase observed for THP-1 STING KO cells can be directly linked to the uptake of 2'3'-cthGAMP (2), we evaluated the time-correlated single photon counting (TCSPC) data available for each image pixel in addition to the recorded

brightness information. At first, we recorded two-photon images of free dye only in solution for comparison and calibration (Supporting Information Figure S5.4a-b). By analyzing the exponential decay of the TCSPC histograms, we found an approximately mono-exponential behavior (on long time-scales) of 16.8 ns for 2'3'-cthGAMP in water, similar to thG in water (14.8 ns).^[14] In buffers, however, we observed a shortened lifetime of 6.2 ns in PBS and even 4.3 ns in THP-1 cell medium (Supporting Information Figure S5.4a). Due to this complex behavior and the multi-exponential nature of cellular autofluorescence, we expanded the lifetime evaluation using the phasor approach^[20], which graphically translates the fluorescence lifetime decay into Fourier space (see Supporting Information Note 4.4 for details). This technique enables the detection of small contributions to a multi-component lifetime mixture.^[20a] Here, mono-exponential decays will be observed on an arc of radius 0.5 with long lifetime components near the origin (0,0), while short lifetimes are expected to contribute near (1,0). On the other side, multi-exponential decay pathways or fluorescence decays of mixed species are expected inside the circle. They are composed of weighted linear compositions of the contributing mono-exponential species along the arc and obtained by vectorial addition of the weighted contributions by each fluorescence species (Supporting Information Figure S4.2d-f).

When analyzing the TCSPC data by the phasor approach, 2'3'-cthGAMP in PBS and cell medium is characterized by a bi-exponential, long-lived lifetime lying close to the left half-circle (Supporting Information Figure S5.4b), compared to the single-exponential signature of Atto532 in PBS on the circle. For the uptake of the fluorescent 2'3'-cthGAMP into THP-1 cells, we expect a mix between the signature of the fluorescent analogue and the autofluorescence of the cell line. The uptake should be seen by a shift of the cellular autofluorescence signature towards the population of the free dye, while for the natural, non-fluorescent 2'3'-cGAMP no change should occur.

THP-1 wt cells show a short-lived, multi-exponential autofluorescence of about 1.85 ns. Their population lies in the right half-circle compared to the longer-lived signature of the free 2'3'-cthGAMP in cell medium (Figure 3d). The addition of the natural analog 2'3'-cGAMP to THP-1 cells triggers a change in morphology and autofluorescent background. This change is evident by a shift along the grey dotted line towards shorter lifetimes and concomitantly reduced brightness. Besides a decrease of the average lifetime from 1.85 to 1.75 ns (Figure 3e), no shift towards the free 2'3'-cthGAMP compound (along the black line) was observed. Upon addition of 2'3'-cthGAMP, however, a clear shift towards the free fluorescent analog is observed (Figure 3f), as marked for the center position of cellular autofluorescent in absence (pink) and presence of 2'3'-cthGAMP (cyan). The cellular uptake of 2'3'-cthGAMP leads to an increase in average lifetime (2.05 ns) although a simultaneous reduction in autofluorescence background and lifetime is observed. For the STING KO line an identical behavior was detected (Supporting Information Figure 5.4c). Both findings, the brightness increase (Figure 3c, lower panel) as well as the lifetime shift towards the pure compound (Figure 3f) give clear

evidence, that 2'3'-cthGAMP was taken up into THP-1 monocytes.

Conclusion

In summary, we report the first organic synthesis of 2'3'-cthGAMP (2) and 3'3'-cthGAMP (3), which feature the fluorescent thG base. The described synthetic strategy - involving phosphoramidite and phosphate chemistry - provides direct access to large quantities of both immunostimulants and enabled us to carry out cell feeding experiments with 2'3'-cthGAMP (2) as well as subsequent two-photon microscopy on THP-1 cells. While biochemical as well as cell-based assays confirmed the biological activity of the synthetically derived compound, we further verified its presence in cells using fluorescence imaging and lifetime. Moreover, our observations show that the fluorescence lifetime of 2'3'-cthGAMP (2) is highly dependent on its environment suggesting a complex photochemistry for CDNs in general including the synthesized compound. While suitable for two-photon excitation microscopy, the cellular application of the fluorescent 2'3'-cGAMP analogue including intracellular tracking and downstream monitoring is strongly dependent on the autofluorescence of the chosen cell line, which creates an additional cell dependent detection limit. The decreased binding affinity of 2'3'-cthGAMP (2) to human STING in combination with high EC₅₀ values^[15] indicate substantial shortcomings which need to be addressed in the future. Nevertheless, as second messengers with diverse roles in both prokaryotes and eukaryotes, both fluorescent cthGAMP analogues may well serve for enzymatic assays/screening assays for inhibitors of CDN metabolism enzymes facilitating the development of therapeutics that target the cGAS-STING signaling pathway.

Experimental Section

Detailed experimental procedures during the synthesis and characterization of the fluorescent dinucleotides, protein purification of murine and human STING receptors, cell culturing, and advanced fluorescence microscopy are provided in the Supporting Information.

Acknowledgements

We thank Don C. Lamb for support and access to his laboratory facilities. Funding by the Center of NanoScience Munich (CeNS), the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 861381 to T.C. and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (RTG1721 Project A4 and TRR237 Project A9 to K.P.H.; RTG1721 Project A10 to G.W.; SFB1032, Project-ID 201269156, A05 to T.C. / B03 and PL 696/4-1 to E.P.) is gratefully acknowledged. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords: cGAMP · imaging agents · STING pathway · fluorescent analogues · two-photon fluorescence lifetime imaging

- [1] R. Medzhitov, C. A. Janeway, Jr., *Cell* **1997**, *91*, 295–298.
- [2] S. Gordon, *Cell* **2002**, *111*, 927–930.
- [3] K. Schroder, J. Tschopp, *Cell* **2010**, *140*, 821–832.
- [4] A. Ablasser, M. Goldeck, T. Cavlar, T. Deimling, G. Witte, I. Röhl, K.-P. Hopfner, J. Ludwig, V. Hornung, *Nature* **2013**, *498*, 380–384.
- [5] a) O. Danilchanka, J. J. Mekalanos, *Cell* **2013**, *154*, 962–970; b) L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, Z. Chen, *Science* **2013**, *339*, 786–791; c) U. Römling, M. Y. Galperin, M. Gomelsky, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77*, 1–52.
- [6] a) R. M. Corrigan, J. C. Abbott, H. Burhenne, V. Kaever, A. Gründling, *PLoS Path.* **2011**, *7*, e1002217; b) B. W. Davies, R. W. Bogard, T. S. Young, J. J. Mekalanos, *Cell* **2012**, *149*, 358–370; c) P. Ross, H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. de Vroom, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, M. Benziman, *Nature* **1987**, *325*, 279–281; d) G. Witte, S. Hartung, K. Büttner, K. P. Hopfner, *Mol. Cell* **2008**, *30*, 167–178.
- [7] A. Decout, J. D. Katz, S. Venkatraman, A. Ablasser, *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 548–569.
- [8] H. Ishikawa, G. N. Barber, *Nature* **2008**, *455*, 674.
- [9] a) S. Liu, X. Cai, J. Wu, Q. Cong, X. Chen, T. Li, F. Du, J. Ren, Y.-T. Wu, N. V. Grishin, Z. J. Chen, *Science* **2015**, *347*, aaa2630; b) R. Fang, C. Wang, Q. Jiang, M. Lv, P. Gao, X. Yu, P. Mu, R. Zhang, S. Bi, J.-M. Feng, Z. Jiang, *J. Immunol.* **2017**, *199*, 3222.
- [10] J. Wu, N. Dobbs, K. Yang, N. Yan, *Immunity* **2020**, *53*, 115–126.e115.
- [11] a) M. F. Gulen, U. Koch, S. M. Haag, F. Schuler, L. Apetoh, A. Villunger, F. Radtke, A. Ablasser, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 427; b) J. Sarhan, B. C. Liu, H. I. Muendlein, C. G. Weindel, I. Smirnova, A. Y. Tang, V. Ilyukha, M. Sorokin, A. Buzdin, K. A. Fitzgerald, A. Poltorak, *Cell Death Differ.* **2019**, *26*, 332–347.
- [12] L. Andreeva, B. Hiller, D. Kostrewa, C. Lässig, C. C. de Oliveira Mann, D. J. Drexler, A. Maiser, M. Gaidt, H. Leonhardt, V. Hornung, K.-P. Hopfner, *Nature* **2017**, *549*, 394.
- [13] a) J. Zhou, Y. Zheng, B. T. Roembke, S. M. Robinson, C. Opoku-Temeng, D. A. Sayre, H. O. Sintim, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 5421–5426; b) R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579–2619.
- [14] D. Shin, R. W. Sinkeldam, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14912–14915.
- [15] B. Novotná, L. Vaneková, M. Zavřel, M. Buděšínský, M. Dejmeke, M. Smola, O. Gutten, Z. A. Tehrani, M. Pimková Polidarová, A. Brázdová, R. Liboska, I. Štěpánek, Z. Vavřina, T. Jandušik, R. Nencka, L. Rulišek, E. Bouřa, J. Brynda, O. Páv, G. Birkuš, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10676–10690.
- [16] Y. Li, A. Fin, A. R. Rovira, Y. Su, A. B. Dippel, J. A. Valderrama, A. M. Riestra, V. Nizet, M. C. Hammond, Y. Tor, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 2595–2598.
- [17] S. M. Ching, W. J. Tan, K. L. Chua, Y. Lam, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6657–6665.
- [18] X. Zhang, H. Shi, J. Wu, X. Zhang, L. Sun, C. Chen, Z. J. Chen, *Mol. Cell* **2013**, *51*, 226–235.
- [19] A. Fuchs, P. Mannhardt, P. Hirschle, H. Wang, I. Zaytseva, Z. Ji, O. M. Yaghi, S. Wuttke, E. Ploetz, *Adv. Mater.* **2021**, *34*, 2104530.
- [20] a) G. I. Redford, R. M. Clegg, *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 805; b) M. A. Digman, V. R. Caiolfa, M. Zamaï, E. Gratton, *Biophys. J.* **2008**, *94*, L14–L16; c) G. Weber, *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 949–953; d) D. M. Jameson, E. Gratton, R. D. Hall, *Appl. Spectrosc. Rev.* **1984**, *20*, 55–106.

Manuscript received: January 4, 2022

Revised manuscript received: February 12, 2022

Accepted manuscript online: February 21, 2022

Version of record online: March 10, 2022

5.2 Prodrugs von cAzadC

Neben dem Design und der Synthese von *Prodrugs* basierend auf CDNs sollte im Rahmen dieser Arbeit auch das Monophosphat von cAzadC mit *Prodrug*-Motiven modifiziert werden. Die Beweggründe für die Erforschung von cAzadC-Prodrugs werden nachfolgend aufgezeigt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, weist die durch Ersetzen des Ribosesauerstoffs mit einer Methylen-Einheit erhaltene Variante cAzadC gegenüber Decitabin eine deutlich höhere Stabilität gegenüber Hydrolyse bei gleichzeitigem Erhalt der DNMT-hemmenden Wirkung auf.^[171] Neben Verbesserungen bezüglich der Stabilität, deuten bisher unveröffentlichte Studien der Gruppe von Prof. Carell darauf hin, dass eine verringerte Toxizität bei vergleichbarer Senkung der mdC-Level durch Anwendung von cAzadC erreicht werden kann. Im direkten Vergleich zu Decitabin musste jedoch festgestellt werden, dass stets größere Mengen in der Zellkultur als auch im Mausmodell verabreicht werden mussten, um vergleichbare Effekte wie bei Decitabin zu erzielen. Dies ließ auf eine langsamere Umsetzung zum biologisch aktiven Triphosphat und somit geringere Bioverfügbarkeit im Falle des carbozyklischen Derivats schließen. Um diese unerwünschte Eigenschaft zu beheben und die DNA-Inkorporation sowie damit die Aktivität des cAzadCs weiter zu verbessern, wurde die Synthese von *Prodrugs* angestrebt. Nachfolgend wird der synthetische Zugang zu drei cAzadC-Monophosphat (cAzadCMP)-*Prodrugs* basierend auf einem *ProTide*- (**70**) und zwei *CycloSal*- (**71**, **72**) Motiven diskutiert (Abbildung 55) und deren Eignung durch Untersuchung der resultierenden mdC-Level in verschiedenen Krebszelllinien evaluiert.

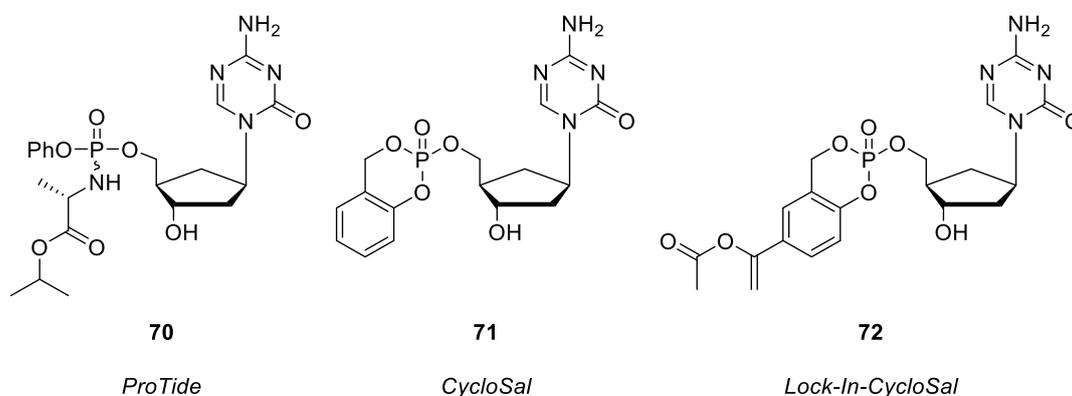
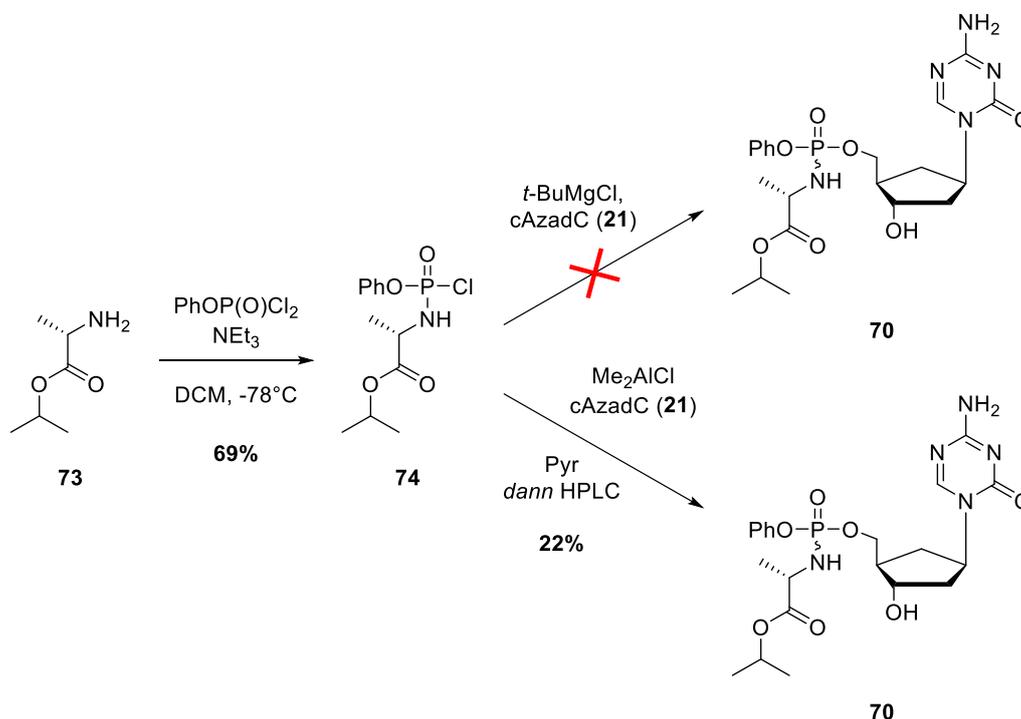


Abbildung 55: Chemische Strukturen der designierten cAzadCMP-*Prodrugs* basierend auf dem *ProTide*- beziehungsweise *CycloSal*-Konzept.

5.2.1 Synthese von cAzadC-Prodrugs

Ausgehend von cAzadC, welches in 14 Stufen von kommerziell erhältlichem (-)-Vince Lactam nach literaturbekannten Vorschriften synthetisch zugänglich ist,^[171, 244] wird nachfolgend zunächst die Synthese eines Monophosphat-Pronukleotids basierend auf dem *ProTide*-Motiv beschrieben. Allgemein gehören Phosphoramidat-*Prodrugs* zu den am häufigsten für klinische Studien zugelassenen Nukleotid-*Prodrugs*, weisen häufig exzellente präklinische Eigenschaften auf und werden unter anderem aufgrund ihrer relativ einfachen Darstellung häufig in der Medizinalchemie verwendet.^[182, 245] Es sind überwiegend drei Methoden der Synthese beschrieben, welche die Umsetzung des Nukleosids in das entsprechende *ProTide* ermöglichen. Diese Methoden umfassen die Kupplung einer Aminosäure an ein zuvor hergestelltes Nukleosid Arylphosphate, die Kupplung des Nukleosids mit einem Diarylphosphit und anschließender oxidativer Aminierung oder die direkte Kupplung des Nukleosids mit einem Phosphorochloridat-Reagenz.^[174]

Im Zuge dieser Arbeit wurde eine dem *Sofosbuvir* analoge Phosphoroxyarylamidat-Einheit basierend auf einem L-Alanin-isopropylester am cAzadC etabliert. Hierfür wurde die Synthesestrategie der Verwendung eines Phosphorochloridat-Reagenzes verfolgt (Schema 12).



Schema 12: Synthese des cAzadCMP-*ProTides* **70** durch Dimethylaluminiumchlorid-vermittelte 5'-Phosphorylierung.

Das entsprechende Phosphoroxyarylamidat^[246-247] **74** wurde ausgehend vom Hydrochlorid-Salz des L-Alanin-isopropylesters (**73**) durch Umsetzung mit Phenyldichlorophosphat und Triethylamin in guter Ausbeute erhalten. Für die anschließende Kupplung an das cAzadC-Nukleosid (**21**), welches von *Corinna Sommermann* zur Verfügung gestellt wurde, wurde

zunächst eine häufig verwendete Methode mit *tert*-Butylmagnesiumchlorid (*t*-BuMgCl),^[174] welche beispielsweise für die erfolgreiche Synthese von *ProTides* ausgehend von Cytidine^[248] und 2'-Methyl-4'-azidocytidin^[249] genutzt wurde, unter Verwendung verschiedener Reaktionsbedingungen getestet. Jedoch wurde bei keinem Ansatz mehr als analytische Spuren des gewünschten Produkts erhalten. In den meisten Fällen wurde hauptsächlich das Startmaterial *cAzadC* zurückgewonnen, wohingegen bei der Verwendung von mehr Äquivalenten des Phosphorochloridats überwiegend das zweifach phosphorylierte Produkt resultierte. Die wohl gängigste Alternative zu der Verwendung von *t*-BuMgCl ist die *N*-Methylimidazol-basierte Kupplung, welche jedoch im Fall von Cytidin-Derivaten aufgrund der einhergehenden, partiellen *N*⁴-Phosphorylierung kaum Anwendung findet.^[174, 248, 250] Stattdessen führte eine Methode mit Dimethylaluminiumchlorid nach *Simmons et al.*^[251] zum Erfolg, welche eine hohe Selektivität für die 5'-Phosphorylierung ermöglichte und weiterhin ohne die Verwendung von Schutzgruppenchemie auskam. Da es sich um keine diastereoselektive Syntheseroute handelt, wurden nach Säulenchromatographie zwei Diastereomere in einem Verhältnis von nahezu 1:1 erhalten, von denen aufgrund der enzymatischen Prozessierung der *ProTide*-Motive unterschiedliche *in vitro* Potenzen zu erwarten waren.^[191-192] Um beide Diastereomere getrennt voneinander untersuchen zu können, wurde eine Methode für RP-HPLC mit einem Gradienten von steigendem MeCN-Gehalt in H₂O (15% → 25%) über 45 Minuten entwickelt, welche die Trennung und Isolation der *cAzadC-ProTides* **70a** (*t*_R = 43 Minuten) und **70b** (*t*_R = 45 Minuten) ermöglichte.

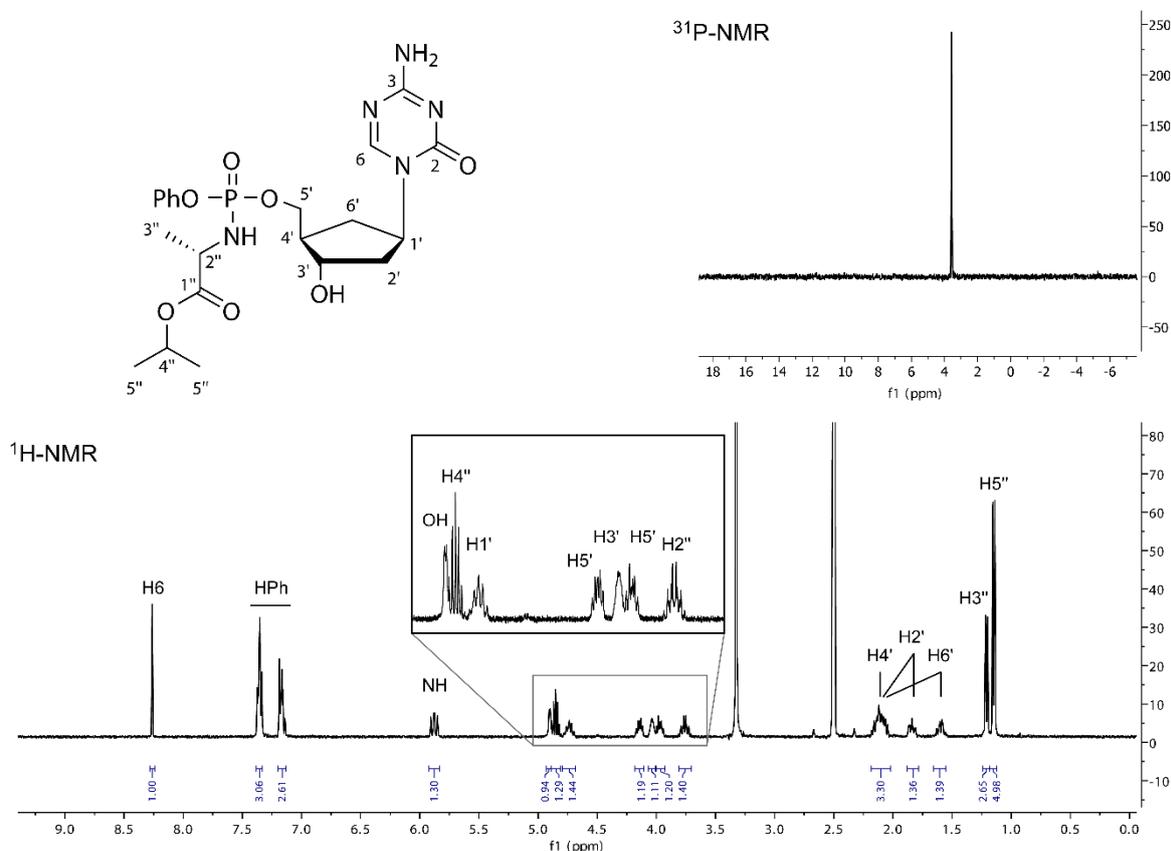


Abbildung 56: Struktur, 400 MHz ¹H-NMR- und 162 MHz ³¹P-NMR-Spektren des *ProTide*-Diastereomers **70a**.

Um die erfolgreiche Synthese des gewünschten *cAzadC-ProTides* **70** zu verifizieren, wurden beide Diastereomere vollständig mittels HRMS- und NMR-Spektroskopie charakterisiert (repräsentativ gezeigt für **70a**, Abbildung 56). Die korrekte 5'-Phosphorylierung konnte durch ^1H - ^{31}P -HMBC bestätigt werden (repräsentativ gezeigt für **70a**, Abbildung 57).

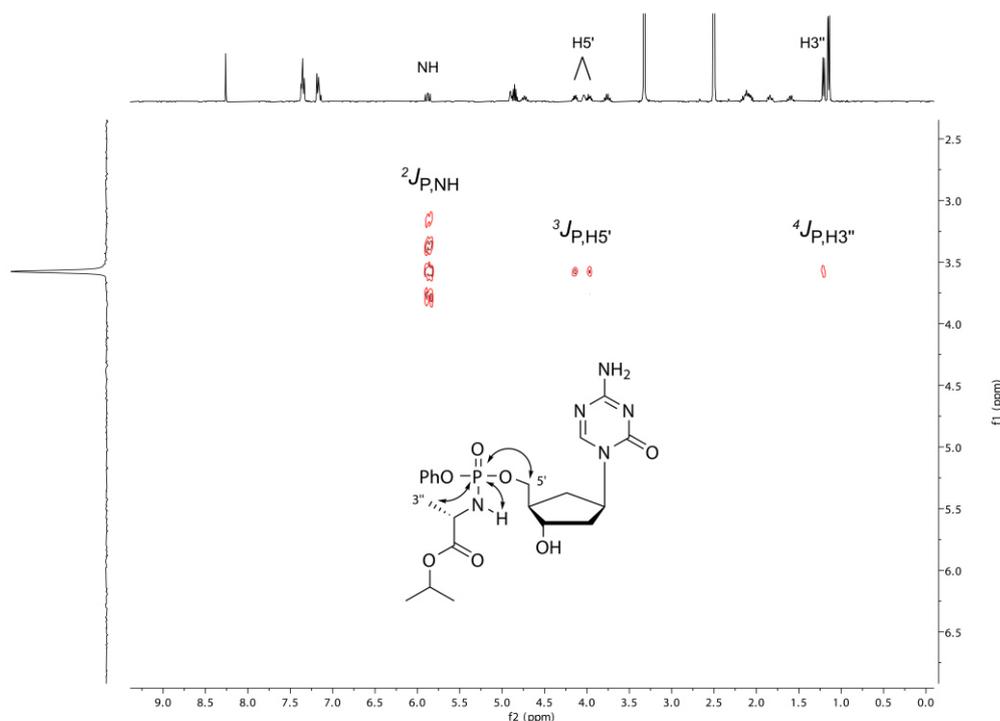
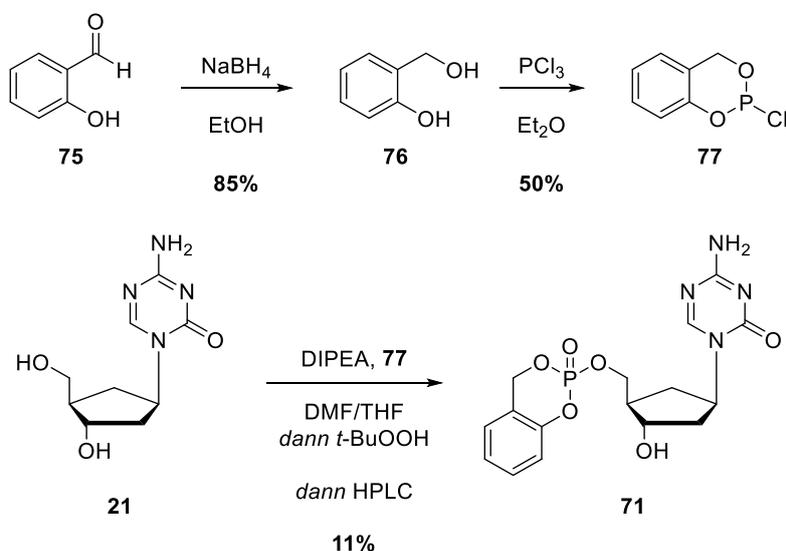


Abbildung 57: Überprüfung der korrekten Konnektivität an 5'-Position von **70a** mithilfe von ^1H - ^{31}P -HMBC.

Neben einem *ProTide*-basierten Prodrug sollten *Prodrug*-Varianten, welche auf dem *CycloSal*-Konzept beruhen, synthetisch zugänglich gemacht werden. Hierbei wurde zunächst die Synthese eines möglichst simplen *CycloSal*-Prodrugs (**71**) angestrebt, welches im Gegensatz zu einem *ProTide* nicht enzymatisch, sondern unter physiologischen Bedingungen ausschließlich durch chemische Hydrolyse zum *cAzadCMP* umgesetzt wird. Ausgehend vom freien Nucleosid sind zwei Synthesestrategien für die Darstellung von *CycloSal*-Prodrugs beschrieben. Die erste Methode basiert auf Phosphor(III)-Chemie, bei der zyklische Saligenylchlorophosphate zunächst aus sterischen Gründen überwiegend mit der leichter zugänglichen 5'-OH-Gruppe eines Nucleosids umgesetzt und anschließend oxidiert werden. Die zweite Möglichkeit beruht auf Phosphor(V)-Chemie und erfordert die Darstellung eines Nucleosid-5'-O-phosphodichloridats durch Umsetzung des Nucleosids mit Phosphorylchlorid sowie eine nachfolgende Reaktion mit einem Salicylalkohol. *Meier et al.* berichteten jedoch, dass bei der Anwendung der zuerst beschriebenen Methode deutlich bessere Ausbeuten erzielt werden konnten.^[252]

Den Protokollen der Gruppe von *Prof. Chris Meier* folgend,^[252-253] wurde Salicylaldehyd **75** durch Reduktion mit NaBH_4 in guter Ausbeute zu Salicylalkohol **76** umgesetzt. Die anschließende Reaktion mit Phosphortrichlorid ergab das entsprechende zyklische Saligenylchlorophosphan **77**, welches durch Destillation unter striktem Ausschluss von

Feuchtigkeit und Luftsauerstoff aufgereinigt und in moderater Ausbeute isoliert werden konnte. Durch eine Reaktionssequenz bestehend aus Umsetzung von cAzadC (**21**) mit **77** und anschließender Oxidation mit TBHP wurde das *CycloSal*-Produkt **71** generiert (Schema 13).



Schema 13: Synthese des cAzadCMP-*CycloSals* **71** durch Umsetzung von cAzadC **21** mit dem zyklischen Chlorophosphit **77**.

Da es sich bei dem Produkt **71** abermals um einen Phosphortriester handelte, wurden zwei Diastereomere in einem Verhältnis von nahezu 1:1 erhalten und dies durch NMR-Spektroskopie bestätigt (Abbildung 58). Eine Trennung der Diastereomere mittels RP-HPLC gelang jedoch nicht. Da die Synthese ohne Schutzgruppenchemie am Nucleosid durchgeführt wurde, war die Bildung von Nebenprodukten zu beobachten. Beispielsweise wurde das 3'-*O*-*CycloSal* modifizierte Derivat in geringen Mengen (2%) bei der HPLC-Aufreinigung isoliert.

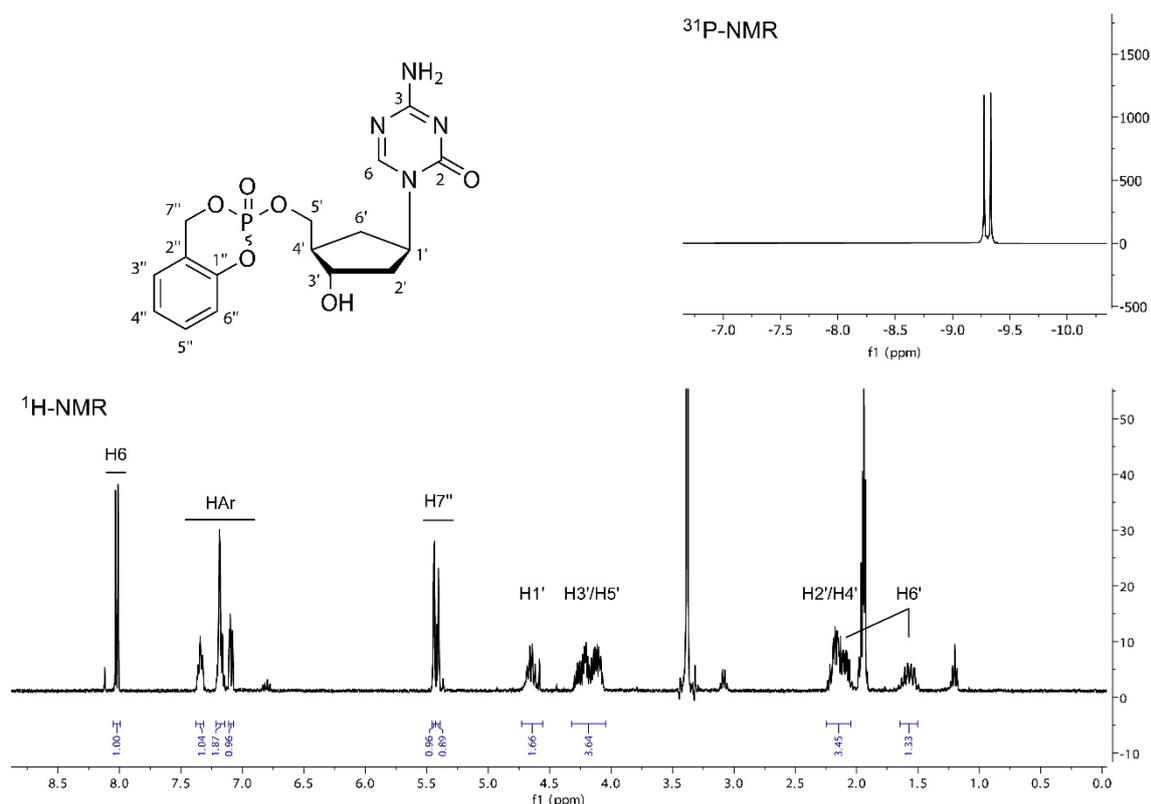


Abbildung 58: Struktur, 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ - und 162 MHz $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektren des Diastereomerenmischs von *CycloSal-Produgs* **71**.

