

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

**Synthese von Oligonukleotid-Konjugaten mittels
Cu^I-katalysierter Click-Chemie und
Untersuchung ihres therapeutischen Potenzials**

Annika Jasmin Tölke

aus

Hofgeismar (Deutschland)

2025

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 eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 02. Januar 2025

Annika Jasmin Tölke

Dissertation eingereicht am: 14.01.2025

1. Gutachter: Prof. Dr. THOMAS CARELL

2. Gutachter: Dr. PAVEL KIELKOWSKI

Mündliche Prüfung am: 13.02.2025

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder auf Konferenzen vorgestellt.

Publikationen

- „*Suppression of SARS-CoV-2 Replication with Stabilized and Click-Chemistry Modified siRNAs*“ F. R. Traube#, M. Stern#, **A. J. Tölke**#, M. Rudelius, E. Mejías-Pérez, N. Raddaoui, B. M. Kümmerer, C. Douat, F. Streshnev, M. Albanese, P. R. Wratil, Y. V. Gärtner, M. Nainytė, G. Giorgio, S. Michalakis, S. Schneider, H. Streeck, M. Müller, O. T. Keppler*, T. Carell*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, 61, e202204556.

#: Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zur Publikation beigetragen.

*: Korrespondierende Autoren

- „*Efficient Tandem Copper-Catalyzed Click Synthesis of Multisugar Modified Oligonucleotides*“ **A. J. Tölke**, J. F. Gaisbauer, Y. V. Gärtner, B. Steigenberger, A. Holovan, F. Streshnev, S. Schneider, M. Müller, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, e202405161.

Konferenzbeiträge

- **Posterbeitrag** „*Suppression of SARS-CoV-2 Replication with Stabilized and Click-Chemistry Modified siRNAs.*“ Bioinspired Complex Systems from Basic Science to Practical Applications (Neve Ilan, Israel, November 2022)
- **Posterbeitrag** „*Suppression of SARS-CoV-2 Replication with Stabilized and Click-Chemistry Modified siRNAs.*“ Oxford Symposia – 9th International, Oligo 2023 Oxford: Antisense & Therapeutic Nucleic Acids (Oxford, United Kingdom, März 2023)

Weitere Publikationen

- “*Generation of densely labeled oligonucleotides for the detection of small genomic elements*” C. Steinek, M. Guirao-Ortiz, G. Stumberger, **A. J. Tölke**, D. Hörl, T. Carell, H. Harz, H. Leonhardt, *Cell Rep. Methods* **2024**, 4, 100840.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. THOMAS CARELL für die Möglichkeit der Anfertigung der Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis bedanken. Die aktuelle und spannende Themenstellung sowie die ausgezeichnete Betreuung haben mir nicht nur fundierte wissenschaftliche Erkenntnisse vermittelt, sondern auch die Freiheit und das Vertrauen gegeben, eigene Ideen zu entwickeln. Für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die stets unterstützende Atmosphäre und die motivierende Zusammenarbeit danke ich Dir sehr.

Dr. PAVEL KIELKOWSKI danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitgliedern der Prüfungskommission für das Beisitzen der mündlichen Prüfung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. MARKUS MÜLLER für die zahlreichen inspirierenden wissenschaftlichen Diskussionen. Deine Ratschläge waren stets ausgesprochen hilfreich und ich bin dankbar für die wertvollen Impulse, die Du mir während der gesamten Promotion gegeben hast.

Für die Unterstützung in sämtlichen bürokratischen Angelegenheiten danke ich ALMA TURSIC-WUNDER. Ein weiteres Dankeschön geht an KERSTIN KURZ und CLAUDIA SCHERÜBL für deren wertvolle Unterstützung im Laboralltag.