Die Verwendung eines *CycloSal*-Motivs bringt Vor- und Nachteile mit sich. Zum Beispiel ist die Anwendung von *CycloSal-Produgs* größtenteils von der Art des Zelltyps unabhängig, da die Freisetzung nicht auf Enzyme angewiesen ist, welche je nach Zelltyp unterschiedlich stark exprimiert sein können. Dieser Vorteil geht allerdings mit der Problematik einher, dass die Abspaltung des *Prodrug*-Motivs sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zelle in vergleichbarem Maße stattfinden kann. Lediglich Unterschiede des pH-Werts innerhalb und außerhalb der Zelle können sich signifikant auf die Spaltungseffizienz von *CycloSal*-Motiven auswirken, da die Halbwertszeit der Hydrolyse mit zunehmenden pH-Wert drastisch sinkt. Für das zuvor beschriebene *CycloSal*-Motiv an einem 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin wurde beispielsweise bei pH = 6.9 eine Halbwertszeit von 24.5 Stunden bestimmt, wohingegen bei pH = 7.3 die Halbwertszeit auf 4.5 Stunden und bei pH = 8.9 auf 1.1 Stunden verkürzt war.^[252] In gesunden Zellen ist der intrazelluläre pH-Wert ($\text{pH}_i \approx 7.2$) streng durch Ionentransporter in der Zellmembran reguliert^[254] und ist dem extrazellulären pH-Wert ($\text{pH}_e \approx 7.4$) sehr ähnlich, wobei der pH-Gradient eine extrazelluläre Spaltung des *CycloSal*-Motivs begünstigt. In Krebszellen ist dagegen der pH-Gradient invertiert ($\text{pH}_i \approx 7.3 - 7.6$, $\text{pH}_e \approx 6.8 - 7.0$),^[255] was die intrazelluläre Freisetzung begünstigen sollte und dementsprechend interessant für die Anwendung von *CycloSal-Produgs* in Krebszelllinien ist. Neben der pH-Abhängigkeit beeinflusst vor allem die Stabilität des *CycloSal*-Motivs gegenüber Hydrolyse maßgeblich die Freisetzung von Monophosphaten aus *CycloSal-Produgs*. Besonders bei geringer Stabilität der *CycloSal*-Einheit ist eine rasche extrazelluläre Hydrolyse des *Prodrug*s schon während der Einstellung eines Konzentrationsgleichgewichts über die Zellmembran möglich. Im Gegensatz dazu führt eine hohe Stabilität des *CycloSal*-Motivs zu

einer deutlich verlängerten Halbwertszeit bei der Abspaltung des *Prodrug*-Motivs. Die Stabilität der *CycloSal*-Einheit gegenüber Hydrolyse kann maßgeblich durch die Wahl von Substituenten am aromatischen System beeinflusst werden. So erleichtern allgemein elektronenziehende Substituenten den nukleophilen Angriff von Wasser auf das Phosphoratom, wohingegen elektronenschiebende Substituenten diesen Angriff und somit die Freisetzung erschweren.

Um zielgerichteter eine intrazelluläre Spaltung von *CycloSal*-Prodrugs zu ermöglichen, entwickelte *Chris Meier et al.* sogenannte *Lock-In*-modifizierte *CycloSal*-Varianten.^[256-257] Diese Verbindungen enthalten geminale Dicarboxylate oder Acetoxyvinyl Gruppen (Abbildung 59). Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen *CycloSal*-Konzept, erlauben diese Varianten eine intrazelluläre Aktivierung durch Esterasen. Als Konsequenz der enzymatischen Spaltung werden polare Funktionalitäten freigesetzt, was die Diffusion dieser *CycloSal* Phosphatdiester zurück in den extrazellulären Raum hemmt. Neben diesem *Lock-In*-Effekt werden darüber hinaus durch die enzymatische Umsetzung stark elektronenziehende Gruppen wie Formyl- oder Acetyl-Einheiten generiert, was in einer beschleunigten Freisetzung des Monophosphats durch Hydrolyse resultieren sollte.^[256-257]

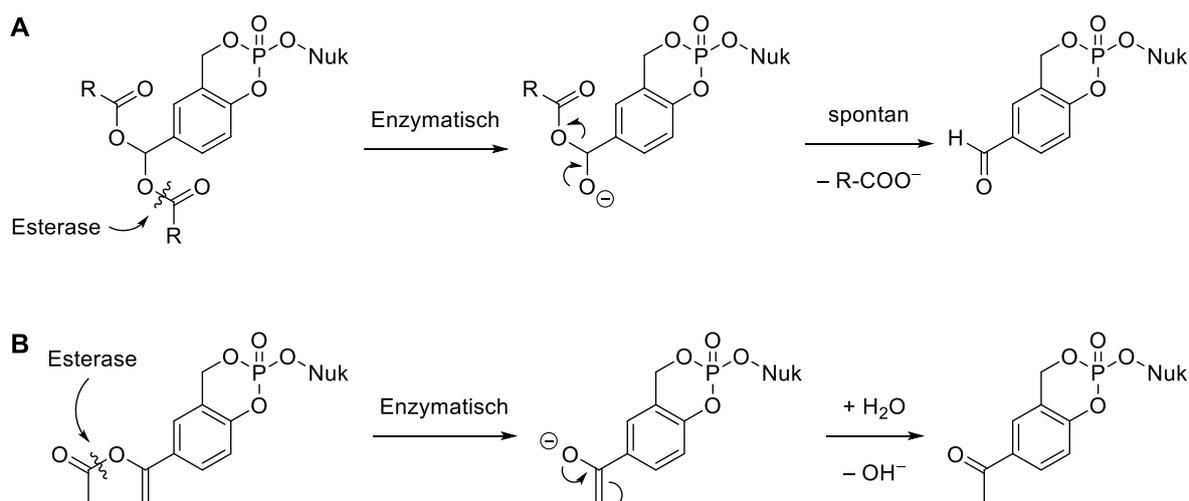
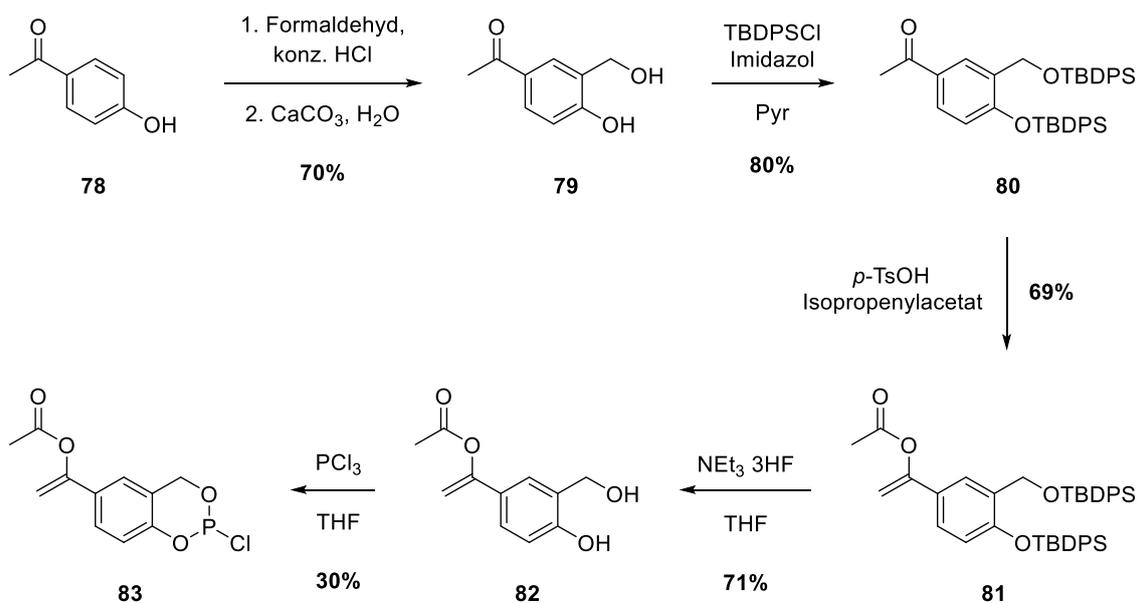


Abbildung 59: Enzym-vermittelte Umsetzung der *Lock-In*-*CycloSal*-Motive basierend auf **A**) einem geminalen Dicarboxylat oder **B**) einer Acetoxyvinyl Gruppe. Frei adaptiert nach *Gisch et al.*^[256-257]

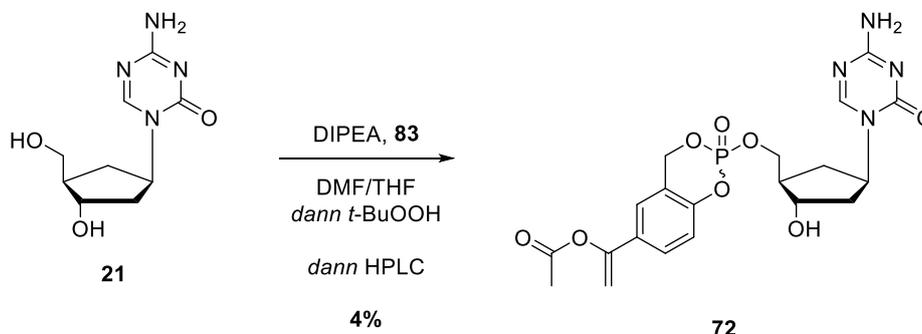
Für den synthetischen Zugang zu dem *Lock-In*-*CycloSal*-Prodrug **72** wurde den Protokollen von *Chris Meier et al.* folgend zunächst ausgehend von *p*-Acetophenol (**78**) durch Chloromethylierung und anschließende nucleophile Substitution der Salicylalkohol **79** generiert (Schema 14). Die Hydroxygruppen wurden als *tert*-Butyldiphenylsilyl (TBDPS) Ether unter Verwendung von TBDPSCI und Imidazol geschützt. Die erhaltene Verbindung **80** konnte bei der säulenchromatographischen Aufreinigung nur in analytischen Mengen in Reinform erhalten werden und wurde größtenteils mit *tert*-Butyldiphenylsilanol als Verunreinigung erhalten. Durch quantitatives NMR unter Verwendung von 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard wurde die tatsächliche Stoffmenge von **80** bestimmt und ohne weitere Aufreinigung mit Isopropenylacetat und *p*-Toluolsulfonsäure in das entsprechende 4-(1-Acetoxyvinyl)-Derivat **81** umgesetzt. Abermals konnte das Produkt im präparativen

Maßstab nicht durch Säulenchromatographie sauber isoliert werden. Das co-eluierende Nebenprodukt wurde als *tert*-Butyldiphenylsilylacetat identifiziert, die Ausbeute von **81** mittels quantitativer NMR-Analytik ermittelt und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Nach der Entschützung der Silyl-Schutzgruppen mit Triethylamintrihydrofluorid wurde der Salicylalkohol **82** in guter Ausbeute erhalten, welcher mit Phosphortrichlorid in das entsprechende zyklische Chlorophosphit **83** umgesetzt werden konnte.



Schema 14: Synthese des für die Darstellung des *Lock-In-CycloSal-Prodrugs* benötigte Chlorophosphits **83** ausgehend von *p*-Acetophenol (**78**).

Das *Lock-In-CycloSal-Prodrug* **72** wurde anschließend durch eine Reaktionssequenz bestehend aus Umsetzung von cAzadC (**21**) mit **83** und anschließender Oxidation mit TBHP generiert (Schema 15). Für die erste Aufreinigung wurde zunächst eine Normalphasen-Säulenchromatographie durchgeführt und anschließend die zwei diastereomeren Phosphortriester **72a** und **72b** mittels RP-HPLC weiter aufgereinigt und voneinander getrennt.



Schema 15: Synthese des *cAzadCMP-Lock-In-CycloSals* **72** durch Umsetzung von *cAzadC* (**21**) mit dem zyklischen Chlorophosphit **83**.

5.2.2 Biologische Evaluierung der cAzadC-Prodrugs

Nach der erfolgreichen Etablierung der synthetischen Zugänge zu den verschiedenen cAzadC-Prodrugs wurde anschließend deren Wirksamkeit in unterschiedlichen Zelllinien getestet. Hierfür wurden die Prodrugs in der Zellkultur verfüttert und nach 72 Stunden die genomische DNA (gDNA) der Zellen isoliert. Um den hypomethylierenden Effekt der Prodrugs zu untersuchen, wurde die gDNA einem Protokoll von *Schiffers et al.* folgend vollständig verdaut^[258] und mittels UHPLC-MS/MS die mdC-Level quantifiziert. Die relativen mdC-Level pro dG wurden dabei mit den Resultaten bei Fütterung von Decitabin und cAzadC verglichen. Im Fokus der Untersuchungen stand zunächst die Evaluierung der Prodrugs zur Behandlung von AML. Dementsprechend wurden alle drei Prodrugs in der AML-Zelllinie MOLM-13 getestet. Der Vergleich des CycloSal-Prodrugs **71** mit Decitabin (**20**) und cAzadC (**21**) zeigte, dass **71** in der Lage ist die mdC-Level ähnlich wie cAzadC (**21**) zu senken (Abbildung 60). Besonders bei höheren Konzentrationen (3.0 μM) wurde ein zu der Fütterung von 3.0 μM cAzadC (**21**) ähnlicher Wert für mdC/dG erhalten. Für die Diastereomere des ProTides **70a** und **70b** wurde hingegen keine hypomethylierende Wirkung im MOLM-13 beobachtet, was darauf schließen lässt, dass es für dieses Prodrug-Motiv in der genannten Zelllinie zu keiner intrazellulären Freisetzung des cAzadC-Monophosphats kommt.

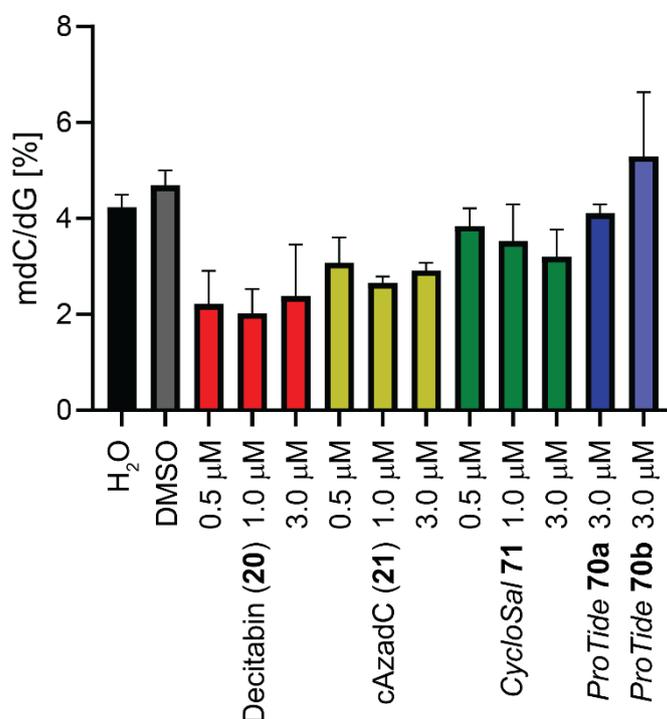


Abbildung 60: Relative mdC-Level pro dG für MOLM-13 Zellen nach Fütterung und Inkubation für 72 Stunden mit Decitabin (**20**, rot), cAzadC (**21**, gelb), CycloSal **71** (grün) und den Diastereomeren des ProTides **70** (blau). Die Daten wurden in Kollaboration mit Tina Aumer erhoben.

Aufgrund der Beobachtungen, welche die Schlussfolgerung erlauben, dass das CycloSal- gegenüber dem ProTide-Konzept besser geeignet ist um hypomethylierend in

MOLM-13 Zellen zu wirken, wurde versucht das *CycloSal*-Prodrug zu verbessern. Es wurde daraufhin das bereits beschriebene *Lock-In-CycloSal 72* synthetisiert und ebenfalls in MOLM-13 Zellen getestet (Abbildung 61). Die Daten zeigen deutlich, dass **72** nahezu auf gleiche Weise zu einer Reduktion der mdC-Level führt wie das freie cAzadC-Nukleosid (**21**). Dies stellt damit eine marginale Verbesserung gegenüber dem *CycloSal 71* dar, was den synthetischen Mehraufwand für **72** nicht rechtfertigt.

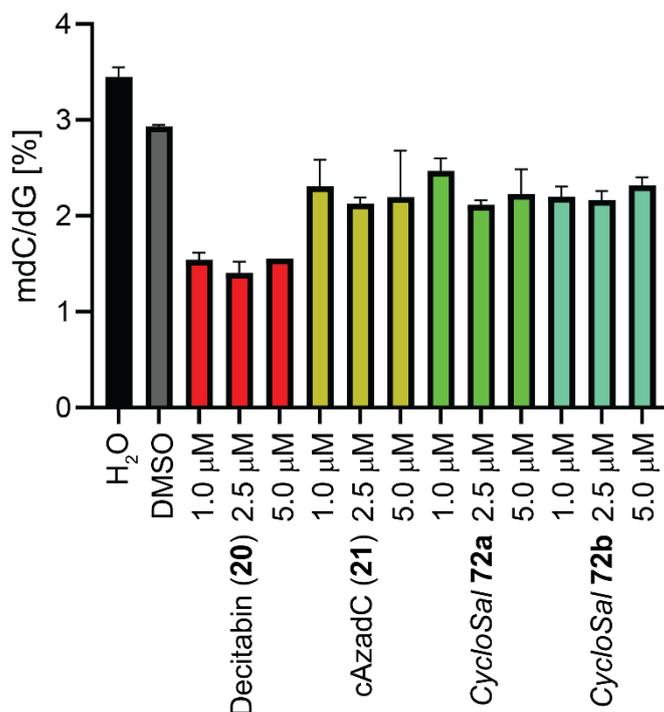


Abbildung 61: Relative mdC-Level pro dG für MOLM-13 Zellen nach Fütterung und Inkubation für 72 Stunden mit Decitabin (**20**, rot), cAzadC (**21**, gelb) und den Diastereomeren des *Lock-In-CycloSals 72* (grün). Die Daten wurden in Kollaboration mit *Tina Aumer* erhoben.

Um das *CycloSal*-Prodrug **71** sowie die *ProTides 70a* und **70b** weiter zu untersuchen, wurden diese in Lungenkrebszelllinien A549 (Abbildung 62A) und Calu3 (Abbildung 62B) getestet. Dabei wurde ersichtlich, dass das *CycloSal*-Prodrug **71** bei einer eingesetzten Konzentration von 3.0 µM den hypomethylierenden Effekt von cAzadC (**21**) und im Fall der Zelllinie A549 sogar von Decitabin (**20**) übertreffen konnte. Für das *ProTide 70* wurde wie bei MOLM-13 für beide Diastereomere keine Hypomethylierung gegenüber den unbehandelten Zellen (Kontrollen H₂O und DMSO) beobachtet.

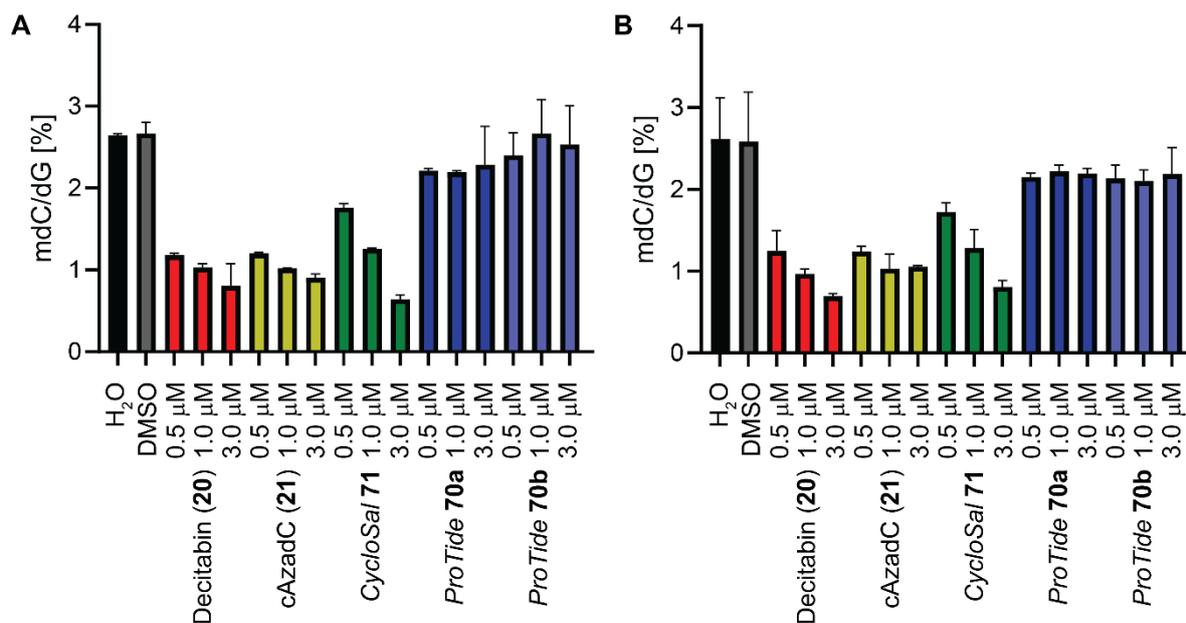


Abbildung 62: Relative mdC-Level pro dG für **A)** A549 und **B)** Calu3 Zellen nach Fütterung und Inkubation für 72 Stunden mit Decitabin (**20**, rot), cAzadC (**21**, gelb), CycloSal **71** (grün) und den Diastereomeren des *ProTides* **70** (blau). Die Daten wurden in Kollaboration mit *Tina Aumer* erhoben.

Da das verwendete *ProTide*-Motiv angelehnt an das erfolgreiche *Prodrug* Sofosbuvir in Leberzellen erfolgreich gespalten werden sollte, wurde *ProTide* **70** auch in der Leberkrebszelllinie HuH7 untersucht (Abbildung 63). Für eines der beiden Diastereomere (**70b**) wurde dabei ein konzentrationsabhängiger, hypomethylierender Effekt beobachtet.

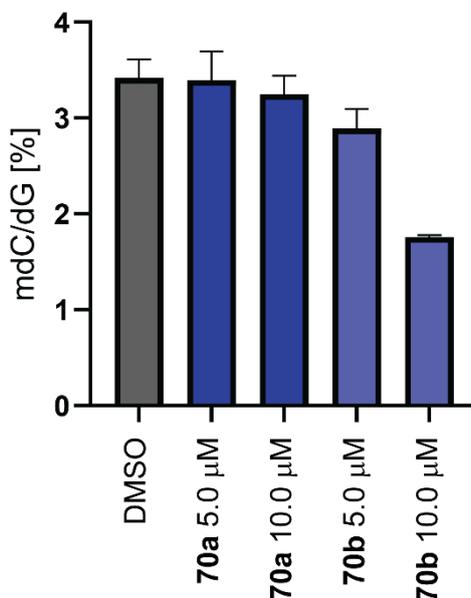


Abbildung 63: Relative mdC-Level pro dG für HuH7 Zellen nach Fütterung und Inkubation für 72 Stunden mit den Diastereomeren des *ProTides* **70** (blau). Die Daten wurden in Kollaboration mit *Tina Aumer* erhoben.

5.2.3 Ausblick zu cAzadC-Prodrugs

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei Monophosphat-*Prodrugs* für cAzadC synthetisiert, in Zellkultur an Krebszelllinien von Blut, Lunge und Leber biologisch evaluiert und mit cAzadC sowie Decitabin verglichen werden. Das Ziel, die benötigte Dosis von cAzadC durch Anwendung des *Prodrug*-Konzepts signifikant zu verringern und dabei die Methylierungslevel von dC auf vergleichbare Weise zu senken, konnte dabei für alle drei Kandidaten in Zellkultur nicht erreicht werden. Das *ProTide 70* zeigte weder in Blut- noch Lungenkrebszellen eine hypomethylierende Wirkung und konnte nur in einer Leberkrebszelllinie bei hohen Konzentrationen einen Effekt erzielen. Vergleichende Studien mit cAzadC (**21**) und Decitabin (**20**) stehen hierfür jedoch noch aus. Einen vielversprechenden *Prodrug*-Kandidaten stellt das *CycloSal-Prodrug 71* dar, dessen weiterführende Evaluierung Teil zukünftiger Forschung sein wird. Bei der Untersuchung der *Lock-In*-Variante **72** musste festgestellt werden, dass nur eine geringfügige Verbesserung gegenüber dem *CycloSal-Prodrug 71* erzielt werden konnte.

Da die angewendeten *Prodrug*-Strategien ein breites Spektrum gängiger Freisetzungsmechanismen basierend auf Esterasen, Phosphoramidasen und/oder chemischer Metastabilität abdecken, erscheint die Synthese von weiteren Derivaten der Monophosphat-*Prodrugs* zunächst nicht zielführend. Stattdessen sind Nachforschungen erstrebenswert, welche die Hintergründe dieser Beobachtungen aufdecken. Die Erkenntnisse dieser Arbeit deuten an, dass die zu erwartenden Unterschiede in der enzymatischen Phosphorylierung von cAzadC und Decitabin nicht die alleinige Ursache für die unterschiedliche Performance der beiden DNMT-Inhibitoren darstellt. Es ist denkbar, dass das Triphosphat von cAzadC durch DNA-Polymerasen schlechter als Substrat akzeptiert und eingebaut wird, als dies für das Decitabin-Triphosphat der Fall ist. Unter diesen Umständen könnte der Einbau des cAzadCTPs selbst der limitierende Faktor sein und ließe sich nicht durch Monophosphat-*Prodrugs* überwinden. Um jedoch zunächst mangelnde Funktionalität der synthetisierten *Prodrugs* auszuschließen zu können, sind Untersuchungen zur intrazellulären Metabolisierung der Verbindungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Fütterung durch Extraktionen des Flüssigkeitspools der Zellen essentiell. Darüber hinaus wären vergleichende Studien zur Kinetik der enzymatischen Phosphorylierung von Decitabin (**20**) und cAzadC (**21**) von Interesse. Zuletzt bleibt zu erwähnen, dass sich die beschriebenen Beobachtungen aus der zweidimensionalen Zellkultur nicht zwingend auf die Wirkungsweise im Gewebe eines Organismus übertragen lassen.^[259-260] Dementsprechend kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass *Prodrug*-Kandidaten wie das *CycloSal-Prodrug 71*, welches in Zellkultur zu ähnlichen Resultaten wie cAzadC führt, *in vivo* eine im Vergleich deutlich verstärkte Reduktion der mdC-Level bei gleicher Dosierung erzielt. Diese Frage bleibt somit Gegenstand zukünftiger Forschung.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemische Materialien und Methoden

Trockene Lösemittel und Reagenzien wurden von kommerziellen Anbietern wie *Sigma-Aldrich*, *Acros Organics*, *Carbosynth*, *TCI Europe*, *ABCR*, *VWR* und *Alfa Aesar* erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Vollentsalztes Wasser wurde vor der Verwendung über ein *Milli-Q Plus* System von *Merck Millipore* gereinigt.

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Reaktionen magnetisch gerührt sowie in ausgeheizten (Heißluftföhn, 550 °C) Glasreaktionsgefäßen und unter einer Schutzatmosphäre aus Argon durchgeführt. Für Reaktionen bei erhöhten Temperaturen wurden Ölbäder und elektrische Heizplatten verwendet. Für Reaktionen bei tiefen Temperaturen kamen entweder Eis in Wasser (0 °C), Trockeneis in Aceton (−78 °C) oder Trockeneis in Acetonitril (je nach Menge des verwendeten Trockeneises für Temperaturen zwischen −20 °C und −60 °C) zum Einsatz. Angegebene Reaktionstemperaturen beziehen sich auf die externe Badtemperatur.

Beim Ansetzen von Reaktionen wurden für das Überführen von flüssigen Reagenzien und Lösungsmitteln Kanülen und Spritzen verwendet, die zuvor mit Inertgas gespült wurden. Über Na_2SO_4 oder MgSO_4 trocknen, impliziert die Zugabe und das Rühren einer angemessenen Menge wasserfreiem Salz zur organischen Phase nach der wässrigen Aufarbeitung sowie die anschließende Entfernung des Trockenmittels per Filtration und Spülen des Filterkuchens mit zusätzlichem Lösemittel. Die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde bei erhöhtem Druck mit *Merck Geduran* Si 60 (40 – 63 μm) Silica Gel durchgeführt. Geeignete Lösemittelsysteme wurden vorab über Dünnschichtchromatographie (DC, Silica Gel 60-F₂₅₄ Platten von *Merck*) bestimmt. Auch für die Kontrolle des Reaktionsfortschritts, die Analyse der Fraktionen aus der Säulenchromatographie und die Messung von R_f -Werten wurde die DC verwendet. Die Auswertung der DC erfolgte über Fluoreszenzlöschung unter UV-Licht ($\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 366 \text{ nm}$) und/oder durch Färbung mit Lösungen von KMnO_4 (3 g KMnO_4 , 20 g K_2CO_3 , 5 mL 5%ige, wässrige NaOH , 300 mL H_2O) oder *p*-Anisaldehyd (3.7 mL *p*-Anisaldehyd, 135 mL EtOH , 5 mL konz. H_2SO_4 , 1.5 mL konz. AcOH).

Als zusätzliche Methode der Reaktionskontrolle oder der Analyse der Fraktionen aus der Säulenchromatographie wurde ein RP-LC-MS (*Reversed Phase Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) System eingesetzt. Die isolierten Verbindungen oder Reaktionsgemische wurden in Acetonitril und Wasser gelöst und in ein LC-MS System von *Thermo Fisher* injiziert. Dieses war aus einem *DIONEX UltiMate 3000* HPLC System (Pumpe, Auto Sampler, Säulenkompartment und *diode array detector*) und einem ESI-MS basierten *MSQ Plus single-quadrupole mass spectrometer* aufgebaut und ermöglichte Direktinjektionen und RP-säulenchromatographische Methoden mittels einer *Hypersil Gold C18* Selektivitätssäule (100 × 2.1 mm).

Für die RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*) Analyse und präparative Aufreinigung von sehr polaren oder über Normalphasen-Chromatographie schwer trennbaren Substanzen wurden folgende Geräte und Flussraten verwendet:

Analytische HPLC: *Agilent Technologies 1260 Infinity II* bestehend aus *1260 Flexible Pump*, *1260 Vialsampler* und *1260 MWD* sowie einer *EC 250/4 NUCLEODUR 100-3 C18ec* Säule von *Macherey-Nagel* mit einer Flussrate von 0.5 mL/min.

Präparative HPLC: *Agilent Technologies 1260 Infinity II* bestehend aus *1260 Quat Pump VL*, *1260 man. Inj.* und *1260 MWD* sowie einer *VP 250/10 NUCLEODUR 100-5 C18ec* Säule von *Macherey-Nagel* mit einer Flussrate von 5.0 mL/min.

Für die Durchführung von analytischer als auch präparativer HPLC kamen unterschiedliche Eluentensysteme zum Einsatz. Diese werden in nachfolgender Tabelle zusammengefasst:

Name d. Eluentensystems	Eluent A	Eluent B
Ungepuffert	H ₂ O	MeCN
Zusatz von TFA	H ₂ O + 0.1 Vol.-% TFA	MeCN + 0.1 Vol.-% TFA
Triethylammoniumacetat	0.1 M NEt ₃ /HOAc in H ₂ O	0.1 M NEt ₃ /HOAc in 80% MeCN

Geeignete Eluentensysteme sowie Elutionsgradienten wurden zunächst für die entsprechenden Produkte auf einer analytischen HPLC optimiert und anschließend für die semipräparative Aufreinigung verwendet und/oder geringfügig angepasst.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spektroskopie: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren sowie 2D-Spektren (COSY, HSQC, HMBC) wurden soweit nicht spezifiziert, bei Raumtemperatur von der NMR-Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Chemie (Haus F), an einem *Bruker ARX 300*, *Varian Inova 400*, *Varian VXR400S* und an einem *Bruker ARX 600* oder selbstständig an einem *Bruker Ascend 400* gemessen. Die chemische Verschiebung (δ) wird nach allgemeingültiger Konvention in *parts per million* (ppm) tieffeldverschoben zum Standard Tetramethylsilan (TMS) angegeben und relativ zum verbleibenden undeutierten Lösungsmittel als internen Standard nach *Gottlieb et al.*^[261] referenziert. Die Multiplizität der Signale wird als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), p (Pentett), h (Heptett), m (Multipllett) und deren Kombinationen angegeben. Die Multiplizitäten können durch die voranstehende Abkürzung br (breit) ergänzt werden. Kopplungskonstanten (*J*) in ¹H-Spektren beziehen sich, falls nicht anders angegeben auf ³J-¹H,¹H-Kopplungen und sind in Hertz (Hz) angegeben. Im Fall von phosphorhaltigen Substanzen beziehen sich Kopplungskonstanten in ¹³C-Spektren auf ¹³C,³¹P Kopplungen und sind in Hz angegeben. Bei der Analyse von Diastereomergemischen aus zwei Diastereomeren D₁ und D₂ sind sofern nicht anders angegeben für ¹H- und ¹³C-Spektren zusammengehörige Signale zusammengefasst (z.B. 2s, 2d, 2t, 2m für zwei unmittelbar nebeneinanderliegender Signale der entsprechenden Multiplizität). Für die Diastereomergemische für die D₁/D₂ = 1:1 nicht gilt, wurden darüber

hinaus für ^1H -NMR Spektren die Integrale so normiert, dass eine Angabe der Protonenanzahl in ganzen Zahlen erfolgen kann.

Zur Auswertung der NMR-Spektren wurde die Software *MestreNova* von *Mestrelab Research S.L.K* in den aktuellsten Versionen verwendet. Die angegebenen Nummerierungen sowie die Nomenklatur der untersuchten Verbindungen sind zum einfacheren Verständnis nicht zwangsläufig im Einklang mit IUPAC. Um unerwünschten Reaktionen der zu untersuchenden Substanzen mit möglichen Säureresten in CDCl_3 vorzubeugen, wurde in das Lösemittelbehältnis etwas basisches Aluminiumoxid gegeben. Im Fall, dass die Menge des isolierten Produkts nicht für ein ^{13}C -NMR mit einem hohen Signal-zu-Rausch Verhältnis ausreichend war, wurden 2D-NMR Spektren (HSQC, HMBC) verwendet um die ^{13}C Signale zu detektieren. Produkte, die sich aus mehr als zwei Diastereomeren zusammensetzten oder deren Aufreinigung keine Isolation einzelner Diastereomere ermöglichte, wurden nicht mittels NMR Spektroskopie charakterisiert.

High-resolution mass spectrometry (HRMS): Hochaufgelöste Massenspektren wurden von der Analytik-Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Chemie (Haus F), auf folgenden Geräten aufgenommen: *Thermo Finnigan MAT 95* (für GC/EI oder DEP/EI) und *Thermo Finnigan LTQ FT* (für ESI). Selbstständige Messungen wurden auf einem *Thermo Finnigan LTQ FT-ICR* (ESI) durchgeführt.

Infrared (IR) Spektroskopie: IR Spektren wurden an einem *Spectrum BX FT-IR* System von *Perkin Elmer* mit *Attenuated Total Reflection (ATR)* Messkopf aufgenommen. Nach einer Hintergrundsignalmessung wurden die Proben ohne weitere Präparation direkt auf den Probenkopf aufgetragen. Der Analysebereich lag zwischen 4500 cm^{-1} und 600 cm^{-1} . Die relative Intensität der Signale wurde mit s (stark), m (medium), w (schwach) konkretisiert.

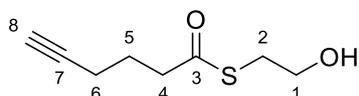
Ultraviolet-visible (UV-VIS) Spektroskopie: UV-VIS Spektren wurden an einem *JASCO V-650* Spektrometer gemessen. Vor der Durchführung der Messreihen wurde zunächst eine Hintergrundsignalmessung in Form eines Transmissionspektrum in dem zu verwendeten Lösemittel aufgenommen.

Melting point (mp): Unkorrigierte Schmelzpunkte wurden an einem *EZ-Melt* Gerät von *Stanford Research Systems* gemessen.

Rotationsverdampfer: Zur *in vacuo* Destillation der Lösemittel wurde ein *Laborota 4000* der Firma *Heidolph* verwendet. Sofern nicht abweichend angegeben, wurde das Wasserbad auf $40\text{ }^\circ\text{C}$ geheizt. Für besonders hydrolyse- und/oder luftempfindliche Substanzen wurde der Rotationsverdampfer sowohl vor der Verwendung evakuiert und über einen Ballon mit Argon geflutet als auch nach Beendigung der Destillation durch Argoneinleitung auf Normaldruck gebracht.

6.2 Experimentelle Vorschriften zum mono-SATE-Prodrug

S-(2-Hydroxyethyl)hex-5-inthioat (Alkin-SATE-Alkohol **33**)



Zu einer Lösung von 5-Hexinsäure (**31**, 4.00 mL, 36.2 mmol, 1.0 Äq) und β -Mercaptoethanol (**32**, 3.80 mL, 54.4 mmol, 1.5 Äq) in trockenem MeCN (200 mL) wurde bei 0° C DCC (7.47 g, 36.2 mmol, 1.0 Äq) gegeben und für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die resultierende Suspension wurde filtriert und das Lösemittel des Filtrats *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in kaltem Et₂O suspendiert und erneut filtriert sowie das Lösemittel des Filtrats unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM:EtOAc = 49:1 → 19:1) gereinigt und das Produkt **33** (4.08 g, 23.7 mmol, 65%) als farbloses Öl erhalten.

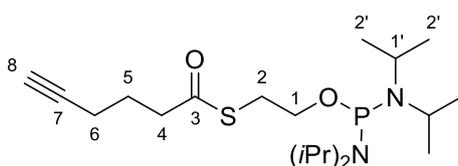
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.76 (q, J = 6.0 Hz, 2H, H-1), 3.08 (t, J = 6.1 Hz, 2H, H-2), 2.73 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-4), 2.26 (td, J = 6.9, 2.7 Hz, 2H, H-6), 1.99 (t, J = 2.6 Hz, 1H, H-8), 1.88 (p, J = 7.0 Hz, 2H, H-5).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 199.41 (C-3), 83.08 (C-7), 69.58 (C-8), 61.90 (C-1), 42.69 (C-4), 31.94 (C-2), 24.17 (C-5), 17.84 (C-6).

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3288 (w), 2932 (w), 2855 (w), 2117 (w), 1682 (s), 1524 (w), 1452 (w), 1433 (w), 1410 (w), 1349 (w), 1288 (w), 1229 (w), 1162 (w), 1067 (s), 1044 (s), 1017 (s), 976 (s), 937 (m), 893 (w), 840 (w), 736 (m).

R_f = 0.54 (DCM:EtOAc = 4:1).

Alkin-SATE-Phosphorodiamidit (**34**)



Zu einer Suspension von Bis(diisopropylamino)chlorophosphin (2.95 g, 11.1 mmol, 1.0 Äq) und NEt₃ (3.09 mL, 22.2 mmol, 2.0 Äq) in trockenem Et₂O (45 mL) wurde unter Argonatmosphäre bei 0 °C der Alkohol **33** (2.00 g, 11.6 mmol, 1.05 Äq) zugegeben und die Reaktionsmischung für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit

Et₂O (90 mL) und NEt₃ (10 mL) verdünnt, auf die Hälfte des Volumens *in vacuo* konzentriert und mit cHex (40 mL) verdünnt. Nach Entfernen der Hälfte des Lösemittels unter reduziertem Druck wurde die verbleibende Suspension direkt säulenchromatographisch (Silica Gel, cHex + 6% NEt₃) aufgereinigt und das Phosphorodiamidit **34** (3.74 g, 9.29 mmol, 84%) als farbloses Öl erhalten.

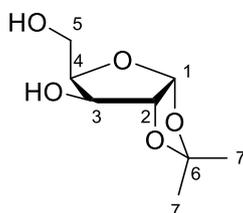
¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 3.64 (dt, *J* = 7.5, 6.4 Hz, 2H, H-1), 3.51 (dp, *J* = 10.8, 6.8 Hz, 4H, H-1'), 3.11 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, H-2), 2.68 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-4), 2.24 (td, *J* = 7.0, 2.6 Hz, 2H, H-6), 2.01 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-8), 1.85 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-5), 1.15 (dd, *J* = 6.8, 3.7 Hz, 24H, H-2').

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) δ [ppm] = 198.88 (C-3), 83.71 (C-8), 69.47 (C-8), 63.39 (d, *J* = 22.9 Hz, C-1), 44.90 (d, *J* = 12.4 Hz, C-1'), 43.06 (C-4), 31.20 (d, *J* = 9.1 Hz, C-2), 24.85 (d, *J* = 8.0 Hz, C-2'), 24.79 (C-5), 24.09 (d, *J* = 8.0 Hz, C-2'), 18.17 (C-6).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 124.03.

R_f = 0.61 (cHex:DCM:NEt₃ = 6:3:1).

1,2-O-Isopropylidenxylofuranose (**36**)^[220]



D-Xylose (**35**, 20.0 g, 133 mmol, 1.0 Äq) wurde in Aceton (520 mL) gelöst, konz. H₂SO₄ (20.0 mL) zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Eine Lösung von NaHCO₃ (26.0 g, 309 mmol, 2.3 Äq) in Wasser (224 mL) wurde zur gelben Reaktionslösung gegeben und die Temperatur durch externe Kühlung mit einem Eisbad unter 20 °C gehalten. Bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung für 150 Minuten gerührt und anschließend Na₂CO₃ (54 g) sowie NaOH (10%) zur Suspension gegeben bis ein pH-Wert von 7 erreicht wurde. Die Salze wurden abfiltriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM:MeOH = 49:1 → 24:1 → 47:3) aufgereinigt und der geschützte Zucker **36** (19.5 g, 102 mmol, 77%) als farbloses Öl erhalten.

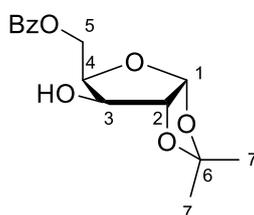
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.99 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-1), 4.53 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-2), 4.34 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-4), 4.20 – 4.14 (m, 2H, H-3, H-5a), 4.10 – 4.04 (m, 1H, H-5b), 2.49 (s, 2H, 2 × OH), 1.49 (s, 3H, H-7a'), 1.33 (s, 3H, H-7b').

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 111.96 (C-6), 105.05 (C-1), 85.86 (C-2), 78.52 (C-3), 77.39 (C-4), 61.55 (C-5), 26.94 (C-7), 26.31 (C-7).

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3389 (w), 2988 (w), 2365 (w), 1643 (w), 1375 (m), 1214 (m), 1163 (m), 1068 (s), 1005 (s), 885 (m), 856 (m), 825 (m), 787 (m), 734 (s), 700 (m).

R_f = 0.15 (DCM:MeOH = 24:1).

5-O-Benzoyl-1,2-O-isopropylidenxylofuranose (**37**)^[262]



Zu einer Lösung von Zucker **36** (10.3 g, 54.2 mmol, 1.0 Äq) in trockenem DCM (216 mL) und trockenem Pyridin (16.5 mL) wurde unter Argonatmosphäre bei 0 °C Benzoylchlorid (6.91 mL, 59.6 mmol, 1.1 Äq) über einen Zeitraum von 30 Minuten tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und MeOH (50 mL) zugegeben. Das Lösemittel wurde in vacuo entfernt und der Rückstand in DCM (200 mL) aufgenommen und mit gesättigter, wässriger NaHCO_3 -Lösung (200 mL) und gesättigter, wässriger NaCl -Lösung (200 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, *i*Hex:EtOAc = 9:1 \rightarrow 4:1) aufgereinigt und der geschützte Zucker **37** (15.9 g, 54.0 mmol, quant.) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.05 (dd, J = 8.2, 1.1 Hz, 2H, H-Bz), 7.60 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H-Bz), 7.46 (dd, J = 8.5, 7.1 Hz, 2H, H-Bz), 5.96 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-1), 4.80 (dd, J = 12.8, 9.4 Hz, 1H, H-5a), 4.60 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H-2), 4.42 – 4.33 (m, 2H, H-4, H-5b), 4.18 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-3), 1.51 (s, 3H, H-7a), 1.32 (s, 3H, H-7b).

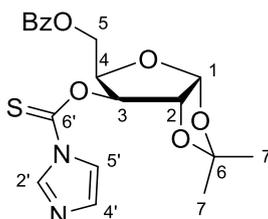
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 167.58 (C-Bz), 133.76 (C-Bz), 130.05 (C-Bz), 129.31 (C-Bz), 128.66 (C-Bz), 112.00 (C-6), 104.85 (C-1), 85.13 (C-2), 78.65 (C-4), 74.47 (C-3), 61.32 (C-5), 26.94 (C-7a), 26.28 (C-7b).

HRMS ((+)-EI):	berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_6^+$:	295.1176 [M+H] ⁺
	gefunden:	295.1171 [M+H] ⁺

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3451 (w), 3177 (w), 1713 (s), 1664 (w), 1452 (w), 1373 (w), 1274 (m), 1217 (m), 1166 (m), 1066 (s), 1011 (s), 975 (m), 892 (m), 857 (m), 830 (m), 801 (m), 705 (s).

$R_f = 0.56$ (*i*Hex:EtOAc = 1:1).

3-O-(1*H*)-Imidazolthiocarbonyl-5-O-benzoyl-1,2-O-isopropylidenxylofuranose (**38**)^[262]



Zu einer Lösung von **37** (6.49 g, 22.1 mmol, 1.0 Äq) in trockenem DMF (97 mL) wurde unter Argonatmosphäre Thiocarbonyldiimidazol (3.99 g, 22.3 mmol, 1.01 Äq) zugegeben. Nach der Zugabe von Imidazol (300 mg, 4.41 mmol, 0.2 Äq) wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt, der Rückstand in EtOAc (200 mL) gelöst und mit gesättigter, wässriger NaHCO_3 -Lösung (200 mL) sowie gesättigter, wässriger NaCl -Lösung (200 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, *i*Hex:EtOAc = 9:1 \rightarrow 4:1 \rightarrow 1:1 \rightarrow 1:4) gereinigt und die Thiocarbonylverbindung **38** (6.23 g, 15.4 mmol, 70%) als viskoses, gelbliches Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.33 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H, H-2'), 8.02 – 7.97 (m, 2H, H-Bz), 7.60 – 7.53 (m, 2H, H-Bz, H-4'), 7.42 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-Bz), 7.05 (dd, $J = 1.7, 0.8$ Hz, 1H, H-5'), 6.05 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-1), 6.00 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, H-3), 4.78 (t, $J = 3.8$ Hz, 2H, H-2, H-4), 4.60 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, H-5), 1.58 (s, 3H, H-7a), 1.36 (s, 3H, H-7b).

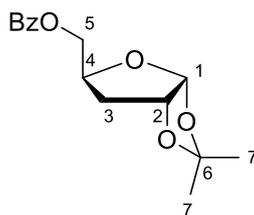
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 182.42 (C-6'), 166.09 (C-Bz), 137.13 (C-2'), 133.53 (C-Bz), 131.46 (C-5'), 129.89 (C-Bz), 129.33 (C-Bz), 128.58 (C-Bz), 117.75 (C-4'), 112.97 (C-6), 104.98 (C-1), 84.32 (C-3), 82.91 (C-2), 76.76 (C-4), 61.29 (C-5), 26.68 (C-7a), 26.33 (C-7b).

HRMS ((+)-ESI):

berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}^+$:	405.1115 [M+H] ⁺
gefunden:	405.1115 [M+H] ⁺

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2988 (w), 1719 (m), 1601 (w), 1466 (w), 1390 (m), 1329 (m), 1270 (s), 1209 (s), 1162 (m), 1089 (s), 1069 (s), 1015 (s), 979 (s), 890 (m), 837 (m), 708 (s), 653 (m).

$R_f = 0.64$ (*i*Hex:EtOAc = 1:1).

5-O-Benzoyl-1,2-O-isopropyliden-3-deoxyribofuranose (39)^[262]

Eine Lösung von **38** (6.21 g, 15.4 mmol, 1.0 Äq) in trockenem Toluol (96 mL) wurde für 20 Minuten durch Stickstoffstrom mit Inertgas gesättigt und Tris(trimethylsilyl)silan (5.68 mL, 18.4 mmol, 1.2 Äq) zugetropft. Nach Zugabe von AIBN (506 mg, 3.08 mmol, 0.2 Äq) wurde die Reaktionsmischung für 150 Minuten auf 90 °C erhitzt bis eine DC vollständige Umsetzung des Startmaterials anzeigte. Die Reaktionslösung wurde daraufhin unter verminderten Druck auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens konzentriert und direkt säulenchromatographisch (Silica Gel, *i*Hex:EtOAc = 19:1 → 9:1 → 4:1) gereinigt. Das deoxygenierte Produkt **39** (3.89 g, 14.0 mmol, 91%) wurde als farbloses Öl erhalten.

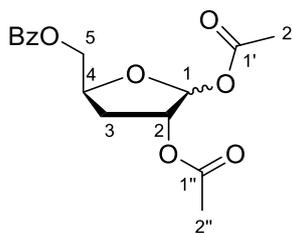
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.08 – 8.02 (m, 2H, H-Bz), 7.60 – 7.52 (m, 1H, H-Bz), 7.43 (dd, *J* = 8.4, 7.1 Hz, 2H, H-Bz), 5.87 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-1), 4.78 (t, *J* = 4.2 Hz, 1H, H-2), 4.61 – 4.49 (m, 2H, H-4, H-5a), 4.41 – 4.32 (m, 1H, H-5b), 2.18 (dd, *J* = 13.3, 4.3 Hz, 1H, H-3a), 1.82 – 1.71 (m, 1H, H-3a), 1.53 (s, 3H, H-7a), 1.33 (s, 3H, H-7b).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 166.47 (C-Bz), 133.25 (C-Bz), 129.92 (C-Bz), 129.88 (C-Bz), 128.48 (C-Bz), 111.46 (C-6), 105.84 (C-1), 80.38 (C-2), 75.92 (C-4), 65.38 (C-5), 35.53 (C-3), 26.87 (C-7a), 26.26 (C-7b).

HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₁₅H₁₉O₅⁺: 279.1227 [M+H]⁺
 gefunden: 279.1231 [M+H]⁺

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2988 (w), 2936 (w), 2252 (w), 1719 (m), 1602 (w), 1451 (w), 1373 (w), 1271 (s), 1214 (m), 1163 (m), 1096 (m), 1066 (m), 1022 (s), 907 (m), 845 (m), 730 (s), 709 (s).

R_f = 0.55 (*i*Hex:EtOAc = 9:1).

1,2-O-Diacetyl-5-O-benzoyl -3-deoxyribofuranose (40)^[262]

Zu einer Lösung von **39** (3.84 g, 13.8 mmol, 1.0 Äq) in AcOH (69 mL) wurde Ac₂O (7.83 mL) sowie konz. H₂SO₄ (6 Tropfen) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und zunächst mit festem NaHCO₃ und anschließend gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Die resultierende Suspension wurde mit H₂O (100 mL) verdünnt und mit DCM (3 × 250 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (250 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, *i*Hex:EtOAc = 9:1 → 4:1 → 1:1) gereinigt und **40** (3.57 g, 11.1 mmol, 80%) als farbloses Öl erhalten.

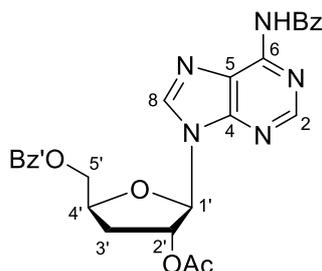
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.12 – 8.00 (m, 2H, H-Bz), 7.61 – 7.52 (m, 1H, H-Bz), 7.48 – 7.37 (m, 1H, H-Bz), 6.20 (s, 1H, H-1), 5.23 (dd, *J* = 4.8, 1.1 Hz, 1H, H-2), 4.77 – 4.67 (m, 1H, H-4), 4.54 (dd, *J* = 11.9, 3.7 Hz, 1H, H-5a), 4.33 (dd, *J* = 11.9, 5.4 Hz, 1H, H-5b), 2.39 – 2.14 (m, 2H, H-3), 2.09 (s, 3H, H-2''), 1.97 (s, 3H, H-2').

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 170.09 (C-1'), 169.43 (C-1'), 166.34 (C-Bz), 133.38 (C-Bz), 129.85 (C-Bz), 128.64 (C-Bz), 128.53 (C-Bz), 99.58 (C-1), 78.85 (C-4), 77.35 (C-2), 66.12 (C-5), 31.68 (C-3), 21.21 (C-2'), 21.04 (C-2'').

HRMS ((+)-ESI):	berechnet für C ₁₆ H ₁₈ O ₇ Na ⁺ :	345.0945 [M+Na] ⁺
	gefunden:	345.0954 [M+Na] ⁺

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2950 (w), 1741 (s), 1716 (s), 1601 (w), 1451 (w), 1371 (m), 1273 (m), 1219 (s), 1096 (s), 1055 (m), 964 (s), 890 (m), 806 (w), 710 (s).

R_f = 0.21 (*i*Hex:EtOAc = 4:1).

2'-O-Ac-5'-O-Bz-N⁶-Bz-3'-Deoxyadenosin (41)^[263]

N⁶-Benzoyladenin (3.80 g, 15.9 mmol, 1.5 Äq) und **40** (3.43 g, 10.6 mmol, 1.0 Äq) wurden in trockenem DCE (133 mL) gelöst, BSA (10.4 mL, 42.4 mmol, 4.0 Äq) zugegeben und die Reaktionsmischung für eine Stunde auf 80 °C erhitzt. Bei Raumtemperatur wurde anschließend TMSOTf (3.84 mL, 21.2 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei 80 °C gerührt. Die dunkelbraune Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (200 mL) versetzt und mit DCM (3 × 250 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (250 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, *i*Hex:EtOAc = 1:5 → 0:1) gereinigt und geschütztes 3'-Deoxyadenosin **41** (4.65 g, 9.27 mmol, 87%) als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.74 (s, 1H, H-2), 8.13 (s, 1H, H-8), 8.04 – 7.99 (m, 2H, H-Bz), 7.98 – 7.93 (m, 2H, H-Bz'), 7.63 – 7.55 (m, 1H, H-Bz), 7.55 – 7.48 (m, 3H, 2 × H-Bz, H-Bz'), 7.41 (dd, *J* = 8.3, 7.2 Hz, 2H, H-Bz'), 6.11 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-1'), 5.87 (dt, *J* = 6.2, 1.6 Hz, 1H, H-2'), 4.78 (dtd, *J* = 10.7, 5.4, 3.0 Hz, 1H, H-4'), 4.70 (dd, *J* = 12.2, 3.0 Hz, 1H, H-5a'), 4.53 (dd, *J* = 12.2, 5.3 Hz, 1H, H-5b'), 2.87 (ddd, *J* = 14.0, 10.4, 6.1 Hz, 1H, H-3a'), 2.33 (ddd, *J* = 13.9, 5.6, 1.5 Hz, 1H, H-3b'), 2.15 (s, 3H, H-Ac).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 170.33 (C-Ac), 166.37 (C-Bz'), 164.72 (C-Bz), 152.85 (C-2), 151.14 (C-4), 149.76 (C-6), 142.04 (C-8), 133.73 (C-Bz), 133.48 (C-Bz'), 132.91 (C-Bz), 129.72 (C-Bz'), 129.49 (C-Bz'), 128.97 (C-Bz), 128.60 (C-Bz'), 127.99 (C-Bz), 123.62 (C-5), 90.53 (C-1'), 79.08 (C-4'), 77.95 (C-2'), 64.91 (C-5'), 33.15 (C-3'), 21.03 (C-Ac).

HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₂₆H₂₄N₅O₆⁺: 502.1721 [M+H]⁺
gefunden: 502.1721 [M+H]⁺

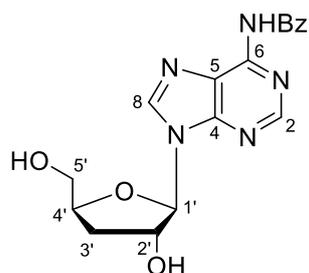
HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₂₆H₂₂N₅O₆⁻: 500.1576 [M-H]⁻
gefunden: 500.1575 [M-H]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1698 (m), 1608 (m), 1579 (m), 1510 (w), 1485 (w), 1450 (m), 1373 (w), 1314 (m), 1235 (s), 1084 (m), 1070 (m), 1049 (m), 909 (m), 796 (m), 707 (s).

Schmelzpunkt: $T_S = 81 - 82 \text{ } ^\circ\text{C}$.

$R_f = 0.56$ (EtOAc).

***N*⁶-Bz-3'-deoxyadenosin (**42**)^[264]**



Zu einer Lösung von **41** (4.62 g, 9.22 mmol, 1.0 Äq) in Pyridin (58 mL) und MeOH (15 mL) wurde bei $0 \text{ } ^\circ\text{C}$ verdünnte NaOH (2 M, 14.0 mL) zugegeben und für 20 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von verdünnter HCl (2 M, 12.0 mL) beendet, Pyridin (50 mL) zugegeben und die Lösemittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit Pyridin co-evaporiert und anschließend mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM:MeOH = 49:1 \rightarrow 19:1 \rightarrow 9:1 \rightarrow 4:1) aufgereinigt. Das Produkt **42** (2.89 g, 8.12 mmol, 88%) wurde als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 11.20 (s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, H-2), 8.74 (s, 1H, H-8), 8.05 (d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H, H-Bz), 7.69 – 7.61 (m, 1H, H-Bz), 7.55 (dd, $J = 8.2, 6.8 \text{ Hz}$, 2H, H-Bz), 6.04 (d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, H-1'), 5.78 (d, $J = 4.0 \text{ Hz}$, 1H, 2'-OH), 5.10 (t, $J = 5.4 \text{ Hz}$, 1H, 5'-OH), 4.70 – 4.63 (m, 1H, H-2'), 4.42 (ddt, $J = 9.4, 6.7, 3.5 \text{ Hz}$, 1H, H-4'), 3.74 (ddd, $J = 12.0, 5.4, 3.3 \text{ Hz}$, 1H, H-5a'), 3.56 (ddd, $J = 12.0, 5.5, 3.9 \text{ Hz}$, 1H, H-5b'), 2.29 (ddd, $J = 13.1, 9.2, 5.5 \text{ Hz}$, 1H, H-3a'), 1.95 (ddd, $J = 13.1, 6.2, 2.7 \text{ Hz}$, 1H, H-3b').

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.65 (C-Bz), 151.81 (C-4), 151.58 (C-2), 150.29 (C-6), 142.64 (C-8), 133.39 (C-Bz), 132.50 (C-Bz), 128.52 (2 \times C-Bz), 125.81 (C-5), 90.93 (C-1'), 81.20 (C-4'), 74.91 (C-2'), 62.26 (C-5'), 33.85 (C-3').

HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₁₇H₁₈N₅O₄⁺: 356.1353 [M+H]⁺
 gefunden: 356.1353 [M+H]⁺

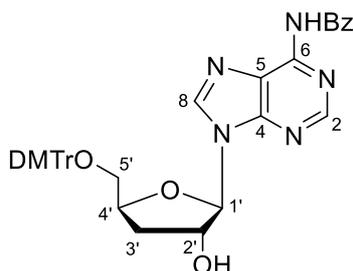
HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₁₇H₁₆N₅O₄⁻: 354.1208 [M-H]⁻
 gefunden: 354.1207 [M-H]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3266 (w), 1709 (m), 1614 (m), 1584 (m), 1455 (m), 1344 (w), 1294 (w), 1256 (w), 1212 (m), 1172 (w), 1120 (w), 1072 (m), 1049 (m), 1028 (w), 973 (w), 796 (m), 751 (m), 709 (s), 682 (m).

Schmelzpunkt: $T_s = 209 - 212$ °C.

$R_f = 0.32$ (DCM:MeOH = 23:2).

5'-O-DMTr-*N*⁶-Bz-3'-Deoxyadenosin (43)^[264]



Zu einer Lösung von **42** (2.85 g, 8.01 mmol, 1.0 Äq) in trockenem Pyridin (80 mL) wurde DMTrCl (3.26 g, 9.61 mmol, 1.2 Äq) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt, der Rückstand in DCM (400 mL) gelöst und mit gesättigter, wässriger NaHCO_3 -Lösung (400 mL) sowie gesättigter, wässriger NaCl -Lösung (400 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH + 0.5% $\text{NEt}_3 = 99:1 \rightarrow 49:1$) aufgereinigt und **43** (4.49 g, 6.82 mmol, 85%) als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.77 (s, 1H, H-2), 8.33 (s, 1H, H-8), 8.08 – 8.00 (m, 2H, H-Bz), 7.65 – 7.58 (m, 1H, H-Bz), 7.53 (dd, $J = 8.2, 6.7$ Hz, 2H, H-Bz), 7.41 – 7.37 (m, 2H, H-DMTr), 7.32 – 7.17 (m, 8H, H-DMTr), 6.84 – 6.76 (m, 4H, H-DMTr), 6.05 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-1'), 4.92 (ddd, $J = 6.7, 4.5, 2.7$ Hz, 1H, H-2'), 4.72 (dt, $J = 7.3, 3.5$ Hz, 1H, H-4'), 3.78 (s, 6H, 2 × OMe), 3.44 (dd, $J = 10.6, 3.2$ Hz, 1H, H-5a'), 3.30 (dd, $J = 10.6, 4.4$ Hz, 1H, H-5b'), 2.34 (ddd, $J = 13.7, 7.9, 6.1$ Hz, 1H, H-3'), 2.19 (ddd, $J = 13.1, 6.7, 4.2$ Hz, 1H, H-3').

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 164.85 (C-Bz), 158.63 (C-DMTr), 158.61 (C-DMTr), 152.35 (C-2), 150.87 (C-4), 149.85 (C-Ar), 149.72 (C-DMTr), 144.58 (C-DMTr), 141.34 (C-8), 136.17 (C-Ar), 135.80 (C-DMTr), 135.71 (C-DMTr), 133.75 (C-DMTr), 132.93 (C-Bz), 130.14 (C-DMTr), 130.08 (C-DMTr), 128.96 (C-Bz), 128.16 (C-DMTr), 128.02 (C-Bz), 127.98 (C-DMTr), 127.02 (C-DMTr), 123.89 (C-6), 123.45 (C-5), 113.26 (C-DMTr), 93.20 (C-1'), 86.55 (C-DMTr), 80.64 (C-4'), 76.14 (C-2'), 64.93 (C-5'), 55.32 (2 × C-OMe), 34.27 (C-3').

HRMS ((+)-ESI): berechnet für $C_{38}H_{36}N_5O_6^+$: 658.2660 [M+H]⁺
 gefunden: 658.2662 [M+H]⁺

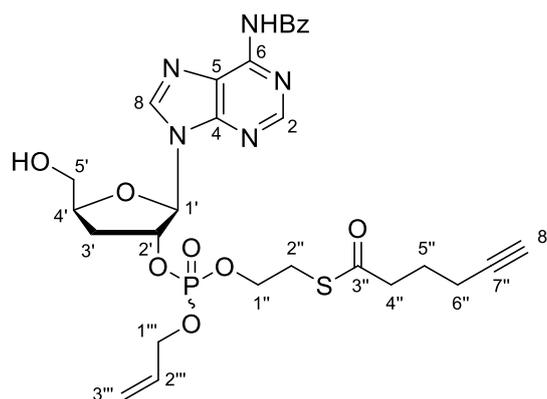
HRMS ((-)-ESI): berechnet für $C_{38}H_{34}N_5O_6^-$: 656.2515 [M-H]⁻
 gefunden: 656.2515 [M-H]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3265 (w), 2931 (w), 1698 (w), 1608 (s), 1580 (m), 1508 (s), 1453 (s), 1402 (w), 1296 (m), 1247 (s), 1218 (m), 1174 (s), 1070 (s), 1030 (s), 906 (m), 828 (s), 796 (m), 726 (s), 703 (s).

Schmelzpunkt: $T_s = 97 - 103$ °C.

$R_f = 0.32$ (DCM:MeOH = 24:1).

2'-((Allyl, SATE)-phosphat)-N⁶-Bz-3'-deoxyadenosin (**44**)



Zu einer Lösung von **43** (1.00 g, 1.52 mmol, 1.0 Äq) in trockenem DCM (17 mL) wurde unter Agronatmosphäre **34** (734 mg, 1.82 mmol, 1.2 Äq) zugegeben. Nach Zugabe von Pyr-TFA (351 mg, 1.82 mmol, 1.2 Äq) wurde die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anschließend Allylalkohol (0.52 mL, 7.60 mmol, 5.0 Äq) sowie BTT (0.3 M in MeCN, 10.1 mL, 3.04 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und für weitere 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von *t*-BuOOH (5.5 M in Decan, 0.83 mL, 4.56 mmol, 3.0 Äq) wurde weitere 30 Minuten gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von wässriger NaHSO₃-Lösung (500 mg/mL, 1.90 mL, 9.12 mmol, 6.0 Äq) bei 0 °C beendet. Nach Verdünnen der Suspension mit H₂O (200 mL), wurde mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (300 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (24.3 mL) gelöst, H₂O (0.27 mL) sowie DCA (6% in DCM, 24.3 mL) zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die orange Reaktionslösung wurde mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (100 mL) und H₂O (100 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter,

wässriger NaCl-Lösung (300 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 99:1 → 49:1 → 19:1) gereinigt und **44** (678 mg, 1.08 mmol, 71%) als farbloses Öl erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Diastereomergemisch (**44a/44b** = 1:1).

¹H-NMR von **44a/44b** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.77 (2s, 1H, H-2), 8.29 (2s, 1H, H-8), 8.05 – 7.99 (m, 2H, H-Bz), 7.63 – 7.56 (m, 1H, H-Bz), 7.51 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-Bz), 6.12 (2d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-1'), 5.93 – 5.67 (m, 1H, H-2''), 5.46 (ddt, *J* = 9.6, 6.3, 3.4 Hz, 1H, H-2'), 5.33 – 5.13 (m, 2H, H-3''), 4.58 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-4'), 4.53 – 4.38 (m, 2H, H-1''), 4.13 – 3.94 (m, 3H, H-5a', 2 × H1''), 3.69 – 3.58 (m, 1H, H-5b'), 3.11 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-2a''), 3.03 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-2b''), 2.80 (2t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-3a'), 2.68 (2t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-4''), 2.39 (2dt, *J* = 7.6, 5.2 Hz, 1H, H-3b'), 2.22 (2q, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-6''), 1.98 (2t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-8''), 1.83 (2p, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-5'').

¹³C-NMR von **44a/44b** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 197.84 (2s, C-3''), 164.82 (C-Bz), 152.52 (2s, C-2), 150.80 (C-4), 150.13 (2s, C-6), 142.83 (2s, C-8), 133.54 (C-Bz), 133.06 (C-Bz), 131.82 (2d, *J* = 6.5 Hz, C-2''), 129.01 (C-Bz), 128.06 (C-Bz), 123.93 (C-5), 119.33 (2s, C-3''), 91.43 (2d, *J* = 6.8 Hz, C-1'), 82.95 (C-7'), 81.28 (C-4'), 79.81 (2d, *J* = 5.4 Hz, C-2'), 69.70 (C-8''), 69.03 (2d, *J* = 5.6 Hz, C-1''), 66.37 (2d, *J* = 5.4 Hz, C-1'), 63.50 (C-5'), 42.61 (2s, C-4''), 32.53 (2s, C-3'), 28.77 (2d, *J* = 7.5 Hz, C-2''), 24.05 (2s, C-5''), 17.79 (2s, C-6'').

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): *t_R* = 5.87 Minuten, *m/z* = 630.4 [M+H]⁺ *m/z* = 628.3 [M-H]⁻.

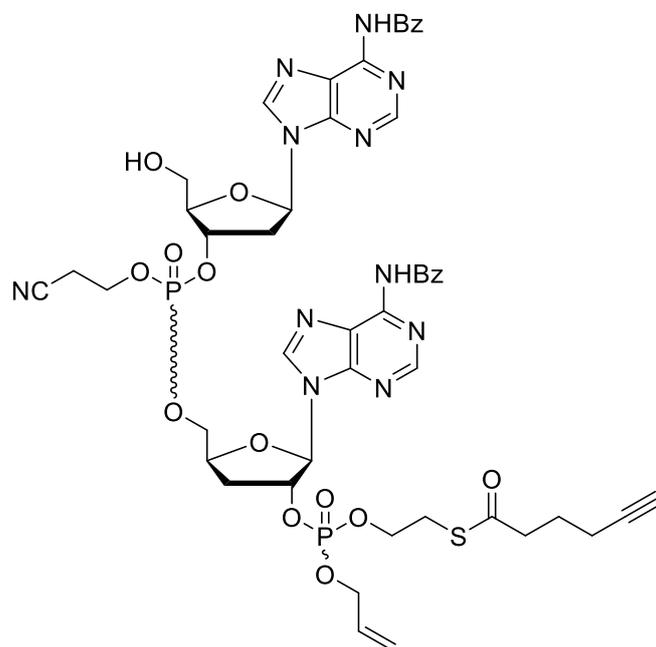
HRMS ((+)-ESI):	berechnet für C ₂₈ H ₃₃ N ₅ O ₈ PS ⁺ :	630.1782 [M+H] ⁺
	gefunden:	630.1783 [M+H] ⁺

HRMS ((-)-ESI):	berechnet für C ₂₈ H ₃₂ N ₅ O ₈ PS ⁻ :	628.1636 [M-H] ⁻
	gefunden:	628.1637 [M-H] ⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3291 (w), 3092 (w), 2931 (w), 1690 (m), 1610 (m), 1581 (m), 1511 (m), 1453 (m), 1248 (s), 1173 (m), 1070 (m), 1000 (s), 965 (m), 935 (m), 829 (m), 797 (m), 707 (s).

R_f = 0.35 (DCM:MeOH = 24:1).

3'''- (Cyanoethyl)- phosphate- N^{6'}- Bz- 2'''- deoxyadenosin- 2'-((allyl, SATE)-phosphat)- N⁶- Bz-3'- deoxyadenosin (46)



Zu einer Lösung von **44** (658 mg, 1.05 mmol, 1.0 Äq) in trockenem DCM (7.0 mL) wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung von 2'-Deoxyadenosinphosphoramidit **45** (1.00 g, 1.17 mmol, 1.1 Äq) in trockenem DCM (2.0 mL) und anschließend BTT (0.3 M in MeCN, 7.00 mL, 2.10 mmol, 2.0 Äq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, *t*-BuOOH (5.5 M in Decan, 0.57 mL, 3.15 mmol, 3.0 Äq) zugegeben und für weitere 30 Minuten gerührt. Durch Zugabe von wässriger NaHSO₃-Lösung (500 mg/mL, 1.30 mL, 6.30 mmol, 6.0 Äq) bei 0 °C wurde die Reaktion beendet, mit H₂O (100 mL) verdünnt und mit EtOAc (3 × 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (200 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (16.8 mL) gelöst, H₂O (0.19 mL) sowie DCA (6% in DCM, 16.8 mL) zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die orange Reaktionslösung wurde mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (100 mL) und H₂O (100 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (300 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 99:1 → 49:1 → 19:1) aufgereinigt und **46** (825 mg, 750 μmol, 71%) als farbloser Schaum erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Diastereomergemisch aus vier Diastereomeren.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): *t_R* = 6.17 Minuten, *m/z* = 1100.5 [M+H]⁺, *m/z* = 1098.5 [M-H]⁻.

HRMS ((+)-ESI): berechnet für $C_{48}H_{52}N_{11}O_{14}P_2S^+$: 1100.2886 [M+H]⁺
gefunden: 1100.2882 [M+H]⁺

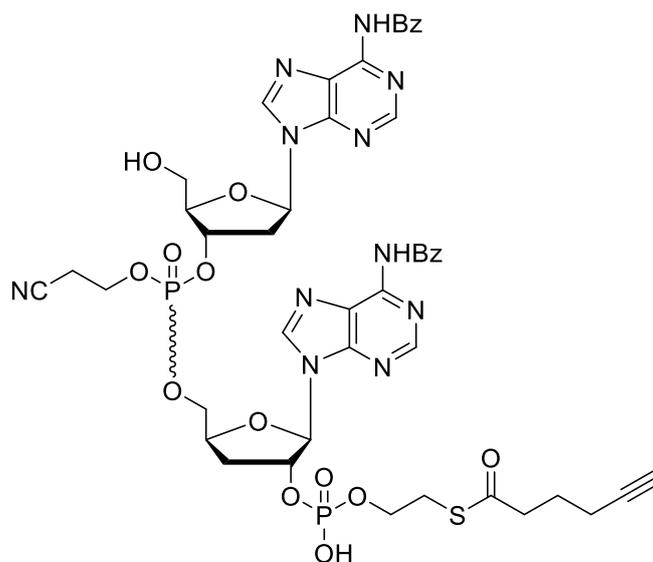
HRMS ((-)-ESI): berechnet für $C_{48}H_{50}N_{11}O_{14}P_2S^-$: 1098.2740 [M-H]⁻
gefunden: 1098.2743 [M-H]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3265 (w), 2931 (w), 1691 (m), 1610 (m), 1580 (m), 1511 (m), 1485 (m), 1453 (m), 1248 (s), 992 (s), 934 (s), 796 (m), 707 (s).

Schmelzpunkt: $T_S = 75.1 - 75.7$ °C.

$R_f = 0.26$ (DCM:MeOH = 47:3).

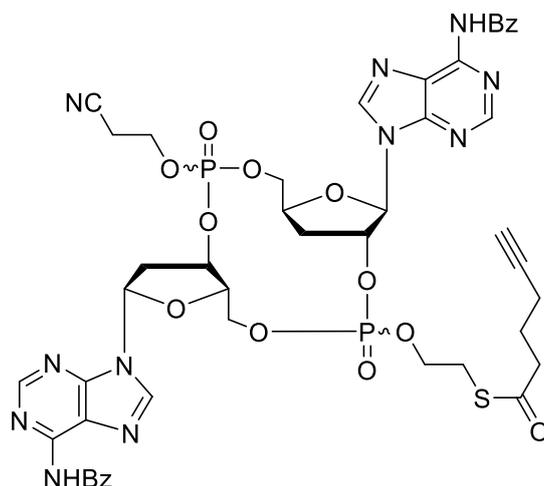
3''' - (Cyanoethyl)- phosphate- N^{6''} - Bz- 2''' - deoxyadenosin- 2'-(SATE)-phosphat- N⁶- Bz- 3' - deoxyadenosin (47)



Zu einer Lösung von linearem Dinukleotid **46** (820 mg, 745 μ mol, 1.0 Äq) in trockenem Aceton (25.0 mL) wurde NaI (1.12 g, 7.45 mmol, 10.0 Äq) gegeben und die Reaktionsmischung für 4 Stunden auf 55 °C erhitzt. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in einer möglichst kleinen Menge Aceton (1 mL) gelöst und tropfenweise in H₂O (15 mL) gegeben. Der resultierende Niederschlag wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag erneut durch Zugabe von H₂O (15 mL) und anschließender Zentrifugation gewaschen. Der Niederschlag wurde in Aceton gelöst, das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt **47** (380 mg, 359 μ mol, 48%) wurde ohne weitere Aufreinigung im nachfolgenden Schritt verwendet.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): $t_R = 5.01$ Minuten, $m/z = 1060.7$ [M+H]⁺, $m/z = 1058.6$ [M-H]⁻ (berechnet: 1060.3 [M+H]⁺, 1058.2 [M-H]⁻).

2',3'- c- Dideoxy- (cyanoethyl)- phosphate- N^{6''}- Bz- adenosin- (SATE)- phosphate- N⁶- Bz- adenosin (48)



Zu einer Lösung von **47** (380 mg, 359 μ mol, 1.0 Äq) in trockenem Pyridin (105 mL) wurde MSNT (532 mg, 1.80 mmol, 5.0 Äq) gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt direkt säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 49:1 \rightarrow 24:1 \rightarrow 23:2 \rightarrow 9:1) aufgereinigt. Das zyklisierte Produkt **48** (224 mg, 215 μ mol, 60%), bestehend aus vier Diastereomeren, wurde als farbloser Schaum erhalten.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): $t_R = 5.58, 5.98, 6.06$ Minuten, $m/z = 1042.3$ [M+H]⁺.

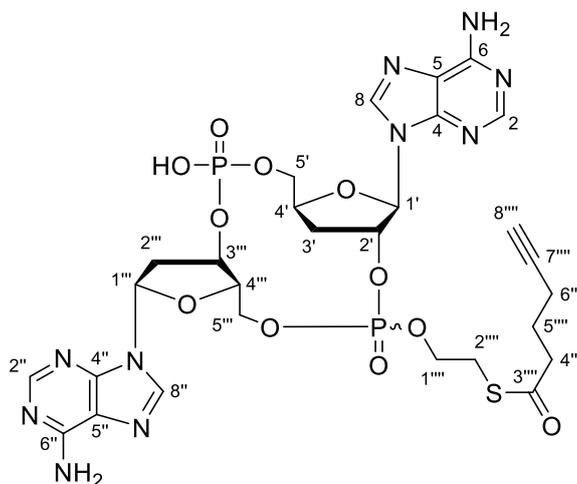
HRMS ((+)-ESI):

berechnet für C ₄₅ H ₄₆ N ₁₁ O ₁₃ P ₂ S ⁺ :	1042.2467 [M+H] ⁺
gefunden:	1042.2456 [M+H] ⁺

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3397 (w), 2931 (w), 1689 (w), 1615 (w), 1519 (w), 1461 (m), 1408 (w), 1332 (w), 1250 (s), 1165 (s), 1086 (s), 1011 (s), 851 (m), 798 (m), 753 (m), 712 (m), 676 (s).

Schmelzpunkt: T_S = 127.5 – 128.5 °C.

R_f = 0.24 (DCM:MeOH = 47:3).

2',3'-c-Dideoxy-diadenosin-(SATE)-monophosphat (mono-SATE-Prodrug, 30)

Zu einer Lösung von **48** (220 mg, 211 μmol) in MeCN (25 mL) wurde bei Raumtemperatur ein Überschuss $t\text{-BuNH}_2$ (5.30 mL) zugegeben und für 30 Minuten gerührt bis DC- sowie LC-MS-Analyse eine vollständige Umsetzung des Startmaterials anzeigte. Alle flüchtigen Reaktionsbestandteile wurden unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt (207 mg, 209 μmol , quant.) ohne weitere Aufreinigung im nachfolgenden Schritt verwendet.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H_2O , Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): $t_R = 6.08$ Minuten, $m/z = 989.4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 987.4$ $[\text{M}-\text{H}]^-$; $t_R = 6.32$ Minuten, $m/z = 989.4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 987.4$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ (berechnet: 989.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 987.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$).

Zu einer Lösung des Rückstands (207 mg, 209 μmol , 1.0 Äq) in CHCl_3 (3.8 mL) und MeOH (15 mL) wurde ZnBr_2 (2.36 g, 10.5 mmol, 50 Äq) gegeben und das Reaktionsgemisch für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels *reversed-phase* HPLC (0% \rightarrow 15% MeCN + 0.1% TFA in H_2O + 0.1% TFA über 30 Minuten) aufgereinigt. Die zwei Diastereomere des Produkts **30a** (11.8 mg, 15.1 μmol , 7.2%, $t_R = 21.2$ Minuten) und **30b** (33.3 mg, 42.7 μmol , 11.8%, $t_R = 26.2$ Minuten) wurden separiert und als farblose Feststoffe erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ von **30a** (400 MHz, $\text{MeCN-d}_3/\text{D}_2\text{O} = 1:4$): δ [ppm] = 8.85 (s, 1H, H-2), 8.57 (s, 2H, H-8, H-2''), 8.55 (s, 1H, H-8'), 6.68 (dt, $J = 6.9, 3.5$ Hz, 1H, H-1'''), 6.45 (dd, $J = 5.9, 1.7$ Hz, 1H, H-1'), 5.57 – 5.44 (m, 1H, H-2'), 5.29 (s, 1H, H-3'''), 4.85 (m, 1H, H-4'), 4.63 – 4.55 (m, 1H, H-4'''), 4.48 (q, $J = 9.9, 8.2$ Hz, 2H, H-5'''), 4.41 – 4.28 (m, 2H, H-5'), 4.01 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-1a'''), 3.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-1b'''), 3.34 (dt, $J = 13.6, 6.5$ Hz, 1H, H-2a'''), 3.10 – 2.87 (m, 4H, H-3a', H-2b''', $2 \times \text{H-2}''''$), 2.82 – 2.73 (m, 3H, H-3b', $2 \times \text{H-4}''''$), 2.52 – 2.47 (m, 1H, H-8'''''), 2.35 – 2.30 (m, 2H, H-6'''''), 1.91 – 1.81 (m, 2H, H-5''''').

¹³C-NMR von 30a (101 MHz, MeCN-d₃/D₂O = 1:4) δ [ppm] = 201.78 (C-3'''), 152.42 (C-6), 151.61 (C-6''), 149.72 (C-4), 149.12 (C-4''), 148.15 (C-2''), 146.43 (C-8''), 143.65 (C-8), 142.24 (C-2), 119.99 (C-5''), 119.35 (C-5), 87.09 (C-1'), 85.75 (C-1'''), 84.98 (C-7'''), 83.47 (C-4'''), 81.14 (d, *J* = 6.0 Hz, C-2'), 78.79 (d, *J* = 6.2 Hz, C-4'), 75.56 (d, *J* = 6.4 Hz, C-3'''), 71.07 (C-8'''), 69.68 (d, *J* = 6.7 Hz, C-5'), 67.94 (d, *J* = 5.9 Hz, C-1'''), 66.38 (d, *J* = 6.0 Hz, C-5'''), 42.99 (C-4'''), 38.20 (C-2'''), 34.39 (C-3'), 29.04 (d, *J* = 6.1 Hz, C-2'''), 24.59 (C-5'''), 17.73 (C-6''').

³¹P-NMR von 30a (162 MHz, MeCN-d₃/D₂O = 1:4): δ [ppm] = -1.07, -3.95.

¹H-NMR von 30b (800 MHz, MeCN-d₃/D₂O = 1:4): δ [ppm] = 8.95 (s, 1H, H-8), 8.76 (s, 1H, H-8''), 8.73 (s, 1H, H-2''), 8.73 (s, 1H, H-2), 6.85 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-8, H-1'''), 6.63 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-1'), 5.72 (ddd, *J* = 10.2, 6.9, 5.1 Hz, 1H, H-2'), 5.40 (dq, *J* = 6.1, 3.0, 2.1 Hz, 1H, H-3'''), 5.01 (h, *J* = 4.1, 3.4 Hz, 1H, H-4'), 4.74 (td, *J* = 7.2, 3.7 Hz, 1H, H-4'''), 4.72 – 4.69 (m, 1H, H-5a'''), 4.61 – 4.58 (m, 2H, H-5a', H-5b'''), 4.56 (dt, *J* = 7.9, 6.1 Hz, 2H, H-1'''), 4.43 (ddd, *J* = 11.7, 8.5, 4.6 Hz, 1H, H-5b'), 3.57 – 3.53 (m, 2H, H-2'''), 3.47 (dt, *J* = 14.4, 6.2 Hz, 1H, H-2a'''), 3.24 (ddd, *J* = 14.4, 6.7, 4.3 Hz, 1H, H-2b'''), 3.12 (dt, *J* = 13.3, 7.5 Hz, 1H, H-3a'), 3.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-4'''), 2.93 (ddd, *J* = 13.5, 6.1, 4.7 Hz, 1H, H-3a'), 2.68 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-8'''), 2.54 (td, *J* = 7.0, 2.6 Hz, 2H, H-6'''), 2.13 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-5''').

¹³C-NMR von 30b (201 MHz, MeCN-d₃/D₂O = 1:4) δ [ppm] = 201.37 (C-3'''), 151.84 (C-6), 151.59 (C-6''), 149.65 (C-4), 149.18 (C-4''), 147.06 (C-2''), 146.33 (C-2), 143.60 (C-8''), 142.45 (C-8), 119.31 (C-5''), 118.85 (C-5), 88.02 (C-1'), 85.69 (C-1'''), 84.68 (C-7'''), 83.82 (C-4'''), 80.92 (d, *J* = 5.2 Hz, C-2'), 78.88 (d, *J* = 6.4 Hz, C-4'), 75.63 (d, *J* = 8.9 Hz, C-3'''), 70.99 (C-8'''), 69.03 (d, *J* = 9.1 Hz, C-5'), 68.16 (d, *J* = 8.1 Hz, C-1'''), 67.06 (d, *J* = 9.3 Hz, C-5'''), 43.10 (C-4'''), 38.60 (C-2'''), 35.21 (C-3'), 29.47 (d, *J* = 9.0 Hz, C-2'''), 24.78 (C-5'''), 17.81 (C-6''').

³¹P-NMR von 30b (162 MHz, MeCN-d₃/D₂O = 1:4): δ [ppm] = -1.21, -3.08.

HRMS ((+)-ESI) von 30a: berechnet für C₂₈H₃₅N₁₀O₁₁P₂S⁺: 781.1677 [M+H]⁺
gefunden: 781.1674 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI) von 30a: berechnet für C₂₈H₃₃N₁₀O₁₁P₂S⁻: 779.1532 [M-H]⁻
gefunden: 779.1536 [M-H]⁻

HRMS ((+)-ESI) von 30b: berechnet für C₂₈H₃₅N₁₀O₁₁P₂S⁺: 781.1677 [M+H]⁺
gefunden: 781.1683 [M+H]⁺

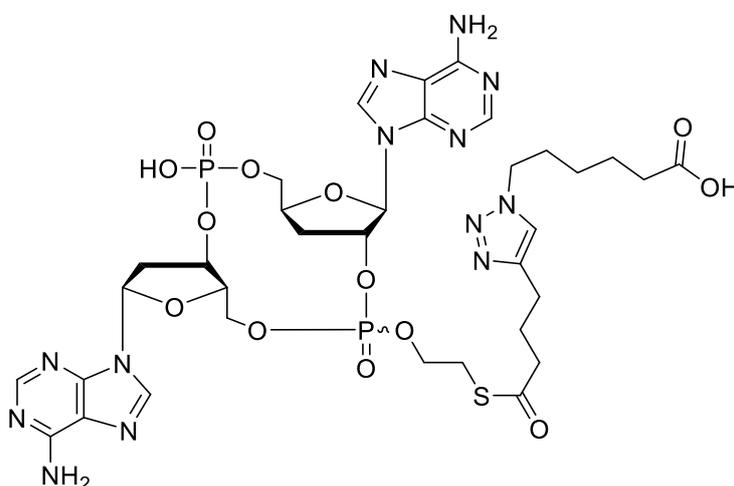
HRMS ((-)-ESI) von 30b: berechnet für C₂₈H₃₃N₁₀O₁₁P₂S⁻: 779.1532 [M-H]⁻
gefunden: 779.1535 [M-H]⁻

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-40% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): t_R (**30a**) = 5.19 Minuten, $m/z = 781.4$ [M+H]⁺, $m/z = 779.0$ [M-H]⁻; t_R (**30b**) = 6.42 Minuten, $m/z = 781.5$ [M+H]⁺, $m/z = 779.0$ [M-H]⁻.

IR (ATR, Film) von **30a**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3076 (w), 1693 (m), 1423 (w), 1202 (m), 1137 (m), 1060 (s), 1013 (s), 933 (m), 799 (m), 722 (s), 680 (m).

IR (ATR, Film) von **30b**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3106 (w), 1692 (m), 1420 (w), 1201 (m), 1136 (m), 1058 (s), 936 (m), 799 (m), 722 (m).

6-Hexansäure-geclickter mono-SATE-Prodrug (**51**)



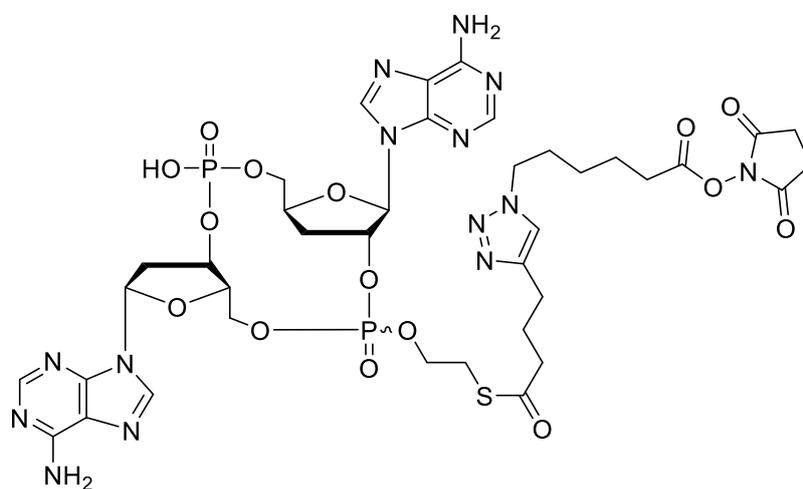
Alle für die Reaktion verwendeten Lösemittel wurden vor Verwendung 30 Minuten durch einen Argonstrom mit Inertgas gesättigt. Zu einer Lösung von **30** (4.58 mg, 5.87 μ mol, 1.0 \AA q) in H₂O (800 μ L) und THF (200 μ L) wurde eine wässrige Lösung von CuSO₄·5 H₂O (50 mg/mL, 6.29 μ L, 1.26 μ mol, 0.2 \AA q), eine wässrige Lösung von Natriumascorbat (50 mg/mL, 10.1 μ L, 2.56 μ mol, 0.4 \AA q) und 6-Azidohexansäure **50** (0.25 M in THF, 28.8 μ L, 7.32 μ mol, 1.2 \AA q) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter Argonatmosphäre über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels LC-MS-Analyse (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-40% Puffer B in 7 Minuten) überprüft und in Folge unvollständiger Umsetzung erneut eine wässrige Lösung von CuSO₄·5 H₂O (50 mg/mL, 6.29 μ L, 1.26 μ mol, 0.2 \AA q), eine wässrige Lösung von Natriumascorbat (50 mg/mL, 10.1 μ L, 2.56 μ mol, 0.4 \AA q) und 6-Azidohexansäure **50** (0.25 M in THF, 28.8 μ L, 7.32 μ mol, 1.2 \AA q) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde erneut über Nacht gerührt und anschließend die Lösemittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels *reversed-phase* HPLC (0% → 30% MeCN + 0.1% TFA in H₂O + 0.1% TFA über 45 Minuten) aufgereinigt und **51** (4.97 mg, 5.30 μ mol, 90%, $t_R = 37.5$ Minuten) als farbloser Feststoff erhalten.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-40% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): $t_R = 5.65$ Minuten, $m/z = 938.6$ [M+H]⁺, $m/z = 936.4$ [M-H]⁻.

HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₃₄H₄₆N₁₃O₁₃P₂S⁺: 938.2528 [M+H]⁺
gefunden: 938.2515 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₃₄H₄₄N₁₃O₁₃P₂S⁻: 936.2383 [M-H]⁻
gefunden: 936.2373 [M-H]⁻

6-Hexansäure-geclickter mono-SATE-Prodrug-NHS-Ester (52)

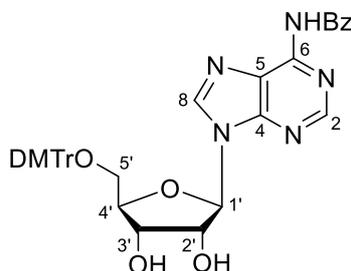


Zu einer Lösung von **51** (2.24 mg, 2.38 μmol, 1.0 Äq) in trockenem MeCN (300 μL) wurde NHS (14 mg/mL, 84.8 μL, 6.20 μmol, 2.6 Äq) und EDC·HCl (38 mg/mL, 18.8 μL, 6.20 μmol, 2.6 Äq) gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösemittel wurden unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand mittels *reversed-phase* HPLC (20% → 40% MeCN + 0.1% TFA in H₂O + 0.1% TFA über 45 Minuten) aufgereinigt und **52** (1.21 mg, 1.17 μmol, 49%, $t_R = 18.0$ Minuten) als farbloser Feststoff erhalten.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-40% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): $t_R = 6.28$ Minuten, $m/z = 1035.6$ [M+H]⁺, $m/z = 1033.5$ [M-H]⁻ (berechnet: 1035.3 [M+H]⁺, 1033.3 [M-H]⁻).

6.3 Experimentelle Vorschriften zum photolabilen CDN-*Prodrug*

5'-*O*-DMTr-*N*⁶-Bz-adenosin (**62**)^[265]



Zu einer Lösung von *N*⁶-Benzoyladenosin (**61**, 7.00 g, 18.9 mmol, 1.0 Äq) in trockenem Pyridin (100 mL) wurde unter Argonatmosphäre DMTrCl (7.69 g, 22.7 mmol, 1.2 Äq) zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (100 mL) beendet, mit H₂O (100 mL) verdünnt und mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Toluol co-evaporiert, anschließend mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM:MeOH + 0.5% NEt₃ = 99:1 → 19:1) gereinigt um **62** (11.6 g, 17.2 mmol, 91%) als farblosen Schaum zu erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.25 (s, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, H-2), 8.24 (s, 1H, H-H-8), 8.00 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-Bz), 7.58 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, H-Bz), 7.49 (dd, 2H, *J* = 7.9 Hz, 7.9 Hz, H-Bz), 7.34 – 7.28 (m, 2H, H-DMTr), 7.25 – 7.11 (m, 9H, H-DMTr), 6.79 – 6.70 (m, 4H, H-DMTr), 6.08 (d, 1H, *J* = 5.7 Hz, H-1'), 5.86 (s, 1H, 2'-OH), 4.90 (dd, 1H, *J* = 5.4 Hz, H-2'), 4.47 (dd, 1H, *J* = 5.1, 2.6 Hz, H-3'), 4.39 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, H-4'), 3.74 (s, 6H, 2 × OMe), 3.49 – 3.27 (m, 3H, 3'-OH, 2 × H-5').

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 164.86 (C-Bz), 158.67 (C-DMTr), 158.65 (C-DMTr), 152.39 (C-2), 151.18 (C-4), 149.64 (C-6), 144.52 (C-DMTr), 141.72 (C-8), 138.00 (C-DMTr), 135.63 (C-DMTr), 135.58 (C-DMTr), 133.62 (C-Bz), 133.05 (C-Bz), 130.12 (C-DMTr), 130.09 (C-DMTr), 129.16 (C-Bz), 129.02 (C-DMTr), 128.35 (C-Bz), 128.12 (C-DMTr), 123.08 (C-5), 90.28 (C-1'), 86.72 (C-DMTr), 85.80 (C-4'), 75.66 (C-2'), 72.43 (C-3'), 63.62 (C-5'), 55.34 (C-OMe).

HRMS ((+)-ESI):	berechnet für C ₃₈ H ₃₆ N ₅ O ₇ ⁺ :	674.2609 [M+H] ⁺
	gefunden:	674.2607 [M+H] ⁺

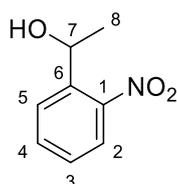
HRMS ((-)-ESI):	berechnet für C ₃₈ H ₃₄ N ₅ O ₇ ⁻ :	672.2464 [M-H] ⁻
	gefunden:	672.2470 [M-H] ⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2930 (w), 2360 (w), 1698 (w), 1608 (m), 1581 (m), 1508 (m), 1454 (m), 1298 (m), 1246 (s), 1175 (s), 1029 (s), 900 (m), 827 (s), 792 (m), 755 (m), 704 (s).

Schmelzpunkt: $T_S = 106 - 109$ °C.

$R_f = 0.38$ (DCM:MeOH = 24:1).

1-(2-Nitrophenyl)ethan-1-ol (58**)**^[266]



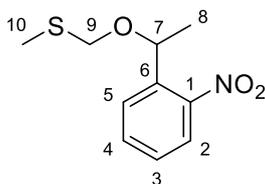
Nitroacetophenon (**57**, 10.0 g, 60.6 mmol, 1.0 Äq) wurde in EtOH (240 mL) gelöst und bei 0 °C NaBH_4 (2.26 g, 60.6 mmol, 1.0 Äq) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde gerührt, mit AcOH (9.7 mL) neutralisiert und die flüchtigen Bestandteile unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Et_2O (100 mL) gelöst und mit H_2O (100 mL), gesättigter, wässriger NaHCO_3 -Lösung (100 mL) und gesättigter, wässriger NaCl -Lösung (100 mL) in angegebener Reihenfolge gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösemittel *in vacuo* entfernt und **58** (9.79 g, 58.5 mmol, 97%) als gelbliches Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.89 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H, H-2), 7.83 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1H, H-5), 7.65 (td, $J = 7.5, 1.3$ Hz, 1H, H-4), 7.42 (ddd, $J = 8.1, 7.4, 1.5$ Hz, 1H, H-3), 5.41 (qd, $J = 6.3, 3.8$ Hz, 1H, H-7), 1.57 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H-8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 147.96 (C-1), 141.02 (C-6), 133.78 (C-4), 128.26 (C-3), 127.70 (C-5), 124.45 (C-2), 65.70 (C-7), 24.31 (C-8).

HRMS ((+)-EI):	berechnet für $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_3^{*+}$:	166.0504 [M-H] ^{*+}
	gefunden:	166.0499 [M-H] ^{*+}

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3351 (w), 2979 (w), 2933 (w), 2871 (w), 1610 (w), 1578 (w), 1518 (s), 1444 (w), 1343 (s), 1297 (w), 1192 (w), 1146 (w), 1104 (m), 1070 (m), 1006 (w), 898 (w), 855 (m), 787 (m), 744 (s), 705 (m), 674 (m).

Methyl((1-(2-nitrophenyl)ethoxy)methyl)sulfan (59)^[267]

Zu einer Lösung von **58** (5.00 g, 29.9 mmol, 1.0 Äq) in trockenem THF (150 mL) wurde bei 0 °C NaH (60% in Mineralöl, 5.32 g, 108 mmol, 3.6 Äq) zugegeben und für 30 Minuten gerührt. Nach Zugabe von Chlorodimethylsulfid (9.00 mL, 108 mmol, 3.6 Äq) wurde das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt, der Rückstand in EtOAc (300 mL) gelöst und die organische Phase mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (2 × 200 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösemittel *in vacuo* entfernt, das Rohprodukt säulenchromatographisch (Silica Gel, *i*Hex:EtOAc = 19:1 → 9:1) aufgereinigt und **59** (4.23 g, 16.6 mmol, 62%) als oranges Öl erhalten.

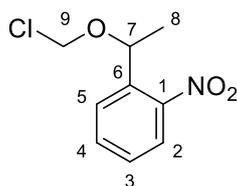
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.91 (dt, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1H, H-2), 7.76 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H-5), 7.65 (td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H, H-4), 7.46 – 7.39 (m, 1H, H-3), 5.41 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H, H-7), 4.61 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, H-9), 4.31 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, H-9), 2.12 (s, 3H, H-10), 1.55 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-8).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 148.62 (C-1), 139.24 (C-6), 133.70 (C-4), 128.29 (C-3), 128.12 (C-5), 124.43 (C-2), 73.28 (SCH₂O), 70.24 (C-7), 23.59 (C-8), 14.20 (SMe).

HRMS ((+)-EI):	berechnet für C ₁₀ H ₁₃ OS ^{•+} :	181.0687 [M-NO ₂] ^{•+}
	gefunden:	181.0680 [M-NO ₂] ^{•+}

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3070 (w), 2978 (w), 2921 (w), 1724 (w), 1682 (w), 1608 (w), 1578 (w), 1522 (s), 1441 (w), 1343 (m), 1300 (m), 1264 (w), 1193 (w), 1116 (w), 1085 (m), 1066 (m), 1048 (s), 1034 (s), 989 (m), 959 (w), 907 (w), 858 (m), 787 (m), 745 (s), 733 (s), 704 (m), 675 (m).

R_f = 0.73 (*i*Hex:EtOAc = 4:1).

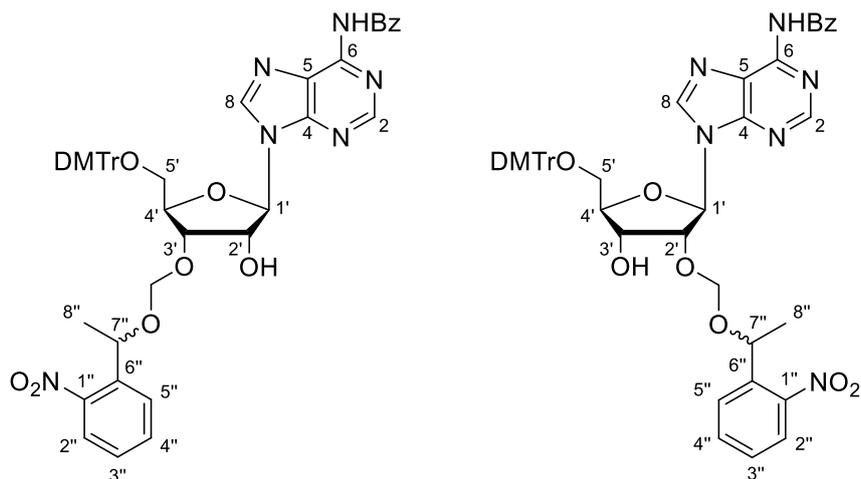
1-(1-(Chloromethoxy)ethyl)-2-nitrobenzen (60)

Zu einer Lösung von **59** (2.00 g, 8.80 mmol, 1.0 Äq) in trockenem DCM (17.5 mL) wurde bei 0 °C eine Lösung von SO₂Cl₂ (0.71 mL, 8.80 mmol, 1.0 Äq) in trockenem DCM (8.80 mL) tropfenweise zugegeben und das Reaktionsgemisch zunächst für 30 Minuten bei 0 °C und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Alle flüchtigen Reaktionsbestandteile wurden unter verminderten Druck entfernt und **60** (1.90 g, 8.80 mmol, quant.) als dunkelorange Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.96 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, H-2), 7.72 – 7.60 (m, 2H, H-4, H-5), 7.50 – 7.40 (m, 1H, H-3), 5.52 (dd, *J* = 6.1, 1.4 Hz, 2H, H-7, H-9), 5.23 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-9), 1.60 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-8).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 148.24 (C-1), 138.08 (C-6), 133.87 (C-4), 128.73 (C-3), 128.10 (C-5), 124.65 (C-2), 80.47 (SCH₂O), 72.88 (C-7), 23.31 (C-8).

(RS)-5'-O-DMTr-3'-npeom-N⁶-Bz-Adenosin (63) und **(RS)-5'-O-DMTr-2'-npeom-N⁶-Bz-Adenosin (64)**^[234]



Zu einer Lösung von **62** (4.30 g, 6.38 mmol, 1.0 Äq) und DIPEA (4.43 mL, 25.4 mmol, 4.0 Äq) in trockenem DCE (25 mL) wurde Bu₂SnCl₂ (2.12 g, 6.99 mmol, 1.1 Äq) zugegeben und die Reaktionsmischung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde **60** (1.90 g, 8.80 mmol, 1.4 Äq) zugegeben und für 40 Minuten auf 80 °C erhitzt. Der

Reaktionsfortschritt wurde mittels LC-MS-Analyse (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten) überprüft. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (100 mL) beendet und die wässrige Phase mit DCM (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (150 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde zunächst säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH + 0.5% NEt₃ = 49:1) aufgereinigt, anschließend die Regioisomere durch erneute Säulenchromatographie (Silica Gel, *i*Hex:EtOAc:MeOH + 0.5 % NEt₃ = 2:3:0 → 1:2:0 → 1:4:0 → 0:1:0 → 0:49:1 → 0:24:1) getrennt und **64** (1.42 g, 1.66 mmol, 26%) sowie **63** (1.27 g, 1.49 mmol, 23%) als gelbliche Schäume erhalten.

Bei den isolierten Produkten handelte es sich jeweils um ein untrennbares Diastereomeregemisch (für **64a/64b** = 1:1, für **63a/63b** = 1:2). Das Verhältnis der Diastereomere für **63a/63b** wurde für die Auswertung der NMR-Spektren auf ein Verhältnis D₁/D₂ = 1:1 normiert und entsprechend in die Signalintegrale der ¹H-NMR-Spektrenanalyse einbezogen um ganze Zahlen für die Protonenanzahl zu erhalten. Das Integral von überlappenden Signalen der beiden Diastereomere wurde als Summe angegeben um die relativen Intensitäten wiedergeben zu können und entsprechend gekennzeichnet (z.B. D₁₊₂ × H-Ar, D₁₊₂ × OMe). Eine Zusammenfassung zusammengehöriger Signale von D₁/D₂ (z.B. 2s, 2d, 2t, 2m) wurde für diese Verbindung nicht durchgeführt.

¹H-NMR von **64a/64b** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 11.24 (s, 2H, D₁₊₂ × NH), 8.67 (s, 1H, H-8), 8.63 (s, 1H, H-2), 8.61 (s, 1H, H-8), 8.47 (s, 1H, H-2), 8.09 – 8.02 (m, 4H, D₁₊₂ × H-Ar), 7.88 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, H-Ar), 7.77 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H, H-Ar), 7.70 – 7.62 (m, 3H, D₁₊₂ × H-Ar), 7.59 – 7.52 (m, 6H, D₁₊₂ × H-Ar), 7.49 (ddd, *J* = 8.5, 7.3, 1.5 Hz, 1H, H-Ar), 7.41 – 7.34 (m, 3H, D₁₊₂ × H-Ar), 7.30 (ddd, *J* = 7.9, 6.5, 1.6 Hz, 3H, D₁₊₂ × H-Ar), 7.26 – 7.13 (m, 14H, D₁₊₂ × H-Ar), 6.90 – 6.77 (m, 8H, D₁₊₂ × H-Ar), 6.19 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H-1'), 5.89 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, H-1'), 5.49 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, 3'-OH), 5.38 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, 3'-OH), 5.21 (q, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-7''), 5.07 – 4.96 (m, 2H, H-2', H-7''), 4.94 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, H-2'), 4.84 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, OCH₂O), 4.75 (dd, *J* = 11.3, 7.2 Hz, 2H, OCH₂O), 4.58 – 4.48 (m, 2H, H-3', OCH₂O), 4.40 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H, H-3'), 4.11 (q, *J* = 4.5 Hz, 1H, H-4'), 4.09 – 4.04 (m, 1H, H-4'), 3.71 (d, *J* = 2.8 Hz, 12H, D₁₊₂ × OMe), 3.29 – 3.11 (m, 4H, D₁₊₂ × H-5'), 1.38 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, H-8''), 1.11 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-8'').

¹³C-NMR von **64a/64b** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.77 (C-Bz), 158.10 (C-Ar), 158.07 (C-Ar), 151.98 (C-8), 151.74 (C-8), 150.60 (C-Ar), 150.46 (C-Ar), 147.90 (C-Ar), 147.14 (C-Ar), 144.85 (C-Ar), 143.47 (C-2), 143.34 (C-2), 138.41 (C-Ar), 137.86 (C-Ar), 135.59 (C-Ar), 135.56 (C-Ar), 135.47 (C-Ar), 135.45 (C-Ar), 133.75 (C-Ar), 133.33 (C-Ar), 132.54 (C-Ar), 129.75 (C-Ar), 129.71 (C-Ar), 128.72 (C-Ar), 128.58 (C-Ar), 128.54 (C-Ar), 128.30 (C-Ar), 127.85 (C-Ar), 127.83 (C-Ar), 127.81 (C-Ar), 127.70 (C-Ar), 127.67 (C-Ar), 127.55 (C-Ar), 126.74 (C-Ar), 126.69 (C-Ar), 125.97 (C-Ar), 125.80 (C-Ar), 124.05 (C-Ar),

123.81 (C-Ar), 113.20 (C-Ar), 113.16 (C-Ar), 93.08 (OCH₂O), 92.51 (OCH₂O), 86.67 (C-1'), 86.56 (C-1'), 85.63 (C-Ar), 85.45 (C-Ar), 83.96 (C-4'), 83.29 (C-4'), 77.47 (C-2'), 77.12 (C-2'), 70.14 (C-7''), 69.63 (C-3'), 69.54 (C-7''), 69.12 (C-3'), 63.52 (C-5'), 63.19 (C-5'), 55.05 (D₁₊₂ × OMe), 23.26 (C-8''), 22.99 (C-8'').

¹H-NMR von **63a/63b** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 11.25 (s, 2H, D₁₊₂ × NH), 8.64 (s, 1H, H-2), 8.62 (s, 1H, H-2), 8.60 (s, 1H, H-8), 8.55 (s, 1H, H-8), 8.07 – 8.02 (m, 4H, D₁₊₂ × H-Ar), 7.95 – 7.87 (m, 2H, D₁₊₂ × H-Ar), 7.74 – 7.61 (m, 4H, D₁₊₂ × H-Ar), 7.58 – 7.50 (m, 6H, D₁₊₂ × H-Ar), 7.48 – 7.16 (m, 24H, D₁₊₂ × H-Ar), 6.84 (dtd, *J* = 10.4, 5.6, 5.0, 3.2 Hz, 8H, D₁₊₂ × H-Ar), 6.01 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-1'), 5.98 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-1'), 5.78 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, 2'-OH), 5.70 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, 2'-OH), 5.27 – 5.22 (m, 1H, H-7''), 5.21 – 5.17 (m, 1H, H-7''), 5.06 (q, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-2'), 4.96 (q, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-2'), 4.85 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, OCH₂O), 4.81 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, OCH₂O), 4.70 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, OCH₂O), 4.51 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, OCH₂O), 4.44 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H, H-3'), 4.26 (dd, *J* = 4.9, 3.1 Hz, 1H, H-3'), 4.19 (q, *J* = 4.5 Hz, 1H, H-4'), 3.84 (q, *J* = 4.3 Hz, 1H, H-4'), 3.72 (s, 12H, D₁₊₂ × OMe), 3.26 (dd, *J* = 10.3, 5.4 Hz, 1H, H-5'), 3.10 (qd, *J* = 10.3, 4.7 Hz, 1H, H-5'), 1.46 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-8''), 1.34 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H-8'').

¹³C-NMR von **63a/63b** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 165.71 (D₁₊₂ × C-Bz), 158.11 (C-Ar), 151.60 (C-4), 150.52 (C-2), 148.10 (C-Ar), 147.65 (C-Ar), 144.85 (C-Ar), 144.76 (C-Ar), 143.48 (C-Ar), 138.69 (C-8), 137.98 (C-Ar), 136.71 (C-Ar), 135.50 (C-Ar), 135.40 (C-Ar), 133.77 (C-Ar), 133.59 (C-Ar), 133.35 (C-Ar), 132.54 (C-Ar), 129.73 (C-Ar), 128.56 (C-Ar), 128.53 (C-Ar), 127.96 (C-Ar), 127.87 (C-Ar), 127.83 (C-Ar), 127.69 (C-Ar), 126.76 (C-Ar), 126.16 (C-Ar), 126.03 (C-Ar), 124.10 (C-Ar), 123.94 (C-Ar), 113.20 (C-Ar), 113.17 (C-Ar), 93.25 (OCH₂O), 92.31 (OCH₂O), 88.01 (C-1'), 87.52 (C-1'), 85.71 (C-Ar), 85.60 (C-Ar), 81.85 (C-4'), 75.84 (C-3'), 74.82 (C-3'), 71.91 (C-2'), 71.64 (C-2'), 70.43 (C-6''), 69.25 (C-6''), 63.53 (C-5'), 55.05 (C-5'), 54.98 (D₁₊₂ × OMe), 23.36 (C-8'').

HRMS ((+)-ESI) von **64a/64b**: berechnet für C₄₇H₄₅N₆O₁₀⁺: 853.3192 [M+H]⁺
gefunden: 853.3201 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI) von **64a/64b**: berechnet für C₄₇H₄₃N₆O₁₀⁻: 851.3046 [M-H]⁻
gefunden: 851.3040 [M-H]⁻

HRMS ((+)-ESI) von **63a/63b**: berechnet für C₄₇H₄₅N₆O₁₀⁺: 853.3192 [M+H]⁺
gefunden: 853.3200 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI) von **63a/63b**: berechnet für C₄₇H₄₃N₆O₁₀⁻: 851.3046 [M-H]⁻
gefunden: 851.3042 [M-H]⁻

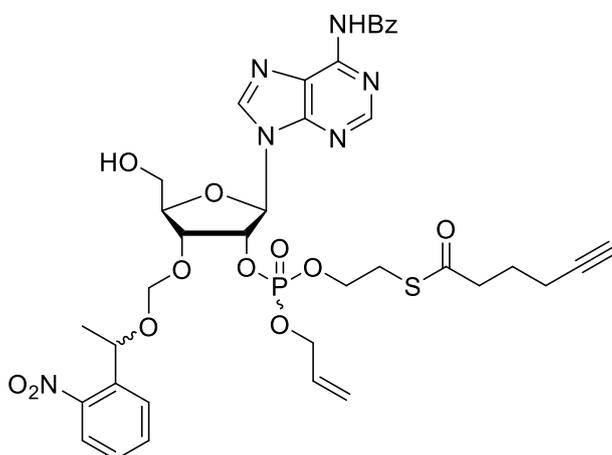
LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): *t*_R = 7.18 Minuten, *m/z* = 825.5 [M+H]⁺, *m/z* = 823.4 [M-H]⁻

IR (ATR, Film) von 64a/64b: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2923 (w), 2358 (w), 1703 (w), 1607 (m), 1580 (m), 1524 (m), 1508 (s), 1455 (m), 1340 (m), 1298 (m), 1246 (s), 1174 (s), 1070 (s), 1029 (s), 899 (w), 827 (s), 790 (m), 748 (m), 703 (s).

IR (ATR, Film) von 63a/63b: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2932 (w), 2359 (w), 1701 (w), 1607 (m), 1580 (m), 1523 (m), 1507 (s), 1454 (m), 1340 (w), 1297 (m), 1246 (s), 1175 (m), 1071 (m), 1028 (s), 899 (w), 827 (m), 790 (m), 747 (m), 702 (s).

Schmelzpunkt: T_s (64a/64b) = 82.3 – 84.1 °C, T_s (63a/63b) = 81.6 – 83.0 °C.

3'-Npeom-2'-(allyl, SATE)-phosphate- N^6 -Bz-adenosin (65)



Zu einer Lösung von **63** (1.27 g, 1.49 mmol, 1.0 Äq) in trockenem DCM (16 mL) wurde unter Agronatmosphäre **34** (720 mg, 1.79 mmol, 1.2 Äq) zugegeben. Nach Zugabe von Pyr-TFA (346 mg, 1.79 mmol, 1.2 Äq) wurde die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anschließend Allylalkohol (0.50 mL, 7.43 mmol, 5.0 Äq) sowie BTT (0.3 M in MeCN, 9.94 mL, 2.98 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und für weitere 120 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von *t*-BuOOH (5.5 M in Decan, 0.81 mL, 4.47 mmol, 3.0 Äq) wurde weitere 50 Minuten gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von wässriger NaHSO_3 -Lösung (500 mg/mL, 1.85 mL, 8.95 mmol, 6.0 Äq) bei 0 °C beendet. Nach Verdünnen der Suspension mit H_2O (200 mL), wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (300 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (23.8 mL) gelöst, H_2O (0.26 mL) sowie DCA (6% in DCM, 23.8 mL) zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die orange Reaktionslösung wurde mit gesättigter, wässriger NaHCO_3 -Lösung (100 mL) und H_2O (100 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (300 mL) gewaschen, über Na_2SO_4

getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 99:1 → 49:1) aufgereinigt und **65** (684 mg, 829 μ mol, 56%) als gelbliches, viskoses Öl erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Gemisch aus 4 Diastereomeren.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute, dann 95-5% B über eine Minute): t_R = 8.25 Minuten, m/z = 853.5 [M+H]⁺, m/z = 851.5 [M-H]⁻

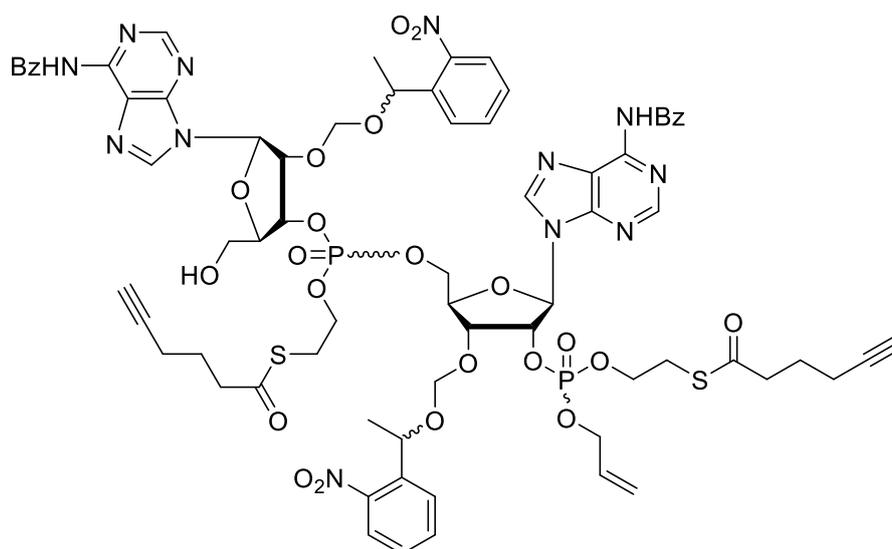
HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₃₇H₄₂N₆O₁₂PS⁺: 825.2314 [M+H]⁺
gefunden: 825.2321 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₃₇H₄₀N₆O₁₂PS⁻: 823.2168 [M-H]⁻
gefunden: 823.2167 [M-H]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3293 (w), 2934 (w), 1691 (m), 1610 (m), 1582 (m), 1522 (m), 1454 (m), 1342 (m), 1246 (m), 1067 (s), 1009 (s), 936 (s), 864 (m), 794 (m), 748 (m), 706 (s).

R_f = 0.38 (DCM:MeOH = 24:1).

2'''- Npeom- 3'''- (SATE)- phosphate- N^{6''}- Bz- adenosin- 3'- npeom- 2'- ((allyl, SATE)- phosphate)- N⁶- Bz- adenosin (66**)**



Zu einer Lösung von **64** (1.14 g, 1.34 mmol, 2.0 Äq) in trockenem DCM (14.5 mL) wurde unter Agronatmosphäre **34** (647 mg, 1.61 mmol, 2.4 Äq) zugegeben. Nach Zugabe von Pyr-TFA (311 mg, 1.61 mmol, 2.4 Äq) wurde die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anschließend **65** (552 mg, 0.669 mmol, 1.0 Äq) sowie BTT (0.3 m in

MeCN, 44.7 mL, 13.4 mmol, 10.0 Äq) zugegeben und für weitere 120 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von *t*-BuOOH (5.5 M in Decan, 0.97 mL, 5.36 mmol, 8.0 Äq) wurde weitere 30 Minuten gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von wässriger NaHSO₃-Lösung (500 mg/mL, 2.23 mL, 10.7 mmol, 16.0 Äq) bei 0 °C beendet. Nach Verdünnen der Suspension mit H₂O (100 mL), wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (21.4 mL) gelöst, H₂O (0.21 mL) sowie DCA (6% in DCM, 21.4 mL) zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die orange Reaktionslösung wurde mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (50 mL) und H₂O (50 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 99:1 → 49:1 → 24:1) aufgereinigt und **66** (725 mg, 446 μmol, 67%) als farblosen Schaum erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Gemisch aus 16 Diastereomeren.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute, dann 95-5% B über eine Minute): $t_R = 8.15$ Minuten, $m/z = 1592.0$ [M+H]⁺.

HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₇₁H₇₇N₁₂O₂₃P₂S₂⁺: 1591.4136 [M+H]⁺
gefunden: 1591.4203 [M+H]⁺

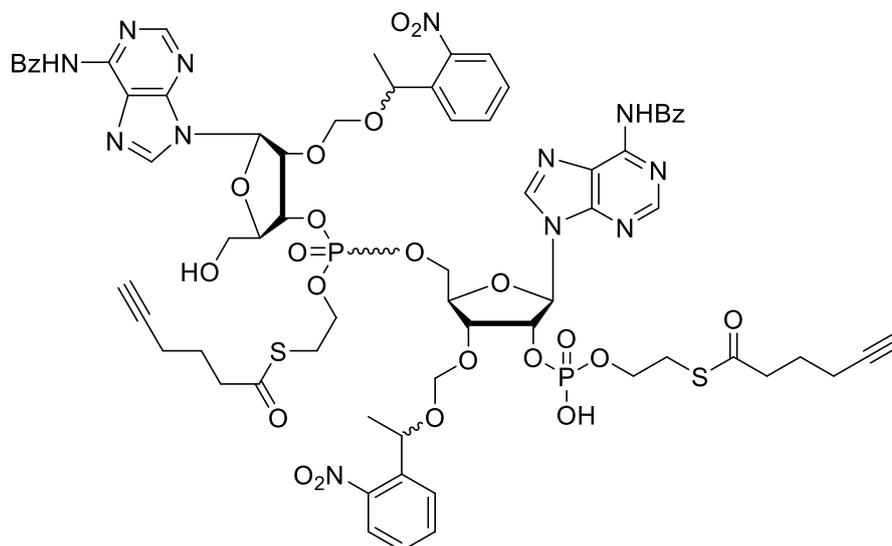
HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₇₁H₇₅N₁₂O₂₃P₂S₂⁻: 1589.3990 [M-H]⁻
gefunden: 1589.3976 [M-H]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2933 (w), 1693 (m), 1610 (m), 1582 (m), 1522 (m), 1454 (m), 1341 (m), 1247 (m), 1014 (s), 794 (m), 748 (m), 706 (s).

R_f = 0.31 (DCM:MeOH = 24:1).

Schmelzpunkt: T_s = 103.5 – 105.4 °C

2'''- Npeom- 3'''- (SATE)- Phosphate- N^{6''}- Bz- adenosin- 3'- npeom- 2'- (SATE)-phosphate- N⁶- Bz- adenosin (67)



Zu einer Lösung von **66** (710 mg, 446 μmol , 1.0 Äq) in trockenem Aceton (17.8 mL) wurde NaI (668 mg, 4.46 mmol, 10.0 Äq) gegeben und die Reaktionsmischung für 3 Stunden auf 55 °C erhitzt. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in einer möglichst kleinen Menge Aceton (0.5 mL) gelöst und tropfenweise in H₂O (8 mL) gegeben. Der resultierende Niederschlag wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag erneut durch Zugabe von H₂O (8 mL) und anschließender Zentrifugation gewaschen. Der Niederschlag wurde in Aceton gelöst, das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt **67** (650 mg, 418 μmol , 94%), welches sich aus 8 Diastereomeren zusammensetzte, wurde ohne weitere Aufreinigung im nachfolgenden Schritt verwendet.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute, dann 95-5% B über eine Minute): $t_R = 7.80 - 8.63$ Minuten, $m/z = 1552.1$ [M+H]⁺, $m/z = 1549.0$ [M-H]⁻

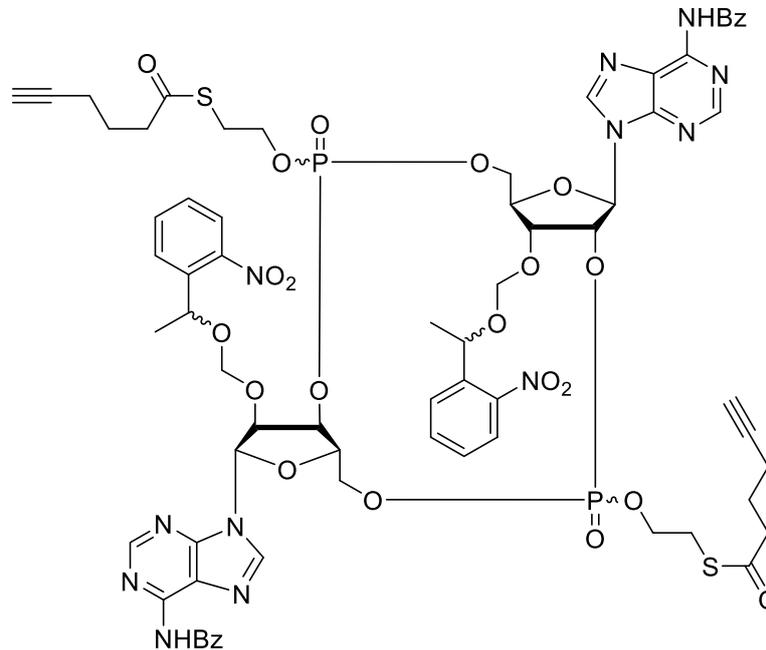
HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₆₈H₇₃N₁₂O₂₃P₂S₂⁺: 1551.3823 [M+H]⁺
gefunden: 1551.3812 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₆₈H₇₁N₁₂O₂₃P₂S₂⁻: 1549.3677 [M-H]⁻
gefunden: 1549.3667 [M-H]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2927 (w), 1688 (m), 1610 (m), 1581 (m), 1522 (m), 1455 (m), 1340 (m), 1244 (m), 1023 (s), 862 (m), 795 (m), 747 (m), 707 (s).

Schmelzpunkt: T_s = 104.6 – 107.8 °C

2',3'- c- di- Npeom- N^{6'}- Bz- adenosin- (SATE)- phosphate- N⁶- Bz- adenosin- (SATE)- phosphat (68)



Zu einer Lösung von **67** (636 mg, 410 μmol , 1.0 Äq) in trockenem Pyridin (120 mL) wurde MSNT (607 mg, 2.05 mmol, 5.0 Äq) gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt direkt säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 99:1 \rightarrow 49:1) aufgereinigt. Das Produkt **68** (310 mg, 202 μmol , 49%) wurde als farbloser Schaum erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Gemisch aus 16 Diastereomeren.

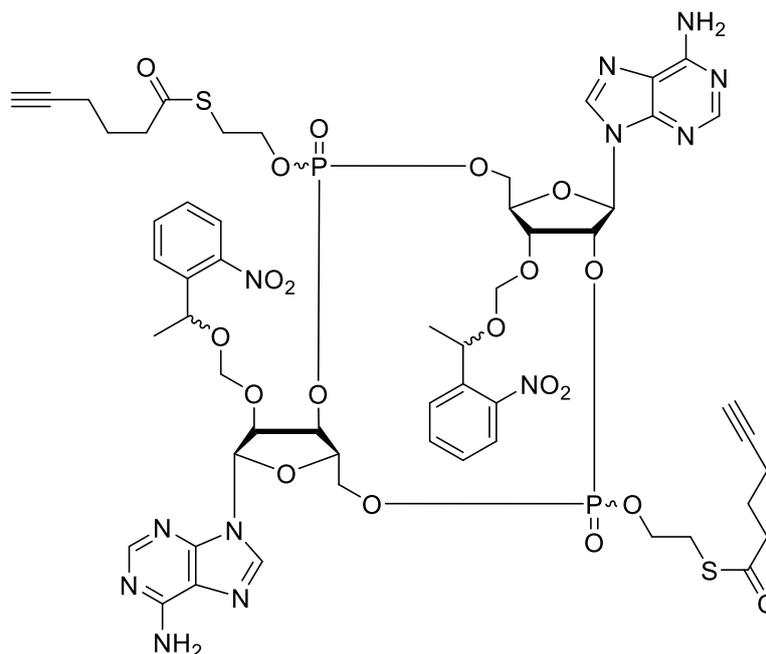
LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute, dann 95-5% B über eine Minute): t_R = 8.14 Minuten, m/z = 1533.9 [M+H]⁺ (berechnet: 1533.4 [M+H]⁺).

HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₆₈H₇₁N₁₂O₂₂P₂S₂⁺: 1533.3717 [M+H]⁺
 gefunden: 1533.3685 [M+H]⁺

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2922 (w), 2361 (w), 1694 (m), 1611 (m), 1581 (m), 1524 (m), 1454 (m), 1410 (m), 1338 (m), 1246 (m), 1064 (m), 1020 (s), 833 (m), 793 (m), 747 (m), 707 (s).

R_f = 0.61 (DCM:MeOH = 24:1).

Schmelzpunkt: T_S = 71.3 – 72.9 °C

2',3'-c-di-Npeom-diadenosin-(SATE)-monophosphat (56)

Zu einer Lösung von **68** (100 mg, 65.2 μmol , 1.0 Äq) in MeOH (26 mL) wurde ZnBr_2 (734 mg, 3.26 mmol, 50 Äq) gegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt, in einer möglichst kleinen Menge MeOH (0.5 mL) suspendiert und in tropfenweise in H_2O (8 mL) gegeben. Der resultierende Niederschlag wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag erneut durch Zugabe von H_2O (8 mL) und anschließender Zentrifugation gewaschen. Der Rückstand wurde durch Lyophilisation getrocknet und das Rohprodukt mittels *reversed-phase* HPLC (50% \rightarrow 70% MeCN in H_2O über 45 Minuten) aufgereinigt. Bei der Aufreinigung wurden die 16 erwarteten Diastereomere in zwei Peak-Cluster (PC_1 und PC_2) aufgetrennt. Die zwei Diastereomergemische des Produkts **56** PC_1 (5.94 mg, 4.48 μmol , 6.9%, t_R = 19.5 Minuten) und PC_2 (9.78 mg, 7.40 μmol , 11.3%, t_R = 23.4 – 24.5 Minuten) wurden separiert und als farblose Feststoffe erhalten.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H_2O , Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): t_R = 7.15 Minuten, m/z = 1326.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

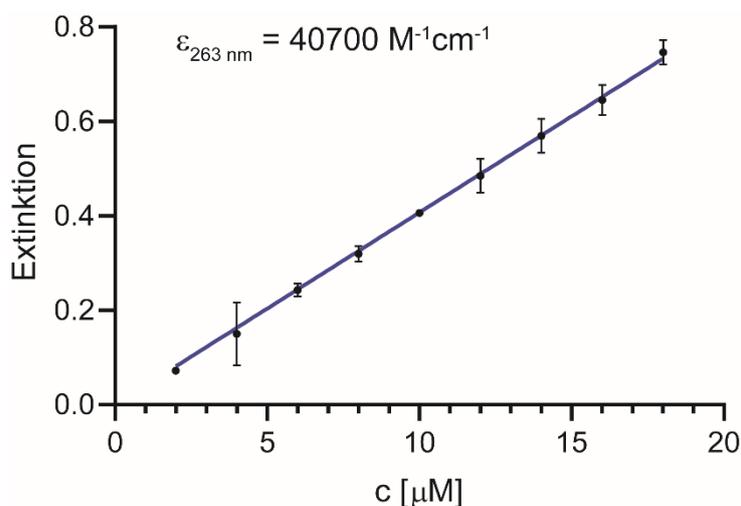
HRMS ((+)-ESI):

berechnet für $\text{C}_{54}\text{H}_{63}\text{N}_{12}\text{O}_{20}\text{P}_2\text{S}_2^+$:	1325.3193 $[\text{M}+\text{H}]^+$
gefunden:	1325.3226 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3188 (w), 1690 (m), 1599 (w), 1524 (w), 1424 (w), 1335 (w), 1275 (m), 1200 (m), 1015 (s), 932 (m), 798 (m), 748 (m), 721 (m).

Extinktionskoeffizient:

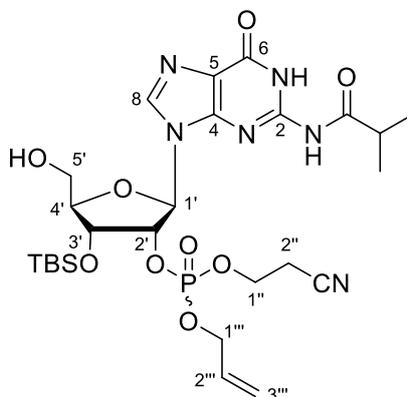
$$\epsilon_{263\text{nm}} = 40700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (1\% DMSO in H}_2\text{O)}$$



6.4 Experimentelle Vorschriften zu biologisch aktiven CDNs

6.4.1 2',3'-cGAMP (1)

2'-(Allyl, cyanoethyl)-phosphat-3'-O-TBS-*N*²-*i*Bu-guanosin (84)



Zu einer Lösung von 3'-O-TBS-5'-O-DMT-*N*²-isobutyrylguanosin 2'-CE-Phosphoramidit (995 mg, 1.03 mmol, 1.0 Äq) in trockenem DCM (6.9 mL) wurde unter Agronatmosphäre Allylalkohol (0.35 mL, 5.13 mmol, 5.0 Äq) sowie BTT (0.3 M in MeCN, 6.87 mL, 2.06 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und für 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von *t*-BuOOH (5.5 M in Decan, 0.56 mL, 3.09 mmol, 3.0 Äq) wurde weitere 30 Minuten gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von wässriger NaHSO₃-Lösung (500 mg/mL, 1.29 mL, 6.18 mmol, 6.0 Äq) bei 0 °C beendet. Nach Verdünnen der Suspension mit H₂O (100 mL), wurde mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (16.5 mL) gelöst, H₂O (0.19 mL) sowie DCA (6% in DCM, 16.5 mL) zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die orange Reaktionslösung wurde mit gesättigter,

wässriger NaHCO₃-Lösung (100 mL) und H₂O (100 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (200 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 49:1 → 24:1 → 23:2) aufgereinigt und das geschützte Nukleosid **84** (568 mg, 887 μmol, 86%) als farblosen Schaum erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Diastereomergemisch (**84a/84b** = 1:1).

¹H-NMR von **84a/84b** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.17 (s, 1H, NH), 9.21 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, H-8), 5.96 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 5.83 – 5.69 (m, 1H, 2''), 5.52 (2dd, *J* = 6.8, 4.8 Hz, 1H, H-2'), 5.31 – 5.18 (m, 2H, H-3'''), 4.55 (dd, *J* = 4.9, 1.9 Hz, 1H, H-3'), 4.41 – 4.28 (m, 2H, H-1'''), 4.17 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-4'), 4.16 – 4.03 (m, 2H, H-1''), 3.96 (dd, *J* = 12.6, 2.2 Hz, 1H, H-5a'), 3.72 (t, *J* = 10.7 Hz, 1H, H-5b'), 2.75– 2.58 (m, 3H, 2 × H-2'', H-*i*-Bu), 1.25 (2d, *J* = 6.9 Hz, 6H, H-*i*-Bu), 0.94 (s, 9H, H-*t*-Bu), 0.15 (2s, 6H, 2 × SiMe).

¹³C-NMR von **84a/84b** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 179.19 (C-*i*-Bu), 155.27 (C-6), 148.15 (C-2), 147.40 (C-4), 139.41 (C-8), 131.52 (d, *J* = 6.4 Hz, C-2'''), 122.69 (C-5), 119.61 (C-3'''), 116.36 (C-CN), 87.90 (d, *J* = 5.2 Hz, C-1'), 87.77 (C-4'), 76.95 (d, *J* = 5.1 Hz, C-2'), 72.04 (d, *J* = 4.9 Hz, C-3'), 69.30 (d, *J* = 5.7 Hz, C-1'''), 62.27 (d, *J* = 5.2 Hz, C-1''), 62.25 (C-5'), 36.44 (C-*i*-Bu), 25.81 (C-*t*-Bu), 19.77 (d, *J* = 7.4 Hz, C-2''), 19.03 (2s, C-*i*-Bu), 18.98 (s), 18.28 (C-*t*-Bu), -4.64 (2s, C-SiMe).

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): *t_R* = 6.64 Minuten, 6.75 Minuten, *m/z* = 641.5 [M+H]⁺.

HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₂₆H₄₁N₆O₉PSiNa⁺: 663.2334 [M+Na]⁺
gefunden: 663.2330 [M+Na]⁺

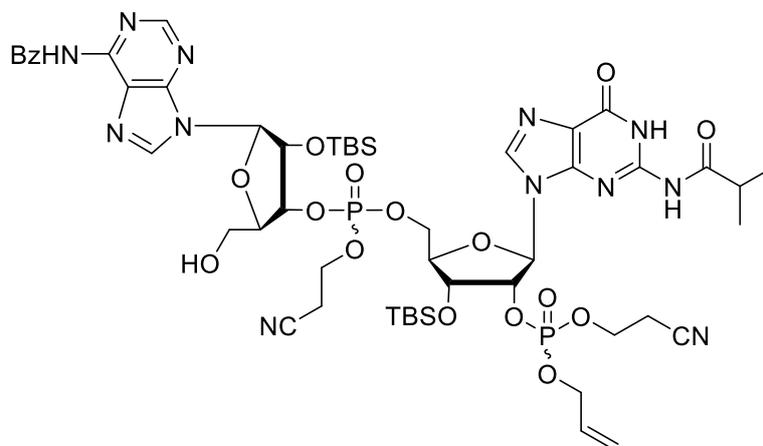
HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₂₆H₄₀N₆O₉PSi⁻: 639.2369 [M-H]⁻
gefunden: 639.2379 [M-H]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2927 (w), 2001 (w), 1676 (s), 1603 (m), 1558 (m), 1402 (m), 1252 (m), 1148 (m), 1025 (s), 948 (s), 834 (s), 780 (s), 668 (m), 622 (s).

Schmelzpunkt: T_s = 67.2 – 69.5 °C.

R_f = 0.19 (DCM:MeOH = 24:1).

3''- (Cyanoethyl)- phosphat- 2'- O-TBS- N^{6''}- Bz- adenosine- 2'- (allyl, cyanoethyl)- phosphat- 3'- O-TBS- N²- *i*Bu- guanosin (85**)**



Zu einer Lösung von **84** (560 mg, 874 μ mol 1.0 Äq) in trockenem DCM (9.0 mL) wurde unter Agronatmosphäre 2'-O-TBS-5'-O-DMT-N⁶-benzoyladenosen 2'-CE-Phosphoramidit (1.04 g, 1.05 mmol, 1.2 Äq) sowie BTT (0.3 M in MeCN, 5.83 mL, 1.75 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und für 120 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von *t*-BuOOH (5.5 M in Decan, 0.48 mL, 2.62 mmol, 3.0 Äq) wurde weitere 30 Minuten gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von wässriger NaHSO₃-Lösung (500 mg/mL, 1.09 mL, 5.24 mmol, 6.0 Äq) bei 0 °C beendet. Nach Verdünnen der Suspension mit H₂O (100 mL), wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (14.0 mL) gelöst, H₂O (0.16 mL) sowie DCA (6% in DCM, 14.0 mL) zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die orange Reaktionslösung wurde mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (100 mL) und H₂O (100 mL) versetzt und mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (200 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 99:1 → 49:1 → 19:1) aufgereinigt und **85** (831 mg, 670 μ mol, 77%) als farblosen Schaum erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Gemisch aus vier Diastereomeren.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): t_R = 7.79 Minuten, 7.88 Minuten, m/z = 1241.9 [M+H]⁺

HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₅₂H₇₅N₁₂O₁₆P₂Si₂⁺: 1241.4432 [M+H]⁺
gefunden: 1241.4439 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₅₂H₇₃N₁₂O₁₆P₂Si₂⁻: 1239.4287 [M-H]⁻

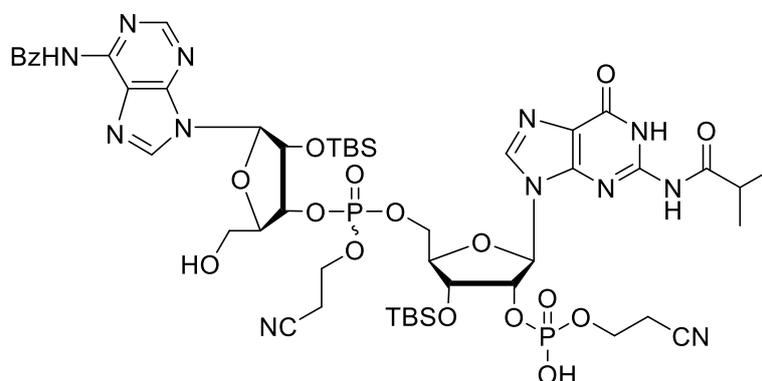
gefunden:

1239.4289 [M-H]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2929 (w), 2857 (w), 1682 (s), 1607 (m), 1562 (m), 1462 (m), 1410 (w), 1361 (w), 1251 (s), 1155 (m), 1073 (m), 1027 (s), 1005 (s), 946 (m), 835 (s), 811 (m), 780 (s), 707 (m).

R_f = 0.42 (DCM:MeOH = 19:1).

3''-(Cyanoethyl)-phosphat-3'-O-TBS-N^{6''}-Bz-Adenosine-2'-(cyanoethyl)-phosphat-3'-O-TBS-N²-iBu-guanosin (86)



Zu einer Lösung von **85** (821 mg, 661 μ mol, 1.0 Äq) in trockenem Aceton (20.0 mL) wurde NaI (991 mg, 6.61 mmol, 10.0 Äq) gegeben und die Reaktionsmischung für 3 Stunden auf 55 °C erhitzt. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in einer möglichst kleinen Menge Aceton (0.5 mL) gelöst und tropfenweise in H₂O (20 mL) gegeben. Der resultierende Niederschlag wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag erneut durch Zugabe von H₂O (10 mL) und anschließender Zentrifugation gewaschen. Der Niederschlag wurde in Aceton gelöst, das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt **86** (730 mg, 608 μ mol, 92%), welches sich aus zwei Diastereomeren zusammensetzte, wurde ohne weitere Aufreinigung im nachfolgenden Schritt verwendet.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): t_R = 6.87 Minuten, m/z = 1202.6 [M+H]⁺, m/z = 1199.6 [M-H]⁻.

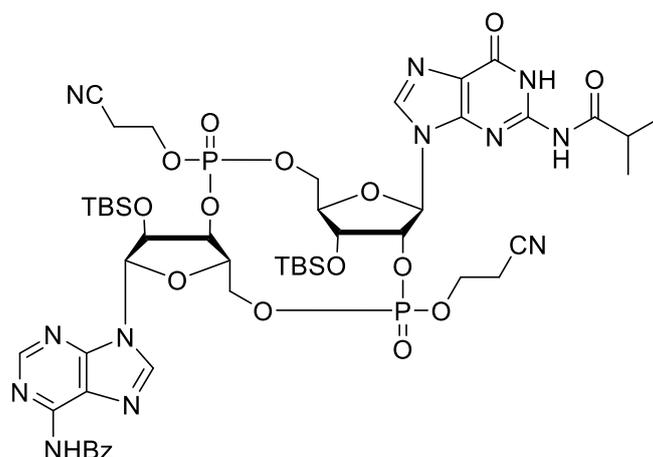
HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₄₉H₇₁N₁₂O₁₆P₂Si₂⁺: 1201.4119 [M+H]⁺
gefunden: 1201.4120 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₄₉H₆₉N₁₂O₁₆P₂Si₂⁻: 1199.3974 [M-H]⁻
gefunden: 1199.3964 [M-H]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2928 (w), 2855 (w), 1681 (m), 1608 (m), 1519 (w), 1461 (m), 1404 (w), 1361 (w), 1331 (w), 1251 (s), 1155 (m), 1073 (s), 1031 (s), 1000 (s), 941 (m), 836 (s), 781 (s), 707 (s).

Schmelzpunkt: $T_S = 171.9 - 172.6$ °C

2',3'- c- di-O-TBS- N^{6''}- Bz- Adenosin- (cyanoethyl)- phosphate- N²- iBu- guanosin- (cyanoethyl)- phosphat (87)



Zu einer Lösung von **86** (712 mg, 593 μmol , 1.0 Äq) in trockenem Pyridin (175 mL) wurde MSNT (879 mg, 2.97 mmol, 5.0 Äq) gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt direkt mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM:MeOH = 99:1 \rightarrow 49:1 \rightarrow 24:1) aufgereinigt. Das Produkt **87** (384 mg, 325 μmol , 55%) wurde als farbloser Schaum erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Gemisch aus vier Diastereomeren.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H_2O , Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): $t_R = 7.75, 7.83, 8.07$ Minuten, $m/z = 1183.6$ [$\text{M}+\text{H}$]⁺, $m/z = 1181.9$ [$\text{M}-\text{H}$]⁻.

HRMS ((+)-ESI): berechnet für $\text{C}_{49}\text{H}_{69}\text{N}_{12}\text{O}_{15}\text{P}_2\text{Si}_2^+$: 1183.4014 [$\text{M}+\text{H}$]⁺
gefunden: 1183.4012 [$\text{M}+\text{H}$]⁺

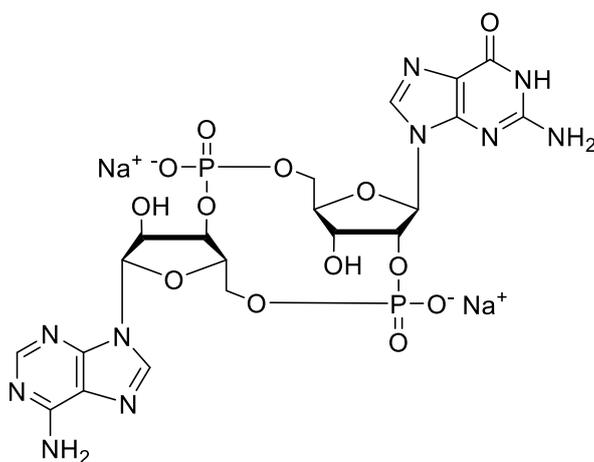
HRMS ((-)-ESI): berechnet für $\text{C}_{49}\text{H}_{67}\text{N}_{12}\text{O}_{15}\text{P}_2\text{Si}_2^-$: 1181.3868 [$\text{M}-\text{H}$]⁻
gefunden: 1181.3872 [$\text{M}-\text{H}$]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2929 (w), 2855 (w), 1682 (m), 1607 (m), 1557 (w), 1455 (m), 1407 (w), 1362 (w), 1328 (w), 1252 (s), 1189 (w), 1153 (m), 1035 (s), 1004 (s), 946 (m), 835 (s), 781 (s), 708 (s).

R_f = 0.28 (DCM:MeOH = 24:1).

Schmelzpunkt: T_S = 179.1 – 179.8 °C

2',3'-c-Guanosin-Adenosin-Monophosphat (2',3'-cGAMP, Na⁺-Salz, 1)



Zu **87** (372 mg, 314 μmol , 1.0 Äq) wurde MeNH_2 (30 wt%, 10.1 mL) gegeben und für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Alle flüchtigen Reaktionsbestandteile wurden unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand in Pyridin (5.4 mL) und THF (14.7 mL) suspendiert. Nach Zugabe von $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ (3.00 mL, 18.4 mmol, 59 Äq) und NEt_3 (3.00 mL) wurde die resultierende, gelbliche Lösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von TMSOMe (9.00 mL) wurde überschüssiges Hydrogenfluorid umgesetzt und die flüchtigen Reaktionsbestandteile *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels *reversed-phase* HPLC (0% \rightarrow 10% Puffer B in Puffer A über 45 Minuten, t_R = 32 Minuten) und nach Lyophilisation erneut mittels *reversed-phase* HPLC (0% für 7 Minuten, 0 \rightarrow 20% für 8 Minuten, 20 \rightarrow 80% für 2 Minuten $\text{MeCN} + 0.1\%$ TFA in $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA, t_R = 16.9 Minuten) aufgereinigt. Nach Lyophilisation wurde das Produkt in H_2O (5 mL) gelöst, mit *AmberChrom*[®] 50WX2 Na⁺-Form (300 mg) versetzt und für 20 Minuten gerührt. Nach Filtration und Lyophilisation wurde 2',3'-cGAMP (**1**, 100 mg, 139 μmol , 44%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8.26 (s, 1H), 7.91 (bs, 2H), 5.84 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.47 (bs, 1H), 4.38 – 3.97 (m, 9H), 3.73 (s, 1H).

¹³C-NMR (151 MHz, D_2O) δ [ppm] = 159.22, 151.94, 146.86, 140.78, 139.58, 117.87, 116.66, 110.00, 89.87, 86.17, 83.48, 83.41, 80.02, 74.21, 71.49, 69.93, 65.74, 61.99.

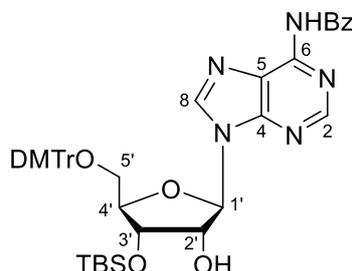
$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ [ppm] = -1.21, -4.13.

HRMS ((+)-ESI):	berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{P}_2^+$:	675.1072 [M+H] ⁺
	gefunden:	675.1067 [M+H] ⁺

HRMS ((-)-ESI):	berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{P}_2^-$:	673.0927 [M-H] ⁻
	gefunden:	673.0927 [M-H] ⁻

6.4.2 2',3'-c-di-AMP (28)

5'-O-DMTr-3'-O-TBS-N⁶-Bz-Adenosin (88)^[268]



Zu einer Lösung von 5'-O-DMTr-N⁶-Bz-adenosin (8.00 g, 11.9 mmol, 1.0 Äq) in trockenem Pyridin (100 mL) wurde TBSCl (2.33 g, 15.4 mmol, 1.3 Äq) und Imidazol (2.42 g, 35.6 mmol, 3.0 Äq) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (250 mL) beendet und mit DCM (3 × 250 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (250 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, *i*Hex:EtOAc + 0.5% NEt₃ = 1:1 → 1:2 → 1:4 → 1:9) aufgereinigt und **88** (3.25 g, 4.12 mmol, 35%) als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.23 (s, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, H-2), 8.65 (s, 1H, H-8), 8.04 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-Bz), 7.64 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-Bz), 7.55 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-Bz), 7.39 – 7.32 (m, 2H, H-DMTr), 7.29 – 7.05 (m, 7H, H-DMTr), 6.85 (dd, *J* = 9.0, 3.1 Hz, 4H, H-DMTr), 6.03 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H-1'), 5.52 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, 2'-OH), 4.91 (q, *J* = 5.5 Hz, 1H, H-2'), 4.49 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H, H-3'), 4.07 (q, *J* = 4.6 Hz, 1H, H-4'), 3.72 (s, 6H, 2 × OMe), 3.41 – 3.37 (m, 1H, H-5a'), 3.17 (dd, *J* = 10.5, 5.0 Hz, 1H, H-5b'), 0.85 (s, 9H, H-*t*-Bu), 0.09 (s, 3H, H-SiMe), 0.06 (s, 3H, H-SiMe).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 165.64 (C-Bz), 158.11 (C-DMTr), 152.08 (C-4), 151.51 (C-2), 150.51 (C-6), 144.80 (C-DMTr), 143.94 (C-8), 137.37 (C-DMTr), 135.49 (C-DMTr), 133.33 (C-Bz), 132.50 (C-Bz), 129.69 (C-DMTr), 128.93 (C-DMTr), 128.50 (C-Bz), 128.24 (C-DMTr), 127.81 (C-DMTr), 127.64 (C-DMTr), 126.72 (C-DMTr), 126.10 (C-5), 125.34 (C-DMTr), 113.16 (C-*t*-Bu), 88.20 (C-1'), 85.68 (C-DMTr), 83.73 (C-4'), 72.30 (C-3'), 71.99 (C-2'), 63.12 (C-5'), 55.04 (C-OMe), 25.80 (C-*t*-Bu), -4.43 (C-SiMe), -5.05 (C-SiMe).

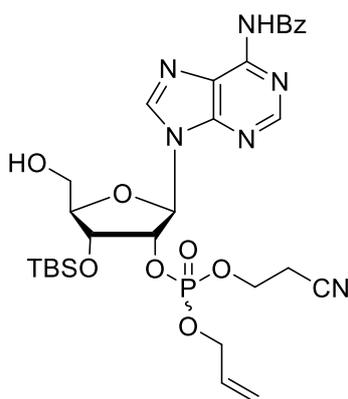
HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₄₄H₅₀N₅O₇Si⁺: 788.3474 [M+H]⁺
gefunden: 788.3465 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₄₄H₄₈N₅O₇Si⁻: 786.3328 [M-H]⁻
gefunden: 786.3343 [M-H]⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2929 (w), 2856 (w), 2360 (w), 1704 (w), 1608 (m), 1581 (m), 1508 (s), 1454 (m), 1408 (w), 1326 (w), 1297 (m), 1247 (s), 1175 (s), 1065 (m), 1031 (s), 905 (m), 864 (m), 833 (s), 781 (s), 781 (s), 754 (m), 703 (s).

R_f = 0.28 (*i*Hex:EtOAc + 0.5% NEt₃ = 1:1).

2'-(Allyl, cyanoethyl)-phosphat-3'-O-TBS-N⁶-Bz-adenosin (**89**)



Zu einer Lösung von **88** (1.50 g, 1.91 mmol, 1.0 Äq) in trockenem DCM (15.2 mL) wurde unter Argonatmosphäre 2-Cyanoethyl *N,N,N',N'*-Tetraisopropylphosphorodiamidit (0.73 mL, 2.29 mmol, 1.2 Äq) und Pyr·TFA (442 mg, 2.29 mmol, 1.2 Äq) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Allylalkohol (0.65 mL, 9.55 mmol, 5.0 Äq) sowie BTT (0.3 M in MeCN, 12.7 mL, 3.82 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und für weitere 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von *t*-BuOOH (5.5 M in Decan, 1.04 mL, 5.73 mmol, 3.0 Äq) wurde weitere 30 Minuten gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von wässriger NaHSO₃-Lösung (500 mg/mL, 2.39 mL, 11.5 mmol, 6.0 Äq) bei 0 °C beendet. Nach Verdünnen der Suspension mit H₂O (200 mL), wurde mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (300 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (30.6 mL) gelöst, H₂O (0.34 mL) sowie DCA (6% in DCM, 30.6 mL) zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die orange Reaktionslösung wurde mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (100 mL) und H₂O (100 mL) versetzt und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (300 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 99:1 → 19:1) aufgereinigt und **89** (860 mg, 1.31 mmol, 69%) als farbloser Schaum erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Diastereomergemisch (**89a**/**89b** = 1:1).

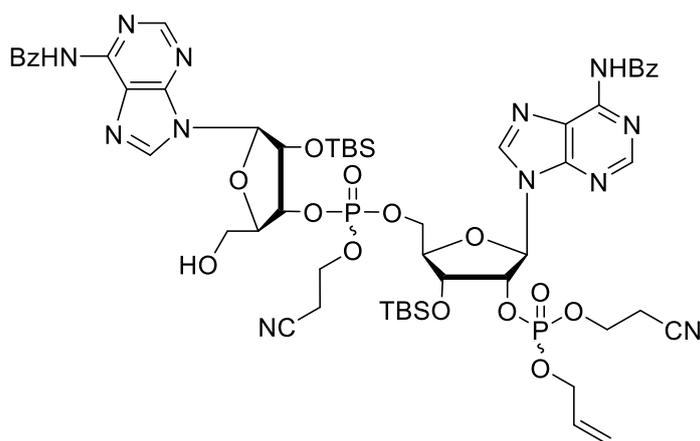
LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): $t_R = 6.85, 6.92$ Minuten, $m/z = 659.4$ [M+H]⁺.

HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₂₉H₄₀N₆O₈PSi⁺: 659.2409 [M+H]⁺
gefunden: 659.2409 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₂₉H₃₈N₆O₈PSi⁻: 657.2263 [M-H]⁻
gefunden: 657.2269 [M-H]⁻

$R_f = 0.43$ (DCM:MeOH = 24:1).

3''- (Cyanoethyl)- phosphat- 2'- O-TBS- N^{6''}- Bz- adenosine- 2'- (allyl, cyanoethyl)- phosphat- 3'- O-TBS- N⁶-Bz-adenosin (90)



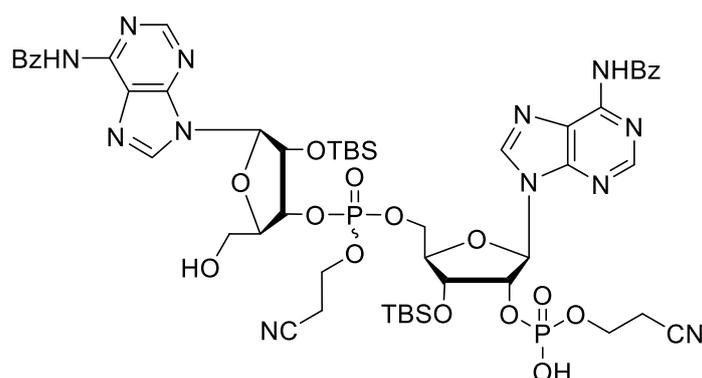
Zu einer Lösung von **89** (806 mg, 1.22 mmol, 1.0 Äq) in trockenem MeCN (8.10 mL) wurde unter Agronatmosphäre 2'-O-TBS-5'-O-DMT-N⁶-benzoyladenosin 2'-CE-Phosphoramidit (1.57 g, 1.59 mmol, 1.3 Äq) sowie BTT (0.3 M in MeCN, 8.10 mL, 2.44 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und für 120 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von *t*-BuOOH (5.5 M in Decan, 0.67 mL, 3.66 mmol, 3.0 Äq) wurde weitere 30 Minuten gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von wässriger NaHSO₃-Lösung (500 mg/mL, 1.52 mL, 7.32 mmol, 6.0 Äq) bei 0 °C beendet. Nach Verdünnen der Suspension mit H₂O (100 mL), wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (19.5 mL) gelöst, H₂O (0.22 mL) sowie DCA (6% in DCM, 19.5 mL) zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die orange Reaktionslösung wurde mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (100 mL) und H₂O (100 mL) versetzt und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (200 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in*

vacuo entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 99:1 → 49:1 → 19:1) aufgereinigt und **90** (1.13 g, 900 μmol, 74%) als farbloser Schaum erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Gemisch aus vier Diastereomeren.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): $t_R = 7.76, 7.84, 8.89, 7.96$ Minuten, $m/z = 1259.9 [M+H]^+$, $m/z = 1257.9 [M-H]^-$ (berechnet: $1259.4 [M+H]^+$, $1257.4 [M-H]^-$).

$R_f = 0.24$ (DCM:MeOH = 24:1).

3''-(Cyanoethyl)-phosphat-2'-O-TBS-*N*^{6''}-Bz-adenosine-2'-(cyanoethyl)-phosphat-3'-O-TBS-*N*⁶-Bz-adenosin (91**)**



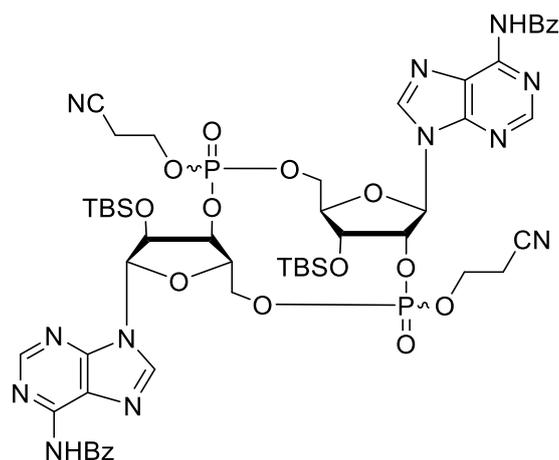
Zu einer Lösung von **90** (1.13 g, 900 μmol, 1.0 Äq) in trockenem Aceton (30.0 mL) wurde NaI (1.35 g, 9.00 mmol, 10.0 Äq) gegeben und die Reaktionsmischung für 5 Stunden auf 55 °C erhitzt. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt direkt mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM:MeOH = 19:1 → 9:1 → 4:1 → 7:3) aufgereinigt und **91** (647 mg, 531 μmol, 59%) als gelblicher Feststoff erhalten. Das Produkt, welches sich aus zwei Diastereomeren zusammensetzte, wurde ohne weitere Aufreinigung im nachfolgenden Schritt verwendet.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): $t_R = 8.20$ Minuten, $m/z = 1219.8 [M+H]^+$, $m/z = 1217.2 [M-H]^-$.

HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₅₂H₆₉N₁₂O₁₅P₂Si₂⁺: 1219.4014 [M+H]⁺
gefunden: 1219.4043 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₅₂H₆₇N₁₂O₁₅P₂Si₂⁻: 1217.3868 [M-H]⁻

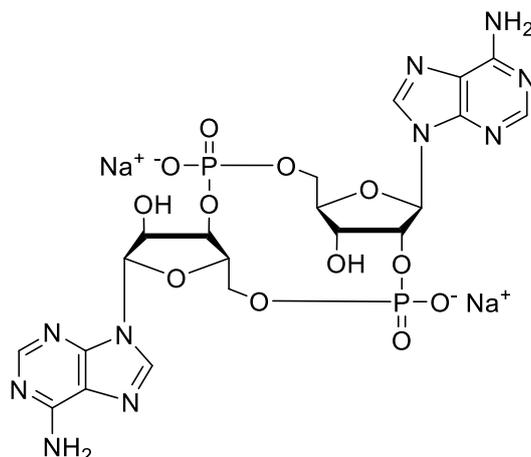
gefunden:

1217.3906 [M-H]⁻ $R_f = 0.24$ (DCM:MeOH = 4:1).**Schmelzpunkt:** $T_s = 193.1 - 193.8$ °C**2',3'-c-di-O-TBS-di-N⁶-Bz-Adenosin-(cyanoethyl)-phosphate (92)**

Zu einer Lösung von **91** (400 mg, 330 μ mol, 1.0 Äq) in trockenem THF (78.0 mL) mit aktiviertem Molekularsieb (4 Å) wurde TPSCI (5.00 g, 16.5 mmol, 50.0 Äq) und *N*-Methylimidazol (1.32 mL, 16.5 mmol, 50.0 Äq) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von H₂O (250 mL) beendet und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × EtOAc) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (200 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 99:1 → 19:1) aufgereinigt und **92** (208 mg, 173 μ mol, 52%) als farbloser Schaum erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Gemisch aus vier Diastereomeren.

LC-MS (Puffer A: 0.01% Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0.01% Ameisensäure in MeCN, Methode: 5-80% Puffer B in 7 Minuten, dann 95% B für eine Minute): $t_R = 7.91$ Minuten, $m/z = 1201.3$ [M+H]⁺, $m/z = 1199.7$ [M-H]⁻ (berechnet: 1201.4 [M+H]⁺, 1199.3 [M-H]⁻).

 $R_f = 0.38$ (DCM:MeOH = 24:1).

2',3'-c-di-Adenosin-monophosphat (2',3'-c-di-AMP, Na⁺-Salz, 28)

Zu einer Lösung von **92** (208 mg, 173 μmol , 1.0 Äq) in MeOH (27.9 mL) wurde NH_4OH -Lösung (28-30 wt%, 27.9 mL) gegeben und für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Alle flüchtigen Reaktionsbestandteile wurden unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand in Pyridin (1.50 mL) und THF (7.90 mL) suspendiert. Nach Zugabe von $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ (1.63 mL, 10.0 mmol, 9.4 Äq) und NEt_3 (1.63 mL) wurde die resultierende, gelbliche Lösung für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von TMSOMe (4.10 mL) wurde überschüssiges Hydrogenfluorid umgesetzt und die flüchtigen Reaktionsbestandteile *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mittels *reversed-phase* HPLC (0% \rightarrow 20% Puffer B in Puffer A über 45 Minuten, $t_R = 19.3$ Minuten) aufgereinigt. Nach mehrmaliger Lyophilisation wurde der ölige Rückstand mit AmberChrom[®] 50WX2 Na⁺-Form (300 mg) versetzt und für 20 Minuten gerührt. Nach Filtration und Lyophilisation wurde **28** (12 mg, 17.0 μmol , 10%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 8.94 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 6.35 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.16 (s, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.55 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.41 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 4.33 (dd, $J = 11.5, 5.8$ Hz, 1H), 4.19 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.01 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O) δ [ppm] = 149.89, 149.15, 148.77, 146.71, 146.35, 145.28, 142.06, 140.18, 117.51, 117.26, 89.56, 84.47, 79.41, 74.04, 72.57, 70.61, 66.70, 62.06.

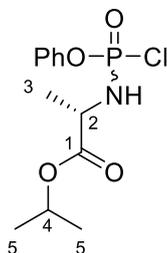
HRMS ((+)-ESI): berechnet für C₂₀H₂₅N₁₀O₁₂P₂⁺: 659.1123 [M+H]⁺
gefunden: 659.1132 [M+H]⁺

HRMS ((-)-ESI): berechnet für C₂₀H₂₃N₁₀O₁₂P₂⁻: 657.0978 [M-H]⁻
gefunden: 657.0982 [M-H]⁻

6.5 Experimentelle Vorschriften zu cAzadC-Prodrugs

6.5.1 ProTide

Isopropyl-(chloro(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninat (**74**)^[246]



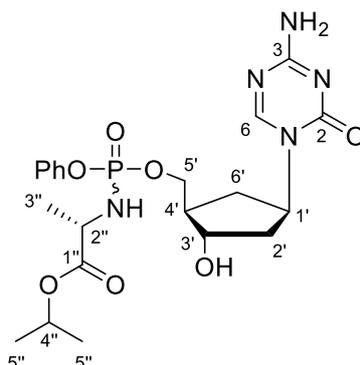
Das Hydrochlorid-Salz des *L*-Alanin-isopropylesters **73** (335 mg, 2.00 mmol, 1.0 Äq) wurde in trockenem DCM (20 mL) unter Argonatmosphäre gelöst und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Phenyl-dichlorophosphat (0.31 mL, 2.00 mmol, 1.0 Äq) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 Minuten gerührt, gefolgt von der tropfenweisen Zugabe von NEt_3 (0.56 mL, 4.00 mmol, 2.0 Äq) über 15 Minuten. Die farblose Lösung wurde weitere 30 Minuten gerührt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 3 Stunden gerührt. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in trockenem Et_2O suspendiert, filtriert und der Filterkuchen mit Et_2O gewaschen. Das Lösemittel des Filtrats wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, *i*Hex:EtOAc = 4:1) gereinigt. Das Diastereomerenmischung (**74a**/**74b** = 1:1) des Produkts **74** (420 mg, 1.37 mmol, 69%) wurde als gelbliches Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ von D_1/D_2 (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.40 (td, $J = 7.4, 7.0, 3.4$ Hz, 2H, H-Ar), 7.31 – 7.23 (m, 3H, H-Ar), 5.11 (2p, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-4), 4.43 – 4.24 (m, 1H, H-2), 4.23 – 4.03 (m, 1H, NH), 1.52 (2d, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-3), 1.34 – 1.26 (m, 6H, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ von D_1/D_2 (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 172.32 (2d, $J = 9.1$ Hz), 149.85 (2d, $J = 5.8$ Hz), 130.07, 126.13, 120.68 (2d, $J = 1.4$ Hz), 69.96 (2s), 50.98 (s-breit), 50.63 (2s), 21.84, 21.77, 20.73 (2d, $J = 3.6$ Hz).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.11, 7.72.

$R_f = 0.87$ (*i*Hex:EtOAc = 3:7).

cAzadC-monophosphate-ProTide (70)

Das Nucleosidanaloga cAzadC (**21**, 25.0 mg, 110 μ mol, 1.0 \ddot{A} q) wurde am Hochvakuum für 30 Minuten bei 50 °C getrocknet, anschließend unter Argonatmosphäre in trockenem Pyridin (2.28 mL) suspendiert und **74** (1 M in THF, 0.13 mL, 130 μ mol, 1.2 \ddot{A} q) zugetropft. Anschließend wurde Dimethylaluminiumchlorid (1 M in THF, 55.0 μ L, 55.0 μ mol, 0.5 \ddot{A} q) bei 0 °C über 10 Minuten tropfenweise zugegeben, die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in MeOH (25 mL) gegossen, unter reduziertem Druck eingengt und mit Toluol co-evaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels *reversed-phase* HPLC (15% \rightarrow 25% MeCN in H₂O über 45 Minuten) gereinigt, die Diastereomere **70a** (5.00 mg, 0.010 mmol, 9%, t_R = 43 Minuten) und **70b** (7.00 mg, 0.014 mmol, 13%, t_R = 45 Minuten) separiert und als farblose Feststoffe erhalten.

¹H-NMR von **70a** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.26 (s, 1H, H-6), 7.39 – 7.32 (m, 3H, H-Ar), 7.20 – 7.13 (m, 2H, H-Ar), 5.88 (dd, J = 12.7, 10.0 Hz, 1H, NH), 4.90 (d, J = 4.1 Hz, 1H, OH), 4.85 (p, J = 6.3 Hz, 1H, H-4''), 4.74 (dt, J = 17.4, 8.6 Hz, 1H, H-1'), 4.14 (dt, J = 10.7, 5.7 Hz, 1H, H-5a'), 4.06 – 4.01 (m, 1H, H-3'), 3.97 (dt, J = 10.0, 6.5 Hz, 1H, H-5b'), 3.76 (td, J = 9.8, 7.1 Hz, 1H, H-2''), 2.19 – 2.04 (m, 3H, H-2a', H-4', H-6'), 1.84 (ddd, J = 12.7, 8.4, 3.8 Hz, 1H, H-2b'), 1.61 (dd, J = 11.5, 8.6 Hz, 1H, H-6'), 1.21 (dd, J = 7.1, 1.0 Hz, 3H, H-3'), 1.15 (dd, J = 6.2, 2.1 Hz, 6H, H-5'').

¹³C NMR von **70a** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 172.77 (d, J = 4.6 Hz, C-1''), 165.81 (C-2), 157.53 (C-6), 153.69 (C-4), 150.83 (d, J = 6.5 Hz, C-Ar), 129.53 (C-Ar), 124.42 (C-Ar), 120.25 (d, J = 4.8 Hz, C-Ar), 71.01 (C-3'), 67.90 (C-4''), 67.52 (d, J = 5.3 Hz, C-5'), 54.56 (C-1'), 49.98 (C-2''), 47.15 (d, J = 7.6 Hz, C-4'), 38.55 (C-2'), 32.23 (C-6'), 21.44 (C-5''), 21.39 (C-5''), 19.68 (d, J = 7.1 Hz, C-3'').

³¹P-NMR von **70a** (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.63.

¹H-NMR von **70b** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.25 (s, 1H, H-6), 7.39 – 7.32 (m, 3H, H-Ar), 7.20 – 7.13 (m, 2H, H-Ar), 5.91 (dd, J = 13.1, 10.1 Hz, 1H, NH), 4.91 – 4.82 (m, 2H, H-4'',OH),

4.72 (p, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-1'), 4.11 (dt, $J = 10.8, 5.9$ Hz, 1H, H-5'), 4.06 – 3.99 (m, 1H, H-3'), 3.91 (dt, $J = 10.0, 6.5$ Hz, 1H, H-5'), 3.77 (td, $J = 10.1, 7.1$ Hz, 1H, H-2''), 2.19 – 2.01 (m, 3H, H-2', H-4', H-6'), 1.83 (ddd, $J = 12.6, 8.4, 3.8$ Hz, 1H, H-2'), 1.52 (dd, $J = 19.2, 10.9$ Hz, 1H, H-6'), 1.22 (d, $J = 7.1, 1.0$ Hz, 3H, H-3'), 1.16 (dd, $J = 6.2, 1.5$ Hz, 6H, H-5'').

$^{13}\text{C-NMR}$ von **70b** (101 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 172.72 (d, $J = 4.8$ Hz, C-1''), 165.81 (C-2), 157.51 (C-6), 153.66 (C-4), 150.85 (d, $J = 6.5$ Hz, C-Ar), 129.57 (C-Ar), 124.42 (C-Ar), 120.21 (d, $J = 4.8$ Hz, C-Ar), 70.98 (C-3'), 67.92 (C-4''), 67.51 (d, $J = 5.3$ Hz, C-5'), 54.52 (C-1'), 49.82 (C-2''), 47.14 (d, $J = 7.1$ Hz, C-4'), 38.40 (C-2'), 32.31 (C-6'), 21.43 (C-5''), 21.40 (C-5''), 19.72 (d, $J = 6.7$ Hz, C-3'').

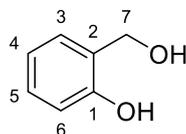
$^{31}\text{P-NMR}$ von **70b** (162 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 3.46.

HRMS ((+)-ESI):	berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^+$:	496.1956 [M+H] ⁺
	gefunden:	496.1956 [M+H] ⁺
HRMS ((-)-ESI):	berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$:	494.1810 [M-H] ⁻
	gefunden:	494.1811 [M-H] ⁻

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3191 (w), 1636 (s), 1473 (s), 1208 (s), 1151 (s), 1105 (s), 1007 (s), 928 (s), 799 (s), 770 (m), 690 (m), 617 (m).

6.5.2 CycloSal

Salicylalkohol (**76**)^[252-253]



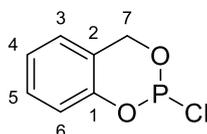
Salicylaldehyd (**75**, 10.0 g, 81.9 mmol, 1.0 Äq) wurde in EtOH (330 mL) gelöst und bei 0 °C NaBH₄ (3.06 g, 81.9 mmol, 1.0 Äq) unter Rühren in einer Portion zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde bei 0 °C gerührt, anschließend mit AcOH (13.1 mL) neutralisiert und *in vacuo* eingengt. Der Rückstand wurde in Et₂O (250 mL) gelöst und mit H₂O (250 mL), gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (250 mL) und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (250 mL) in angegebener Reihenfolge gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösemittel *in vacuo* entfernt und **76** (8.63 g, 69.5 mmol, 85%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.33 (s, 1H, Ph-OH), 7.21 (td, *J* = 7.8, 1.7 Hz, 1H, H-5), 7.04 (dd, *J* = 7.5, 1.7 Hz, 1H, H-3), 6.91 – 6.82 (m, 2H, H-4, H-6), 4.85 (s, 2H, H-7), 2.39 (s, 1H, Bn-OH).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 156.15 (C-1), 129.67 (C-5), 127.98 (C-3), 124.73 (C-2), 120.24 (C-4), 116.66 (C-6), 64.79 (C-7).

R_f = 0.56 (*i*Hex:EtOAc = 1:1).

Salicylchlorophosphit (**77**)^[252-253]



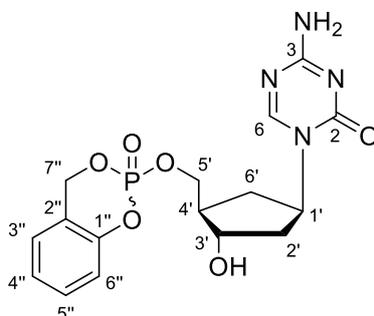
Zu einer Lösung von **76** (1.00 g, 8.06 mmol, 1.0 Äq) in trockenem Et₂O (10 mL) wurde unter Argonatmosphäre bei -10 °C PCl₃ (0.84 mL, 9.67 mmol, 1.2 Äq) tropfenweise zugegeben. Zur Reaktionsmischung wurde eine Lösung von Pyridin (1.36 mL) in Et₂O (2.00 mL) über einen Zeitraum von 30 Minuten zugetropft, zunächst für eine Stunde bei -10 °C und anschließend für zwei weitere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Suspension wurde für die vollständige Fällung von Pyridiniumchlorid luftdicht über Nacht bei 0 °C gelagert. Der Überstand wurde mit einer Spritze in einen ausgeheizten Kolben unter Argonatmosphäre überführt und der feste Rückstand mit trockenem Et₂O (4 × 30 mL) gewaschen. Das Lösemittel

wurde unter striktem Ausschluss von Luft am Rotationsverdampfer unter verminderten Druck entfernt, das Rohprodukt über Kugelrohr-Destillation (Sdp. 165 – 175 °C bei 3 mbar) aufgereinigt und **77** (753 mg, 3.99 mmol, 50%) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.20 – 7.15 (m, 1H, H-5), 7.01 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H, H-3), 6.92 – 6.86 (m, 2H, H-4, H-6), 5.36 (dd, *J* = 14.2, 2.7 Hz, 1H, H-7a), 4.94 (dd, *J* = 14.2, 9.6 Hz, 1H, H-7b).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 139.91.

cAzadC-monophosphate-CycloSal (**71**)



Das Nucleosidanaloga cAzadC (**21**, 50.0 mg, 221 μmol, 1.0 Äq) wurde am Hochvakuum für 30 Minuten bei 50 °C getrocknet und anschließend unter Argonatmosphäre in trockenem DMF (2.21 mL) und trockenem THF (1.11 mL) gelöst. Bei –60 °C wurde DIPEA (0.08 mL, 442 μmol, 2.0 Äq) und über einen Zeitraum von 30 Minuten **77** (0.4 M in THF, 0.83 mL, 331 μmol, 1.5 Äq) tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 20 Minuten gerührt und anschließend *t*-BuOOH (5.5 M in Decan, 0.08 mL, 442 μmol, 2.0 Äq) bei –40 °C zugegeben. Nach weiteren 30 Minuten wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und die Lösemittel *in vacuo* entfernt und direkt säulenchromatographisch (Silica Gel, DCM:MeOH = 19:1 → 9:1 → 4:1) aufgereinigt. Das vorgereinigte Produkt wurde darüber hinaus mittels *reversed-phase* HPLC (5% → 25% MeCN in H₂O über 45 Minuten, *t_R* = 28 Minuten) aufgereinigt und **71** (9.50 mg, 24.1 μmol, 11%) als farbloser Feststoff erhalten. Bei dem isolierten Produkt handelte es sich um ein untrennbares Diastereomergemisch (**71a**/**71b** = 1:1).

¹H-NMR von **71a**/**71b** (400 MHz, MeCN-*d*₃): δ [ppm] = 8.02 (2s, 1H, H-6), 7.37 – 7.31 (m, 1H, H-5''), 7.22 – 7.14 (m, 2H, H-3'', H-4''), 7.09 (2dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz, 1H, H-6''), 5.45 – 5.39 (m, 2H, H-7''), 4.73 – 4.55 (m, 2H, H-4'), 4.33 – 4.02 (m, 3H, H-3', 2 × H-5'), 2.25 – 2.05 (m, 3H, H-2a', H-4', H-6'), 2.00 – 1.93 (m, 1H, H-2b'), 1.65 – 1.51 (m, 1H, H-6').

¹³C-NMR von **71a/71b** (101 MHz, MeCN-d₃) δ [ppm] = 166.94 (C-2), 158.98 (2s, C-6), 156.05 (2s, C-4), 150.69 (2d, *J* = 6.8 Hz, C-1''), 130.89 (2d, *J* = 2.3 Hz, C-5''), 126.94 (2s, C-3''), 125.68 (C-4''), 122.09 (2d, *J* = 10.0 Hz, C-2''), 119.43 (2s, C-6''), 72.28 (2s, C-3'), 70.68 – 69.90 (m, C-5'), 56.82 (2s, C-1'), 47.97 (2d, *J* = 6.8 Hz, C-4'), 39.16 (2s, C-2'), 32.67 (2s, C-6').

³¹P-NMR (162 MHz, MeCN-d₃): δ [ppm] = -9.27, -9.33.

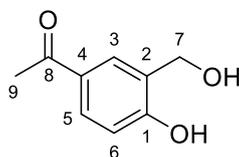
HRMS ((+)-ESI):	berechnet für C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₆ P ⁺ :	395.1115 [M+H] ⁺
	gefunden:	395.1118 [M+H] ⁺

IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3322 (w), 1632 (s), 1504 (m), 1488 (m), 1284 (m), 1244 (m), 1191 (m), 1106 (w), 1016 (s), 936 (m), 800 (s), 760 (m).

R_f = 0.77 (DCM:MeOH = 4:1).

6.5.3 Lock-In-CycloSal

4-Acetyl-salicylalkohol (**79**)^[256-257]



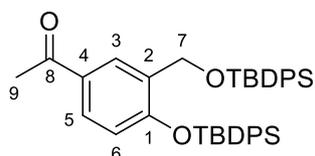
Zu einer Suspension von 4-Hydroxyacetophenon (**78**, 5.00 g, 36.7 mmol, 1.0 Äq) in konz. HCl (36.7 mL) wurde wässrige Formaldehyd-Lösung (37%, 12.5 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 50 °C für 4 Stunden gerührt und der resultierende, rote Niederschlag durch Filtration isoliert. Der rote Feststoff wurde anschließend in THF (133 mL) gelöst, mit CaCO₃ (5.47 g, 54.6 mmol, 1.5 eq.) sowie H₂O (53 mL) versetzt und für einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Die rote Reaktionsmischung wurde mit konz. HCl auf pH = 6 eingestellt und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 130 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM:MeOH = 99:1 → 19:1) aufgereinigt um **79** (4.28 g, 25.8 mmol, 71%) als hellroten Feststoff zu erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.34 (s, 1H, Ph-OH), 7.95 (m, 1H, H-3), 7.72 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H-5), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 5.12 (t, *J* = 5.6 Hz 1H, Bn-OH), 4.49 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-7), 2.47 (s, 3H, H-9).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 196.24 (C-8), 158.81 (C-1), 128.82 (C-4), 128.78 (C-3), 128.38 (C-2), 127.89 (C-5), 114.22 (C-6), 57.82 (C-7), 26.30 (C-9).

R_f = 0.39 (DCM:MeOH = 9:1).

Di-O-TBDPS-4-acetyl-salicylalkohol (**80**)^[256-257]



Zu einer Lösung von **79** (4.27 g, 25.7 mmol, 1.0 Äq) in trockenem Pyridin wurde unter Argonatmosphäre Imidazol (12.2 g, 180 mmol, 7.0 Äq) und TBDPSCI (33.4 mL, 129 mmol, 5.0 Äq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt und mit H₂O (100 mL) und EtOAc (100 mL) versetzt. Die resultierenden Phasen wurden separiert und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen

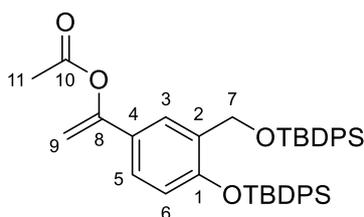
wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch (1. Silica Gel, *i*Hex:EtOAc = 19:1 → 9:1; 2. Silica Gel, *i*Hex:DCM = 4:1 → 2:1 → 1:1) aufgereinigt und konnte nur in analytisch relevanten Mengen in Reinform isoliert werden. Der überwiegende Teil des erhaltenen farblosen Öls setzte sich aus **80** (13.2 g, 20.5 mmol, 80%) und *tert*-Butyldiphenylsilanol zusammen und wurde ohne Aufreinigung im nachfolgenden Schritt verwendet. Die angegebene Ausbeute wurde durch quantitatives NMR unter Verwendung von 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard berechnet.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.22 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-3), 7.75 – 7.69 (m, 4H, H- Ph_{TBDPS}), 7.61 – 7.57 (m, 4H, H- Ph_{TBDPS}), 7.49 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H, H-5), 7.39 (m, 12H, H- Ph_{TBDPS}), 6.36 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-6), 4.99 (s, 2H, H-7), 2.50 (s, 3H, H-8), 1.17 (s, 9H, H-*t*Bu), 0.92 (s, 9H, H-*t*Bu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 197.38 (C-8), 156.40 (C-1), 135.74 (C- Ph_{TBDPS}), 133.53 (C- Ph_{TBDPS}), 131.93 (C-2), 131.47 (C- Ph_{TBDPS}), 130.66 (C-4), 130.31 (C- Ph_{TBDPS}), 129.92 (C- Ph_{TBDPS}), 128.26 (C-5), 128.15 (C-3), 128.08 (C- Ph_{TBDPS}), 127.92 (C- Ph_{TBDPS}), 118.27 (C-6), 61.69 (C-7), 27.07 (C- Me_{tBu}), 26.53 (C-9), 26.43 (C- Me_{tBu}), 19.55 (C-*t*Bu).

R_f = 0.67 (*i*Hex:EtOAc = 9:1).

Di-*O*-TBDPS-4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohol (**81**)^[256-257]

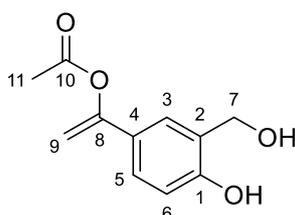


Zu einer Lösung von **80** (7.36 g, 11.5 mmol, 1.0 Äq) in Isopropenylacetat (98 mL) wurde *p*TsOH· H_2O (653 mg, 3.43 mmol, 0.3 Äq) gegeben und das Reaktionsgemisch für 18 Stunden unter Argonatmosphäre auf 110 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde H_2O (100 mL) und Et_2O (100 mL) zugegeben und die Phasen separiert. Die wässrige Phase wurde mit Et_2O (2 × 100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt, das Rohprodukt säulenchromatographisch (*i*Hex:DCM = 1:1) gereinigt und konnte nicht in Reinform isoliert werden. Das erhaltene, gelbliche Öl setzte sich aus **81** (5.41 g, 7.90 mmol, 69%) und *tert*-Butyldiphenylsilylacetat zusammen und wurde ohne Aufreinigung im nachfolgenden Schritt verwendet. Die angegebene Ausbeute wurde durch quantitatives NMR unter Verwendung von 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard berechnet.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.78 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-3), 7.75 – 7.69 (m, 4H, H-Ph_{TBDPS}), 7.61 – 7.57 (m, 4H, H-Ph_{TBDPS}), 7.43 – 7.37 (m, 8H, H-Ph_{TBDPS}), 7.35 – 7.29 (m, 4H, H-Ph_{TBDPS}), 6.97 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H, H-5), 6.30 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-6), 5.33 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-9), 4.97 (s, 2H, H-7), 4.87 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-9), 2.19 (s, 3H, H-11), 1.16 (s, 9H, H-*t*Bu), 0.89 (s, 9H, H-*t*Bu).

R_f = 0.16 (*i*Hex:DCM = 2:1).

4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylalkohol (**82**)^[256-257]

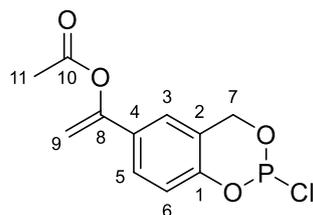


In einem Plastikgefäß wurde zu einer Lösung von **81** (1.41 g, 7.90 mmol, 1.0 Äq) in THF (67.5 mL) Et₃N·3HF (3.18 mL, 19.5 mmol, 3.0 Äq) tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von H₂O (70 mL) und Et₂O (70 mL) wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Et₂O (3 × 70 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger NaHCO₃-Lösung (5%, 100 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt, das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM:MeOH = 1:0 → 97:3) gereinigt und **82** (305 mg, 1.47 mmol, 71%) als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 9.70 (bs, 1H, Ph-OH), 7.43 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-3), 7.20 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H, H-5), 6.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 5.39 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-9), 5.06 (bs, 1H, Bn-OH), 4.79 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-9), 4.46 (s, 2H, H-7), 2.24 (s, 3H, H-11).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 169.32 (C-10), 155.45 (C-8), 153.22 (C-1), 129.19 (C-2), 124.87 (C-4), 124.45 (C-3), 124.21 (C-5), 114.95 (C-6), 99.69 (C-9), 58.42 (C-7), 21.18 (C-11).

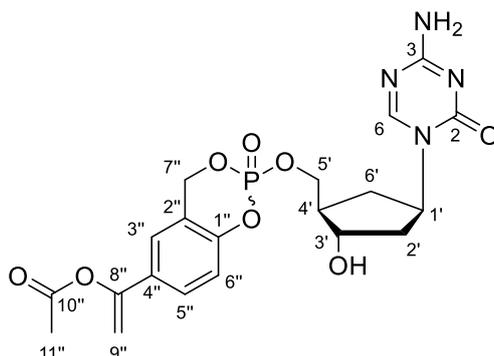
R_f = 0.22 (DCM:MeOH = 97:3).

4-(1-Acetoxyvinyl)-salicylchlorophosphit (83**)**^[256-257]

Zu einer Lösung von **82** (276 mg, 1.33 mmol, 1.0 Äq) in trockenem THF (7.6 mL) unter Argonatmosphäre wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ PCl_3 (0.14 mL, 1.59 mmol, 1.2 Äq) tropfenweise zugegeben und für eine Stunde gerührt. Zur Reaktionsmischung wurde eine Lösung von trockenem Pyridin (0.27 mL, 3.05 mmol, 2.3 Äq) in trockenem THF (2.5 mL) über einen Zeitraum von 10 Minuten zugetropft, zunächst für eine Stunde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend für zwei weitere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Suspension wurde für die vollständige Fällung von Pyridiniumchlorid luftdicht über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der Überstand wurde mit einer Spritze in einen ausgeheizten Kolben unter Argonatmosphäre überführt und der feste Rückstand mit trockenem THF ($3 \times 10\text{ mL}$) gewaschen. Das Lösemittel wurde unter striktem Ausschluss von Luft am Rotationsverdampfer unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in trockenem THF (2 mL) suspendiert, unter Argon filtriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt **83** (109 mg, 0.40 mmol, 30%) wurde als gelbliches Öl erhalten und wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.34 (dd, $J = 8.6, 2.3\text{ Hz}$, 1H, H-5), 7.05 (d, $J = 2.3\text{ Hz}$, 1H, H-3), 6.93 (d, $J = 8.6\text{ Hz}$, 1H, H-6), 5.40 (m, 1H, H-7a), 5.38 (d, $J = 2.3\text{ Hz}$, 1H, H-9a), 5.03 (m, 1H, H-7b), 4.99 (d, $J = 2.4\text{ Hz}$, 1H, H-9b), 2.25 (s, 3H, H-11).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 139.63.

cAzadC-monophosphate-Lock-In-CycloSal (72)

Das Nukleosidanaloga cAzadC (**21**, 60.0 mg, 266 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) wurde am Hochvakuum für 30 Minuten bei 50 °C getrocknet und anschließend unter Argonatmosphäre in trockenem DMF (2.66 mL) gelöst. Nach Zugabe von DIPEA (138 μL , 532 μmol , 2.0 $\text{\AA}q$) wurde bei -40 °C eine Lösung von **83** (108 mg, 398 μmol , 1.5 $\text{\AA}q$) in THF (1.34 mL) tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 3 Stunden gerührt. Anschließend wurde bei -20 °C *t*-BuOOH (5.5 M in Decan, 96.0 μL , 528 μmol , 2.0 $\text{\AA}q$) zugetropft, die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und für eine weitere Stunde gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silica Gel, DCM:MeOH = 19:1 \rightarrow 9:1 \rightarrow 4:1) aufgereinigt. Das vorgereinigte Produkt wurde darüber hinaus mittels *reversed-phase* HPLC (10% \rightarrow 25% MeCN in H₂O über 45 Minuten) aufgereinigt, die Diastereomere **72a** (1.90 mg, 3.97 μmol , 2.6%, t_R = 36.4 Minuten) und **72b** (1.27 mg, 2.65 μmol , 1.7%, t_R = 37.0 Minuten) separiert und als farblose Feststoffe erhalten.

¹H-NMR von **72a** (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm] = 7.96 (s, 1H, H-6), 7.52 – 7.46 (m, 1H, H-5''), 7.34 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-3''), 7.09 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 1H, H-6''), 5.88 (s, 2H, NH₂), 5.51 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-9a''), 5.49 – 5.35 (m, 2H, H-7''), 5.01 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-9b''), 4.65 (p, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-1'), 4.21 (ddd, *J* = 7.2, 5.6, 2.6 Hz, 2H, H-5'), 4.14 (dq, *J* = 8.9, 4.8 Hz, 1H, H-3'), 3.15 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, OH), 2.23 (s, 3H, H-11''), 2.15 – 2.08 (m, 3H, H-2a', H-4', H-6a'), 1.92 – 1.85 (m, 1H, H-2b'), 1.69 – 1.55 (m, 1H, H-6b').

¹³C-NMR von **72a** (101 MHz, MeCN-*d*₃) δ [ppm] = 169.73 (C-10''), 166.92 (C-2), 158.38 (C-6), 154.75 (C-4), 152.27 (C-8''), 150.38 (C-1''), 131.21 (C-4'), 126.72 (C-5''), 122.98 (d, *J* = 1.1 Hz, C-3''), 121.80 (d, *J* = 10.1 Hz, C-2''), 119.31 (d, *J* = 8.9 Hz, C-6''), 102.90 (C-9''), 72.08 (C-3'), 69.71 (d, *J* = 6.2 Hz, C-5'), 69.30 (d, *J* = 7.2 Hz, C-7'), 56.31 (C-1'), 47.92 (d, *J* = 6.6 Hz, C-4'), 38.91 (C-2'), 32.07 (C-6'), 20.70 (C-11'').

³¹P-NMR von **72a** (162 MHz, MeCN-*d*₃): δ [ppm] = -10.26.

¹H-NMR von **72b** (400 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, H-6), 7.51 (ddd, *J* = 8.6, 2.3, 1.3 Hz, 1H, H-5''), 7.40 (dd, *J* = 2.2, 1.1 Hz, 1H, H-3''), 7.12 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-6''), 5.57 – 5.43 (m, 3H, 2 × H-7'', H-9a''), 5.02 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-9b''), 4.70 (p, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-1'), 4.38 (ddd, *J* = 10.1, 6.4, 5.0 Hz, 1H, H-5a'), 4.27 – 4.17 (m, 2H, H-3', H-5b'), 2.30 – 2.17 (m, 6H, H-2a', H-4', H-6a', 3 × H-11''), 1.99 (ddd, *J* = 13.6, 8.9, 4.8 Hz, 1H, H-2b'), 1.84 – 1.73 (m, 1H, H-6b').

¹³C-NMR von **72b** (101 MHz, MeCN-d₃) δ [ppm] = 169.13 (C-10''), 166.36 (C-2), 157.75 (C-6), 154.12 (C-4), 151.75 (C-8''), 150.27 (d, *J* = 6.7 Hz, C-1''), 130.68 (C-4''), 126.19 (d, *J* = 1.6 Hz, C-5''), 122.41 (d, *J* = 1.1 Hz, C-3''), 121.32 (d, *J* = 10.1 Hz, C-2''), 118.72 (d, *J* = 8.9 Hz, C-6''), 102.29 (C-9''), 71.66 (C-3'), 69.39 (d, *J* = 6.1 Hz, C-5'), 68.71 (d, *J* = 7.1 Hz, C-7''), 55.69 (C-1'), 47.36 (d, *J* = 6.6 Hz, C-4'), 38.44 (C-2'), 31.66 (C-6'), 20.11 (C-11'').

³¹P-NMR von **72b** (162 MHz, MeCN-d₃): δ [ppm] = -10.23.

HRMS ((+)-ESI) von 72a: berechnet für C₂₀H₂₄N₄O₈P⁺: 479.1326 [M+H]⁺
gefunden: 479.1329 [M+H]⁺

HRMS ((+)-ESI) von 72b: berechnet für C₂₀H₂₄N₄O₈P⁺: 479.1326 [M+H]⁺
gefunden: 479.1328 [M+H]⁺

R_f = 0.31 (DCM:MeOH = 4:1).

7 Abkürzungsverzeichnis

ABZI	Amidobenzimidazol
Ac	Acetyl
ACK	Antikörper-CDN-Konjugat
ADC	Antibody-Drug-Conjugate
AGS	Aicardi-Goutières Syndrom
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
AML	akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Antigen-präsentierenden Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
AzaC	5-Azacytidin
AzadC	5-Aza-2'-deoxycytidin, Decitabin
bp	Basenpaar
BSA	Bis(trimethylsilyl)acetamid
BTT	5-(Benzylthio)-1 <i>H</i> -tetrazol
Bu	Butyl
Bz	Benzoyl
c	Konzentration
CAR	chimäre Antigenrezeptoren
cAzadC	Carbozyklisches 5-Aza-2'-deoxycytidin
CDN	Zyklisches Dinukleotid
CES	Carboxylesterase
cGAMP	Zyklisches Guanosin Monophosphat Adenosin Monophosphat
cGAS	Zyklisches GMP-AMP Synthase
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
CR	<i>complete remission</i>
CTD	C-terminale Domäne
CycloSal	Cyclosaligenyl
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>

DC	Dendritische Zelle
DC	Dünnschichtchromatographie
DCA	Dichloressigsäure
DCE	1,2-Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTT	Dithiothreitol
EC₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
EI	Elektronenionisation
ENPP1	Ectonukleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi Intermediate Compartment</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
IFN	Interferon
IKK	I κ B Kinase
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
ISG	Interferon-stimulierte Gene
ITC	Isothermale Totrationskalorimetrie

k_D	Dissoziationskonstante
KO	Knockout
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
M	Molekülmasse
mAb	monoklonaler Antikörper
mdC	5-Methyl-2'-Deoxycytidin
Me	Methyl
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MP	Monophosphat
MRP	<i>multidrug resistance protein</i>
MS	Massenspektrometrie
MSNT	1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol
MTM-Cl	Chlorodimethylsulfid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaAsc	Natriumascorbat
n_H	Hill-Koeffizient
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMP	Nukleosidmonophosphat
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
npeom	[(<i>RS</i>)-1-(2-nitrophenyl)ethoxy]methyl
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PC	Peak Cluster
PG	Schutzgruppe
POC	Isopropylloxycarbonyloxymethyl
POM	Pivaloyloxymethyl
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Pyr	Pyridin
RLU	Relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i>
SATE	S-Acyl-2-thioethyl
SAVI	<i>STING-associated vasculopathy with onset in infancy</i>

SLE	systemischer Lupus Erythematodes
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
Tf	Triflat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyranyl
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	<i>Tumour Necrosis Factor</i>
TMS	Trimethylsilyl
TP	Triphosphat
<i>t_R</i>	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
VIS	Sichtbares Licht
WT	Wildtyp

8 Literaturverzeichnis

- [1] S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, R. Medzhitov, *Cell* **2004**, *118*, 229-241.
- [2] R. Sender, S. Fuchs, R. Milo, *PLOS Biol.* **2016**, *14*, e1002533.
- [3] M. J. Wolin, T. L. Miller, D. Hentges, *Human intestinal microflora in health and disease* **1983**, 147-165.
- [4] D. D. Chaplin, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S3-S23.
- [5] R. Medzhitov, *Nature* **2007**, *449*, 819-826.
- [6] J. S. Marshall, R. Warrington, W. Watson, H. L. Kim, *Allergy Asthma Cl. Im.* **2018**, *14*, 49.
- [7] O. Takeuchi, S. Akira, *Cell* **2010**, *140*, 805-820.
- [8] M. Schlee, G. Hartmann, *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 566-580.
- [9] T. W. McDade, A. V. Georgiev, C. W. Kuzawa, *Evol. Med. Public Health* **2016**, *2016*, 1-16.
- [10] M. D. Cooper, M. N. Alder, *Cell* **2006**, *124*, 815-822.
- [11] Y. I. Miller, S.-H. Choi, P. Wiesner, L. Fang, R. Harkewicz, K. Hartvigsen, A. Boullier, A. Gonen, C. J. Diehl, X. Que, E. Montano, P. X. Shaw, S. Tsimikas, C. J. Binder, J. L. Witztum, S. Hazen, T. M. McIntyre, *Circ. Res.* **2011**, *108*, 235-248.
- [12] L. B. Tolle, T. J. Standiford, *J. Pathol.* **2013**, *229*, 145-156.
- [13] C. Venegas, M. T. Heneka, *J. Leukocyte Biol.* **2017**, *101*, 87-98.
- [14] D. Jiang, J. Liang, Y. Li, P. W. Noble, *Cell Res.* **2006**, *16*, 693-701.
- [15] M. Motwani, S. Pesiridis, K. A. Fitzgerald, *Nat. Rev. Genet.* **2019**.
- [16] A. Ablasser, Z. J. Chen, *Science* **2019**, 363.
- [17] A. Ablasser, M. Goldeck, T. Cavlar, T. Deimling, G. Witte, I. Röhl, K.-P. Hopfner, J. Ludwig, V. Hornung, *Nature* **2013**, *498*, 380-384.
- [18] X. Cai, Y.-H. Chiu, Zhijian J. Chen, *Mol. Cell* **2014**, *54*, 289-296.
- [19] A.-M. Herzner, C. A. Hagmann, M. Goldeck, S. Wolter, K. Kübler, S. Wittmann, T. Gramberg, L. Andreeva, K.-P. Hopfner, C. Mertens, T. Zillinger, T. Jin, T. S. Xiao, E. Bartok, C. Coch, D. Ackermann, V. Hornung, J. Ludwig, W. Barchet, G. Hartmann, M. Schlee, *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 1025-1033.
- [20] F. Civril, T. Deimling, C. C. de Oliveira Mann, A. Ablasser, M. Moldt, G. Witte, V. Hornung, K.-P. Hopfner, *Nature* **2013**, *498*, 332-337.
- [21] L. Andreeva, B. Hiller, D. Kostrewa, C. Lässig, C. C. de Oliveira Mann, D. Jan Drexler, A. Maiser, M. Gaidt, H. Leonhardt, V. Hornung, K.-P. Hopfner, *Nature* **2017**, *549*, 394.
- [22] J. Wu, L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen, Z. J. Chen, *Science (New York, N.Y.)* **2013**, *339*, 826-830.
- [23] X. Zhang, H. Shi, J. Wu, X. Zhang, L. Sun, C. Chen, Z. J. Chen, *Mol. Cell* **2013**, *51*, 226-235.
- [24] D. L. Burdette, K. M. Monroe, K. Sotelo-Troha, J. S. Iwig, B. Eckert, M. Hyodo, Y. Hayakawa, R. E. Vance, *Nature* **2011**, *478*, 515-518.
- [25] Bryan W. Davies, Ryan W. Bogard, Travis S. Young, John J. Mekalanos, *Cell* **2012**, *149*, 358-370.
- [26] H. Shi, J. Wu, Z. J. Chen, C. Chen, *P. Natl. A. Sci. India A.* **2015**, *112*, 8947.
- [27] J. Gao, J. Tao, W. Liang, Z. Jiang, *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *30*, 79-87.
- [28] S. L. Ergun, D. Fernandez, T. M. Weiss, L. Li, *Cell* **2019**, *178*, 290-301.e210.
- [29] A. J. Pollock, S. A. Zaver, J. J. Woodward, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3533.
- [30] X. Che, J. Zhang, H. Quan, L. Yang, Y. Q. Gao, *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 1862-1868.
- [31] W. Sun, Y. Li, L. Chen, H. Chen, F. You, X. Zhou, Y. Zhou, Z. Zhai, D. Chen, Z. Jiang, *P. Natl. A. Sci. India A.* **2009**, *106*, 8653-8658.
- [32] P. J. Kranzusch, S. C. Wilson, A. S. Lee, J. M. Berger, J. A. Doudna, R. E. Vance, *Mol. Cell* **2015**, *59*, 891-903.

- [33] G. Shang, C. Zhang, Z. J. Chen, X.-c. Bai, X. Zhang, *Nature* **2019**, *567*, 389-393.
- [34] K. P. Hopfner, V. Hornung, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**.
- [35] S. Liu, X. Cai, J. Wu, Q. Cong, X. Chen, T. Li, F. Du, J. Ren, Y.-T. Wu, V. Grishin Nick, J. Chen Zhijian, *Science* **2015**, *347*, aaa2630.
- [36] N. Dobbs, N. Burnaevskiy, D. Chen, V. K. Gonugunta, N. M. Alto, N. Yan, *Cell Host Microbe* **2015**, *18*, 157-168.
- [37] K. Mukai, H. Konno, T. Akiba, T. Uemura, S. Waguri, T. Kobayashi, G. N. Barber, H. Arai, T. Taguchi, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1-10.
- [38] S. M. Haag, M. F. Gulen, L. Reymond, A. Gibelin, L. Abrami, A. Decout, M. Heymann, F. G. V. Goot, G. Turcatti, R. Behrendt, A. Ablasser, *Nature* **2018**, *559*, 269-273.
- [39] C. Zhang, G. Shang, X. Gui, X. Zhang, X.-c. Bai, Z. J. Chen, *Nature* **2019**, *567*, 394-398.
- [40] D. B. Stetson, R. Medzhitov, *Immunity* **2006**, *24*, 93-103.
- [41] K. J. Ishii, C. Coban, H. Kato, K. Takahashi, Y. Torii, F. Takeshita, H. Ludwig, G. Sutter, K. Suzuki, H. Hemmi, *Nat. Immunol.* **2006**, *7*, 40-48.
- [42] R. Fang, C. Wang, Q. Jiang, M. Lv, P. Gao, X. Yu, P. Mu, R. Zhang, S. Bi, J.-M. Feng, Z. Jiang, *J. Immunol.* **2017**, *199*, 3222.
- [43] A. Ablasser, J. L. Schmid-Burgk, I. Hemmerling, G. L. Horvath, T. Schmidt, E. Latz, V. Hornung, *Nature* **2013**, *503*, 530.
- [44] A. Bridgeman, J. Maelfait, T. Davenne, T. Partridge, Y. Peng, A. Mayer, T. Dong, V. Kaeffer, P. Borrow, J. Rehwinkel, *Science* **2015**, *349*, 1228-1232.
- [45] J.-j. Wu, W. Li, Y. Shao, D. Avey, B. Fu, J. Gillen, T. Hand, S. Ma, X. Liu, W. Miley, A. Konrad, F. Neipel, M. Stürzl, D. Whitby, H. Li, F. Zhu, *Cell Host Microbe* **2015**, *18*, 333-344.
- [46] G. Zhang, B. Chan, N. Samarina, B. Abere, M. Weidner-Glunde, A. Buch, A. Pich, M. M. Brinkmann, T. F. Schulz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2016**, *113*, E1034-E1043.
- [47] S. A. Zaver, J. J. Woodward, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2020**, *63*, 49-56.
- [48] J. B. Eaglesham, Y. Pan, T. S. Kupper, P. J. Kranzusch, *Nature* **2019**, *566*, 259-263.
- [49] L. Li, Q. Yin, P. Kuss, Z. Maliga, J. L. Millán, H. Wu, T. J. Mitchison, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1043-1048.
- [50] K. Kato, H. Nishimasu, D. Oikawa, S. Hirano, H. Hirano, G. Kasuya, R. Ishitani, F. Tokunaga, O. Nureki, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4424.
- [51] F. Rao, R. Y. See, D. Zhang, D. C. Toh, Q. Ji, Z.-X. Liang, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 473-482.
- [52] Y. Bai, J. Yang, L. E. Eisele, A. J. Underwood, B. J. Koestler, C. M. Waters, D. W. Metzger, G. Bai, *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 5123-5132.
- [53] J. Gao, J. Tao, W. Liang, M. Zhao, X. Du, S. Cui, H. Duan, B. Kan, X. Su, Z. Jiang, *Cell Res.* **2015**, *25*, 539-550.
- [54] T. N. Huynh, S. Luo, D. Pensinger, J.-D. Sauer, L. Tong, J. J. Woodward, *P. Natl. A. Sci. India A.* **2015**, *112*, E747.
- [55] M.-j. Deng, J. Tao, C. E. Z.-y. Ye, Z. Jiang, J. Yu, X.-d. Su, *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 5080-5093.
- [56] I. K. Onyedibe, M. Wang, O. H. Sintim, *Molecules* **2019**, *24*.
- [57] H. T. Pham, N. T. H. Nhiep, T. N. M. Vu, T. N. Huynh, Y. Zhu, A. L. D. Huynh, A. Chakrabortti, E. Marcellin, R. Lo, C. B. Howard, N. Bansal, J. J. Woodward, Z.-X. Liang, M. S. Turner, *PLOS Genet.* **2018**, *14*, e1007574.
- [58] C. Ritchie, A. F. Cordova, G. T. Hess, M. C. Bassik, L. Li, *Mol. Cell* **2019**.
- [59] R. D. Luteijn, S. A. Zaver, B. G. Gowen, S. K. Wyman, N. E. Garelis, L. Onia, S. M. McWhirter, G. E. Katibah, J. E. Corn, J. J. Woodward, D. H. Raulet, *Nature* **2019**, *573*, 434-438.
- [60] J. A. Carozza, V. Böhnert, K. C. Nguyen, G. Skariah, K. E. Shaw, J. A. Brown, M. Rafat, R. von Eyben, E. E. Graves, J. S. Glenn, M. Smith, L. Li, *BioRxiv* **2019**, 539312.
- [61] A. Bhatia, Y. Kumar, *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2014**, *10*, 41-62.
- [62] S. Farkona, E. P. Diamandis, I. M. Blasutig, *BMC Med.* **2016**, *14*, 73.
- [63] G. Trinchieri, *F1000 Med. Rep.* **2011**, *3*, 11-11.
- [64] K. J. O'Byrne, A. G. Dalgleish, *Brit. J. Cancer* **2001**, *85*, 473-483.
- [65] A. Korniluk, O. Koper, H. Kemon, V. Dymicka-Piekarska, *Irish J. Med. Sci.* **2017**, *186*, 57-62.

- [66] F. Colotta, P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, A. Mantovani, *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 1073-1081.
- [67] M. G. Borrello, D. Degl'Innocenti, M. A. Pierotti, *Cancer Lett.* **2008**, *267*, 262-270.
- [68] K. Esfahani, L. Roudaia, N. Buhlaiga, S. V. Del Rincon, N. Papneja, W. H. Miller, *Curr. Oncol.* **2020**, *27*, 87-97.
- [69] T. N. Schumacher, R. D. Schreiber, *Science* **2015**, *348*, 69-74.
- [70] M. Yarchoan, B. A. Johnson, E. R. Lutz, D. A. Laheru, E. M. Jaffee, *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 209-222.
- [71] J. L. Adams, J. Smothers, R. Srinivasan, A. Hoos, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 603-622.
- [72] J. G. Egen, W. Ouyang, L. C. Wu, *Immunity* **2020**, *52*, 36-54.
- [73] D. Lobenwein, F. Kocher, S. Dobner, C. Gollmann-Tepeköylü, J. Holfeld, *Int. J. Cardiol.* **2021**, *323*, 179-187.
- [74] L. M. Weiner, R. Surana, S. Wang, *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 317-327.
- [75] I. Kimiz-Gebologlu, S. Gulce-Iz, C. Biray-Avci, *Mol. Biol. Rep.* **2018**, *45*, 2935-2940.
- [76] P. Polakis, *Pharmacol. Rev.* **2016**, *68*, 3.
- [77] A. Thomas, B. A. Teicher, R. Hassan, *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, e254-e262.
- [78] P. Khongorzul, C. J. Ling, F. U. Khan, A. U. Ihsan, J. Zhang, *Mol. Cancer Res.* **2020**, *18*, 3.
- [79] K. Tsuchikama, Z. An, *Protein Cell* **2018**, *9*, 33-46.
- [80] A. Ribas, J. D. Wolchok, *Science (New York, N.Y.)* **2018**, *359*, 1350-1355.
- [81] D. M. Sansom, *Immunology* **2000**, *101*, 169-177.
- [82] D. M. Pardoll, S. L. Topalian, *Curr. Opin. Immunol.* **1998**, *10*, 588-594.
- [83] D. R. Leach, M. F. Krummel, J. P. Allison, *Science* **1996**, *271*, 1734-1736.
- [84] P. S. Linsley, W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle, J. A. Ledbetter, *J. Exp. Med.* **1991**, *174*, 561-569.
- [85] G. Q. Phan, J. C. Yang, R. M. Sherry, P. Hwu, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, N. P. Restifo, L. R. Haworth, C. A. Seipp, L. J. Freezer, *P. Natl. A. Sci. India A.* **2003**, *100*, 8372-8377.
- [86] P. Sharma, J. P. Allison, *Cell* **2015**, *161*, 205-214.
- [87] F. S. Hodi, S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, *New Eng. J. Med.* **2010**, *363*, 711-723.
- [88] C. Robert, L. Thomas, I. Bondarenko, S. O'Day, J. Weber, C. Garbe, C. Lebbe, J.-F. Baurain, A. Testori, J.-J. Grob, *New Eng. J. Med.* **2011**, *364*, 2517-2526.
- [89] P. Waterhouse, J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Griesser, T. W. Mak, *Science* **1995**, *270*, 985-988.
- [90] Y. Ishida, Y. Agata, K. Shibahara, T. Honjo, *EMBO J.* **1992**, *11*, 3887-3895.
- [91] M. E. Keir, M. J. Butte, G. J. Freeman, A. H. Sharpe, *Annu. Rev. Immunol.* **2008**, *26*, 677-704.
- [92] T. Okazaki, S. Chikuma, Y. Iwai, S. Fagarasan, T. Honjo, *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1212-1218.
- [93] I. Mellman, G. Coukos, G. Dranoff, *Nature* **2011**, *480*, 480-489.
- [94] D. S. Chen, I. Mellman, *Immunity* **2013**, *39*, 1-10.
- [95] S. L. Topalian, M. Sznol, D. F. McDermott, H. M. Kluger, R. D. Carvajal, W. H. Sharfman, J. R. Brahmer, D. P. Lawrence, M. B. Atkins, J. D. Powderly, *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 1020.
- [96] I. Melero, D. M. Berman, M. A. Aznar, A. J. Korman, J. L. P. Gracia, J. Haanen, *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 457-472.
- [97] Y. Iwai, J. Hamanishi, K. Chamoto, T. Honjo, *J. Biomed. Sci.* **2017**, *24*, 1-11.
- [98] R. Mohanty, C. R. Chowdhury, S. Arega, P. Sen, P. Ganguly, N. Ganguly, *Oncol. Rep.* **2019**, *42*, 2183-2195.
- [99] A. N. Miliotou, L. C. Papadopoulou, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2018**, *19*, 5-18.
- [100] A. E. Hay, M. C. Cheung, Taylor & Francis, **2019**.
- [101] S. Silbert, G. A. Yanik, A. G. Shuman, *AMA J. Ethics* **2019**, *21*, 844-851.
- [102] H. Weinmann, *ChemMedChem* **2016**, *11*, 450-466.
- [103] W. G. Kerr, J. D. Chisholm, *J. Immunol.* **2019**, *202*, 11-19.
- [104] S.-W. Huang, S.-H. Chang, S.-W. Mu, H.-Y. Jiang, S.-T. Wang, J.-K. Kao, J.-L. Huang, C.-Y. Wu, Y.-J. Chen, J.-J. Shieh, *J. Dermatol. Sci.* **2016**, *81*, 182-191.

- [105] Q. Yang, P. Modi, T. Newcomb, C. Quéva, V. Gandhi, *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 1537-1542.
- [106] D. H. Dockrell, G. R. Kinghorn, *J. Antimicrob. Chemoth.* **2001**, *48*, 751-755.
- [107] M. Motwani, J. McGowan, J. Antonovitch, K. M. Gao, Z. Jiang, S. Sharma, G. A. Baltus, K. M. Nickerson, A. Marshak-Rothstein, K. A. Fitzgerald, *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 689.
- [108] J. Wang, M. Dai, Y. Cui, G. Hou, J. Deng, X. Gao, Z. Liao, Y. Liu, Y. Meng, L. Wu, *Arthritis Rheum.* **2018**, *70*, 2036-2045.
- [109] V. Kumar, *J. Leukocyte Biol.* **2019**, *106*, 171-185.
- [110] D. Chandra, W. Quispe-Tintaya, A. Jahangir, D. Asafu-Adjei, I. Ramos, H. O. Sintim, J. Zhou, Y. Hayakawa, D. K. Karaolis, C. Gravekamp, *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 901-910.
- [111] H. Zhang, Q.-D. You, X.-L. Xu, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 3785-3816.
- [112] T. Li, Z. J. Chen, *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 1287-1299.
- [113] L. Ching, Z. Cao, C. Kieda, S. Zwain, M. Jameson, B. Baguley, *Brit. J. Cancer* **2002**, *86*, 1937-1942.
- [114] D. Prantner, D. J. Perkins, W. Lai, M. S. Williams, S. Sharma, K. A. Fitzgerald, S. N. Vogel, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 39776-39788.
- [115] A. Daei Farshchi Adli, R. Jahanban-Esfahlan, K. Seidi, S. Samandari-Rad, N. Zarghami, *Chem. Biol. Drug Des.* **2018**, *91*, 996-1006.
- [116] G. Yi, V. P. Brendel, C. Shu, P. Li, S. Palanathan, C. Cheng Kao, *PLOS ONE* **2013**, *8*, e77846.
- [117] J. Conlon, D. L. Burdette, S. Sharma, N. Bhat, M. Thompson, Z. Jiang, V. A. Rathinam, B. Monks, T. Jin, T. S. Xiao, *J. Immunol.* **2013**, *190*, 5216-5225.
- [118] Y. Zhang, Z. Sun, J. Pei, Q. Luo, X. Zeng, Q. Li, Z. Yang, J. Quan, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2057-2064.
- [119] J. M. Ramanjulu, G. S. Pesiridis, J. Yang, N. Concha, R. Singhaus, S.-Y. Zhang, J.-L. Tran, P. Moore, S. Lehmann, H. C. Eberl, M. Muelbauer, J. L. Schneck, J. Clemens, M. Adam, J. Mehlmann, J. Romano, A. Morales, J. Kang, L. Leister, T. L. Graybill, A. K. Charnley, G. Ye, N. Nevins, K. Behnia, A. I. Wolf, V. Kasparcova, K. Nurse, L. Wang, A. C. Puhl, Y. Li, M. Klein, C. B. Hopson, J. Guss, M. Bantscheff, G. Bergamini, M. A. Reilly, Y. Lian, K. J. Duffy, J. Adams, K. P. Foley, P. J. Gough, R. W. Marquis, J. Smothers, A. Hoos, J. Bertin, *Nature* **2018**, *564*, 439-443.
- [120] R. R. Neubig, M. Spedding, T. Kenakin, A. Christopoulos, *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 597-606.
- [121] L. Corrales, Laura H. Glickman, Sarah M. McWhirter, David B. Kanne, Kelsey E. Sivick, George E. Katibah, S.-R. Woo, E. Lemmens, T. Banda, Justin J. Leong, K. Metchette, Thomas W. Dubensky, Thomas F. Gajewski, *Cell Rep.* **2015**, *11*, 1018-1030.
- [122] K. E. Sivick, A. L. Desbien, L. H. Glickman, G. L. Reiner, L. Corrales, N. H. Surh, T. E. Hudson, U. T. Vu, B. J. Francica, T. Banda, *Cell Rep.* **2018**, *25*, 3074-3085. e3075.
- [123] J. Fu, D. B. Kanne, M. Leong, L. H. Glickman, S. M. McWhirter, E. Lemmens, K. Metchette, J. J. Leong, P. Lauer, W. Liu, *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 283ra252-283ra252.
- [124] B. J. Francica, A. Ghasemzadeh, A. L. Desbien, D. Theodros, K. E. Sivick, G. L. Reiner, L. H. Glickman, A. E. Marciscano, A. B. Sharabi, M. L. Leong, *Cancer Immunol. Res.* **2018**, *6*, 422-433.
- [125] L. Corrales, S. M. McWhirter, T. W. Dubensky, T. F. Gajewski, *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 2404-2411.
- [126] F. Meric-Bernstam, S. K. Sandhu, O. Hamid, A. Spreafico, S. Kasper, R. Dummer, T. Shimizu, N. Steeghs, N. Lewis, C. C. Talluto, *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 2507-2507.
- [127] I. Melero, E. Castanon, M. Alvarez, S. Champiat, A. Marabelle, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2021**, *18*, 558-576.
- [128] H. Gogoi, S. Mansouri, L. Jin, *Nato. Adv. Sci. Inst. Se.* **2020**, *8*, 453.
- [129] D. S. Kim, A. Endo, F. G. Fang, K. C. Huang, X. Bao, H. w. Choi, U. Majumder, Y. Y. Shen, S. Mathieu, X. Zhu, *ChemMedChem* **2021**.
- [130] C. R. Dialer, S. Stazzoni, D. J. Drexler, F. M. Müller, S. Veth, A. Pichler, H. Okamura, G. Witte, K.-P. Hopfner, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2018**, 2089-2095.
- [131] V. Schirmacher, *Int. J. Oncol.* **2019**, *54*, 407-419.
- [132] J. N. Saultz, R. Garzon, *J. Clin. Med.* **2016**, *5*, 33.

- [133] G. Juliusson, R. Hough, *Prog. Tumor Res.* **2016**, *43*, 87-100.
- [134] C. Smith, *Cancer control* **2003**, *10*, 9-16.
- [135] K. S. Siveen, S. Uddin, R. M. Mohammad, *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 1-12.
- [136] R. D. Brunning, *Semin. Diagn. Pathol.* **2003**, *20*, 142-153.
- [137] I. De Kouchkovsky, M. Abdul-Hay, *Blood Cancer J.* **2016**, *6*, e441.
- [138] A. Khwaja, M. Bjorkholm, R. E. Gale, R. L. Levine, C. T. Jordan, G. Ehninger, C. D. Bloomfield, E. Estey, A. Burnett, J. J. Cornelissen, D. A. Scheinberg, D. Bouscary, D. C. Linch, *Nat. Rev. Dis. Primers* **2016**, *2*, 1-22.
- [139] E. S. Wang, *Hematology* **2014**, *2014*, 14-20.
- [140] H. Döhner, D. J. Weisdorf, C. D. Bloomfield, *New Eng. J. Med.* **2015**, *373*, 1136-1152.
- [141] B. Löwenberg, G. J. Ossenkoppele, W. van Putten, H. C. Schouten, C. Graux, A. Ferrant, P. Sonneveld, J. Maertens, M. Jongen-Lavrencic, M. von Lilienfeld-Toal, *New Eng. J. Med.* **2009**, *361*, 1235-1248.
- [142] H. F. Fernandez, Z. Sun, X. Yao, M. R. Litzow, S. M. Luger, E. M. Paietta, J. Racevskis, G. W. Dewald, R. P. Ketterling, J. M. Bennett, *New Eng. J. Med.* **2009**, *361*, 1249-1259.
- [143] S. Jaramillo, R. F. Schlenk, *Curr. Oncol. Rep.* **2021**, *23*, 109.
- [144] R. F. Schlenk, S. Jaramillo, C. Müller-Tidow, in *Seminars in hematology*, Vol. 56, Elsevier, **2019**, pp. 96-101.
- [145] R. M. Stone, *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 2067-2069.
- [146] G. Juliusson, P. Antunovic, Å. Derolf, S. Lehmann, L. Möllgård, D. Stockelberg, U. Tidefelt, A. Wahlin, M. Höglund, *Blood* **2009**, *113*, 4179-4187.
- [147] J. K. Christman, *Oncogene* **2002**, *21*, 5483 – 5495.
- [148] C. Stresemann, F. Lyko, *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 8-13.
- [149] M. A. Gama-Sosa, V. A. Slagel, R. W. Trewyn, R. Oxenhandler, K. C. Kuo, C. W. Gehrke, M. Ehrlich, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 6883-6894.
- [150] J.-N. Lapeyre, M. S. Walker, F. F. Becker, *Carcinogenesis* **1981**, *2*, 873-878.
- [151] J. Issa, P. M. Vertino, C. D. Boehm, I. F. Newsham, S. B. Baylin, *P. Natl. A. Sci. India A.* **1996**, *93*, 11757-11762.
- [152] S. B. Baylln, J. G. Herman, J. R. Graff, P. M. Vertino, J.-P. Issa, *Adv. Cancer Res.* **1997**, *72*, 141-196.
- [153] V. Santini, H. M. Kantarjian, J.-P. Issa, *Ann. Intern. Med.* **2001**, *134*, 573-586.
- [154] C. Gardin, H. Dombret, *Curr. Hematol. Malig. R.* **2017**, *12*, 1-10.
- [155] A. S. Alva, N. M. Hahn, A. M. Aparicio, R. Singal, S. Yellapragada, G. Sonpavde, *Future Oncol.* **2011**, *7*, 447-463.
- [156] J. Diesch, A. Zwick, A. K. Garz, A. Palau, M. Buschbeck, K. S. Gotze, *Clin. Epigenetics* **2016**, *8*, 71.
- [157] R. L. Momparler, in *Seminars in hematology*, Vol. 42, Elsevier, **2005**, pp. S9-S16.
- [158] J. Jasielc, V. Saloura, L. Godley, *Leukemia* **2014**, *28*, 1765-1773.
- [159] R. Jüttermann, E. Li, R. Jaenisch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1994**, *91*, 11797-11801.
- [160] L. Schermelleh, F. Spada, H. P. Easwaran, K. Zolghadr, J. B. Margot, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 751-756.
- [161] M. Duchmann, R. Itzykson, *Int. J. Hematol.* **2019**, *110*, 161-169.
- [162] P. Malik, A. F. Cashen, *Cancer Manag. Res.* **2014**, *6*, 53-61.
- [163] P. F. He, J. D. Zhou, D. M. Yao, J. C. Ma, X. M. Wen, Z. H. Zhang, X. Y. Lian, Z. J. Xu, J. Qian, J. Lin, *Oncotarget* **2017**, *8*, 41498-41507.
- [164] P. J. Carey, *Drug Safety* **2003**, *26*, 691-706.
- [165] D. K. Rogstad, J. L. Herring, J. A. Theruvathu, A. Burdzy, C. C. Perry, J. W. Neidigh, L. C. Sowers, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1194-1204.
- [166] K. T. Lin, R. L. Momparler, G. E. Rivard, *J. Pharm. Sci.* **1981**, *70*, 1228-1232.
- [167] D. C. Chatterji, J. F. Gallelli, *J. Pharm. Sci.* **1979**, *68*, 822-826.
- [168] K. K. Chan, D. D. Giannini, J. A. Staroscik, W. Sadee, *J. Pharm. Sci.* **1979**, *68*, 807-812.

- [169] H. M. Kantarjian, X. G. Thomas, A. Dmoszynska, A. Wierzbowska, G. Mazur, J. Mayer, J.-P. Gau, W.-C. Chou, R. Buckstein, J. Cermak, *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 2670.
- [170] H. Dombret, J. F. Seymour, A. Butrym, A. Wierzbowska, D. Selleslag, J. H. Jang, R. Kumar, J. Cavenagh, A. C. Schuh, A. Candoni, *Blood* **2015**, *126*, 291-299.
- [171] T. M. Wildenhof, S. Schiffers, F. R. Traube, P. Mayer, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2019**, *131*, 13118-13121.
- [172] A. S. Ray, K. Y. Hostetler, *Antivir. Res.* **2011**, *92*, 277-291.
- [173] D. R. Bobeck, R. F. Schinazi, S. J. Coats, *Antivir. Ther.* **2010**, *15*, 935-950.
- [174] U. Pradere, E. C. Garnier-Amblard, S. J. Coats, F. Amblard, R. F. Schinazi, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154-9218.
- [175] M. E. Ariza, *Drug Des. Rev.* **2005**, *2*, 373-387.
- [176] J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen, J. Savolainen, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255-270.
- [177] J. Rautio, N. A. Meanwell, L. Di, M. J. Hageman, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 559-587.
- [178] A. M. Lam, E. Murakami, C. Espiritu, H. M. Steuer, C. Niu, M. Keilman, H. Bao, V. Zennou, N. Bourne, J. G. Julander, J. D. Morrey, D. F. Smee, D. N. Frick, J. A. Heck, P. Wang, D. Nagarathnam, B. S. Ross, M. J. Sofia, M. J. Otto, P. A. Furman, *Antimicrob. Agents Ch.* **2010**, *54*, 3187-3196.
- [179] B. B. Summers, J. W. F. Beavers, O. M. Klibanov, *J. Pharm. Sci.* **2014**, *66*, 1653-1666.
- [180] R. N. Hunston, A. S. Jones, C. McGuigan, R. T. Walker, J. Balzarini, E. De Clercq, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 440-444.
- [181] B. Colin, N. Jones, M. Christopher, P. A. Riley, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 7195-7201.
- [182] Y. Mehellou, J. Balzarini, C. McGuigan, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1779-1791.
- [183] L. J. Scott, H. L. Chan, *Drugs* **2017**, *77*, 1017-1028.
- [184] E. P. Tchesnokov, J. Y. Feng, D. P. Porter, M. Götte, *Viruses* **2019**, *11*, 326.
- [185] J. H. Beigel, K. M. Tomashek, L. E. Dodd, A. K. Mehta, B. S. Zingman, A. C. Kalil, E. Hohmann, H. Y. Chu, A. Luetkemeyer, S. Kline, *New Eng. J. Med.* **2020**, *383*, 1813-1826.
- [186] J. Pardo, A. M. Shukla, G. Chamarthi, A. Gupte, *Drugs Context* **2020**, *9*.
- [187] M. E. Ohl, D. R. Miller, B. C. Lund, T. Kobayashi, K. Richardson Miell, B. F. Beck, B. Alexander, K. Crothers, M. S. Vaughan Sarrazin, *JAMA Netw.* **2021**, *4*, e2114741-e2114741.
- [188] M. G. Santoro, E. Carafoli, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2021**, *538*, 145-150.
- [189] C. Meier, J. Balzarini, *Antivir. Res.* **2006**, *71*, 282-292.
- [190] C. Meier, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *5*, 1081.
- [191] M. J. Sofia, D. Bao, W. Chang, J. Du, D. Nagarathnam, S. Rachakonda, P. G. Reddy, B. S. Ross, P. Wang, H.-R. Zhang, S. Bansal, C. Espiritu, M. Keilman, A. M. Lam, H. M. M. Steuer, C. Niu, M. J. Otto, P. A. Furman, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7202-7218.
- [192] C. A. Roman, J. Balzarini, C. Meier, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7675-7681.
- [193] C. A. Román, P. Wasserthal, J. Balzarini, C. Meier, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 4899-4909.
- [194] E. H. Rios Morales, J. Balzarini, C. Meier, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1649-1659.
- [195] E. H. Rios Morales, J. Balzarini, C. Meier, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7245-7252.
- [196] P. Poijarvi-Virta, H. Lonnberg, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 3441-3465.
- [197] S. A. Kirby, C. S. Dowd, *Med. Chem. Res.* **2021**.
- [198] S. Peyrottes, D. Egron, I. Lefebvre, G. Gosselin, J. L. Imbach, C. Perigaud, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 395-408.
- [199] C. Schultz, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 885-898.
- [200] Y.-h. Koh, J. H. Shim, J. Z. Wu, W. Zhong, Z. Hong, J.-L. Girardet, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2867-2875.
- [201] M. Pimková Polidarová, P. Břehová, M. M. Kaiser, M. Smola, M. Dračínský, J. Smith, A. Marek, M. Dejmek, M. Šála, O. Gutten, L. Rulíšek, B. Novotná, A. Brázdová, Z. Janeba, R. Nencka, E. Boura, O. Páv, G. Birkuš, *J. Med. Chem.* **2021**.
- [202] D. H. Jornada, G. F. dos Santos Fernandes, D. E. Chiba, T. R. F. De Melo, J. L. Dos Santos, M. C. Chung, *Molecules* **2016**, *21*, 42.

- [203] V. J. Stella, K. W. Nti-Addae, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2007**, *59*, 677-694.
- [204] A. Najjar, R. Karaman, *Expert Opin. Drug Del.* **2019**, *16*, 1-5.
- [205] H. Sinokrot, T. Smerat, A. Najjar, R. Karaman, *Molecules* **2017**, *22*.
- [206] V. Abet, F. Filace, J. Recio, J. Alvarez-Builla, C. Burgos, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 810-827.
- [207] M. D. Erion, K. R. Reddy, S. H. Boyer, M. C. Matelich, J. Gomez-Galeno, R. H. Lemus, B. G. Ugarkar, T. J. Colby, J. Schanzer, P. D. Van Poelje, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5154-5163.
- [208] M. D. Erion, P. D. Van Poelje, D. A. MacKenna, T. J. Colby, A. C. Montag, J. M. Fujitaki, D. L. Linemeyer, D. A. Bullough, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 554-560.
- [209] B. M. Vickerman, E. M. Zywoot, T. K. Tarrant, D. S. Lawrence, *Nat. Rev. Chem.* **2021**, *5*, 816-834.
- [210] K. Hüll, J. Morstein, D. Trauner, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 10710-10747.
- [211] D. D. Young, A. Deiters, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 999-1005.
- [212] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119-191.
- [213] C. A. Lipinski, *J. Pharmacol. Tox. Met.* **2000**, *44*, 235-249.
- [214] S. Stazzoni, PhD thesis, Design and Synthesis of Clickable Nucleic Acid Analogues for Cancer Therapy and Diagnosis, LMU München, Fakultät für Chemie und Pharmazie **2020**.
- [215] J.-D. Sauer, K. Sotelo-Troha, J. von Moltke, M. Monroe Kathryn, S. Rae Chris, W. Brubaker Sky, M. Hyodo, Y. Hayakawa, J. Woodward Joshua, A. Portnoy Daniel, E. Vance Russell, J. L. Flynn, *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 688-694.
- [216] Z.-H. Wang, C.-C. Zhao, Q.-Z. Zhang, C.-L. Wang, H. Zhang, D.-J. Ma, D.-W. Wang, X. Wen, L.-Y. Li, Z. Xi, *Sci. China Chem.* **2020**, *63*, 534-545.
- [217] B. Novotná, L. Vaneková, M. Zavřel, M. Buděšínský, M. Dejmek, M. Smola, O. Gutten, Z. A. Tehrani, M. Pimková Polidarová, A. Brázdová, R. Liboska, I. Štěpánek, Z. Vavřina, T. Jandušík, R. Nencka, L. Rulíšek, E. Bouřa, J. Brynda, O. Páv, G. Birkuš, *J. Med. Chem.* **2019**.
- [218] R. T. Pon, N. Usman, M. J. Damha, K. K. Ogilvie, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 6453-6470.
- [219] L. Jud, R. Micura, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 3406-3413.
- [220] J. Moravcová, J. Čapková, J. Staněk, *Carbohydr. Res.* **1994**, *263*, 61-66.
- [221] D. Wang, L. Zou, Q. Jin, J. Hou, G. Ge, L. Yang, *Acta Pharm. Sinic.* **2018**, *8*, 699-712.
- [222] T. Imai, *Drug Metab. Pharmacok.* **2006**, *21*, 173-185.
- [223] M. Hosokawa, *Molecules* **2008**, *13*.
- [224] M. Brinkley, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 2-13.
- [225] W. W. Cleland, *Biochemistry* **1964**, *3*, 480-482.
- [226] J. R. Junutula, H. Raab, S. Clark, S. Bhakta, D. D. Leipold, S. Weir, Y. Chen, M. Simpson, S. P. Tsai, M. S. Dennis, Y. Lu, Y. G. Meng, C. Ng, J. Yang, C. C. Lee, E. Duenas, J. Gorrell, V. Katta, A. Kim, K. McDorman, K. Flagella, R. Venook, S. Ross, S. D. Spencer, W. Lee Wong, H. B. Lowman, R. Vandlen, M. X. Sliwkowski, R. H. Scheller, P. Polakis, W. Mallet, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 925-932.
- [227] L. Wang, G. Amphlett, W. A. Blättler, J. M. Lambert, W. Zhang, *Protein Sci.* **2005**, *14*, 2436-2446.
- [228] R. Dere, J.-H. Yi, C. Lei, O. M. Saad, C. Huang, Y. Li, J. Baudys, S. Kaur, *Bioanalysis* **2013**, *5*, 1025-1040.
- [229] S. K. Choi, M. Verma, J. Silpe, R. E. Moody, K. Tang, J. J. Hanson, J. R. Baker, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1281-1290.
- [230] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929-1935.
- [231] M. P. Hay, W. R. Wilson, W. A. Denny, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3417-3422.
- [232] M. S. Kim, S. L. Diamond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4007-4010.
- [233] M. E. Schwartz, R. R. Breaker, G. T. Asteriadis, J. S. deBear, G. R. Gough, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1019-1024.
- [234] A. Stutz, C. Höbartner, S. Pitsch, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2477-2503.
- [235] S. Pitsch, *CHIMIA Int. J. Chem.* **2001**, *55*, 320-324.
- [236] T. H. Fife, *Accounts Chem. Res.* **1972**, *5*, 264-272.

- [237] Y. V. Il'ichev, J. Wirz, *J. Phys. Chem.* **2000**, *104*, 7856-7870.
- [238] T. A. Steitz, W. N. Lipscomb, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2488-2489.
- [239] M. G. Newton, J. R. Cox, J. A. Bertrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1503-1506.
- [240] N. Campins, P. Dieudonné, M. W. Grinstaff, P. Barthélémy, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1928-1934.
- [241] A. C. Allan, J. L. Ward, M. H. Beale, A. J. Trewavas, in *Methods in Enzymology, Vol. 291*, Academic Press, **1998**, pp. 474-483.
- [242] W. Lin, D. Peng, B. Wang, L. Long, C. Guo, J. Yuan, WILEY-VCH Verlag Weinheim, **2008**.
- [243] G. M. Dubowchik, R. A. Firestone, L. Padilla, D. Willner, S. J. Hofstead, K. Mosure, J. O. Knipe, S. J. Lasch, P. A. Trail, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 855-869.
- [244] B. M. Domínguez, P. M. Cullis, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5783-5786.
- [245] P. J. Thornton, H. Kadri, A. Miccoli, Y. Mehellou, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10400-10410.
- [246] M. S. Davey, R. Malde, R. C. Mykura, A. T. Baker, T. E. Taher, C. S. Le Duff, B. E. Willcox, Y. Mehellou, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 2111-2117.
- [247] M. Uchiyama, Y. Aso, R. Noyori, Y. Hayakawa, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 373-379.
- [248] C. McGuigan, M. R. Kelleher, P. Perrone, S. Mulready, G. Luoni, F. Daverio, S. Rajyaguru, S. L. Pogam, I. Najera, J. A. Martin, K. Klumpp, D. B. Smith, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4250-4254.
- [249] R. Rondla, S. J. Coats, T. R. McBrayer, J. Grier, M. Johns, P. M. Tharnish, T. Whitaker, L. Zhou, R. F. Schinazi, *Antivir. Chem. Chemoth.* **2009**, *20*, 99-106.
- [250] J. Balzarini, O. Wedgwood, J. Kruining, H. Pelemans, R. Heijntink, E. D. Clercq, C. McGuigan, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1996**, *225*, 363-369.
- [251] B. Simmons, Z. Liu, A. Klapars, A. Bellomo, S. M. Silverman, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2218-2221.
- [252] C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417-1427.
- [253] C. Meier, E. De Clercq, J. Balzarini, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998*, 837-846.
- [254] W. F. Boron, *Adv. Physiol. Educ.* **2004**, *28*, 160-179.
- [255] K. A. White, B. K. Grillo-Hill, D. L. Barber, *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 663-669.
- [256] N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6752-6760.
- [257] N. Gisch, F. Pertenbreiter, J. Balzarini, C. Meier, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 8115-8123.
- [258] S. Schiffers, T. M. Wildenhof, K. Iwan, M. Stadlmeier, M. Müller, T. Carell, *Helv. Chim. Acta* **2019**, *102*, e1800229.
- [259] E. C. Costa, A. F. Moreira, D. de Melo-Diogo, V. M. Gaspar, M. P. Carvalho, I. J. Correia, *Biotech. Adv.* **2016**, *34*, 1427-1441.
- [260] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock, L. Yang, *Assay Drug Dev. Technol.* **2014**, *12*, 207-218.
- [261] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [262] I. Zlatev, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3288-3290.
- [263] A. Kumar, S. I. Khan, A. Manglani, Z. Khan, S. Katti, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **1994**, *13*, 1049-1058.
- [264] C. Meier, J. M. Neumann, F. Andre, Y. Henin, H. D. Tam, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7300-7308.
- [265] H. Urata, H. Hara, Y. Hirata, N. Ohmoto, M. Akagi, *Tetrahedron-Asymmetr.* **2005**, *16*, 2908-2917.
- [266] E. John, *J. Chem. Soc.* **1992**, 1015-1019.
- [267] S. Ikeda, T. Kubota, D. O. Wang, H. Yanagisawa, T. Umemoto, A. Okamoto, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2871-2880.
- [268] W. L. Sung, S. A. Narang, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 111-120.