Für die gewissenhafte fachliche sowie sprachliche Korrektur dieser Arbeit möchte ich mich bei Dr. MARKUS MÜLLER, Dr. FELIX XU sowie Dr. BÄRBEL MLASOWSKY herzlich bedanken. Ihre Anmerkungen haben zur Verbesserung der Qualität dieser Dissertation beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der siRNA *Subgroup* und meinen Kollaborationspartnern für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderes Dankeschön geht dabei an Dr. FRANZISKA TRAUBE und YASMIN GÄRTNER, die durch zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen zu dieser Arbeit beigetragen haben. Ebenso danke ich meinen Praktikanten für ihre wertvolle Mithilfe und ihre engagierte Unterstützung.

Dem ganzen Arbeitskreis möchte ich für die stetige Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre während meiner Promotion danken. Die kollegiale Zusammenarbeit und das freundliche Miteinander haben diese Zeit für mich sehr bereichert. Ein besonderer Dank gilt Dr. KATERINA PAPPA, ANDREAS REICHL, Dr. DILARA ÖZDEMIR, Dr. FABIAN HERNICHEL, Dr. GIACOMO GANAZZOLI und ALEXANDER PICHLER für die vielen wertvollen Momente, die ich mit euch erleben durfte. Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. FELIX XU bedanken. Danke, für deine durchgängige Unterstützung - sei es durch unsere *Brainstorming-Sessions*, die zahlreichen

Ratschläge oder deine Motivation. Ich habe großes Glück, dich an meiner Seite zu haben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner ganzen Familie bedanken und ganz besonderes bei meinen Eltern ALEXANDRA LUDWIG-TÖLKE und DIETER LUDWIG. Danke, dass ihr mich nicht nur während meiner Promotion, sondern über das ganze Studium hinweg unterstützt habt. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Summary	IV
1. Einleitung	1
1.1. Oligonukleotid Therapeutika und ihre Wirkmechanismen.....	1
1.1.1. <i>Splice-switching</i> Oligonukleotide.....	2
1.1.2. RNase H1-vermittelte Degradierung	3
1.1.3. RNA-Interferenz.....	4
1.1.4. Weitere potenzielle therapeutische Oligonukleotide.....	5
1.2. Herausforderungen für die therapeutische Anwendung.....	6
1.2.1. Chemische Modifikationen.....	8
1.2.2. Modifikationsmuster	12
1.2.3. Transportsysteme.....	15
1.2.4. Endosomale Freisetzung.....	16
1.3. Potential von Konjugations- und Linkerstrategien	18
2. Aufgabenstellung	24
3. Veröffentlichte Arbeiten	25
3.1. Unterdrückung der SARS-CoV-2 Replikation mit stabilisierten und durch Click-Chemie modifizierten siRNAs.....	25
3.2. Effiziente Cu-katalysierte Tandem-Click-Synthese von mehrfach zuckermodifizierten Oligonukleotiden.....	35
4. Unveröffentlichte Arbeiten	42
4.1. Spezifische Adressierung von Oberflächenrezeptoren	42
4.2. Ansatz zur Untersuchung der endosomalen Freisetzung	52
5. Materialien und Methoden	55
6. Oligonukleotid-Konjugat Synthese	59
7. Chemische Synthese	65
8. Abkürzungsverzeichnis	71
9. Literaturverzeichnis	76
Anhang I	67
Anhang II	74
Anhang III	95

Zusammenfassung

Nukleinsäure-basierte Therapeutika bieten durch gezielte Eingriffe in die Genexpression von krankheitsverursachenden Proteinen die Möglichkeit, deren Proteinsynthese zu korrigieren oder zu regulieren. Um die beabsichtigte therapeutische Wirkung zu erzielen, muss das Oligonukleotid zunächst den gewünschten Wirkungsort in der entsprechenden Dosierung erreichen. Folglich konzentriert sich die Forschung auf die Entwicklung hochstabiler Nukleinsäuren mit hoher Spezifität und effizientem Transport in die Zielzelle, während Immunreaktionen und Nebenwirkungen minimiert werden. Ansätze beinhalten das Modifizieren der Nukleobasen sowie des Zucker-Phosphat-Rückgrats. Zusätzlich verdeutlicht die Präsenz von Biokonjugaten in der pharmazeutischen Entwicklung, die Relevanz der Weiterentwicklung von neuen Modifikationsperspektiven.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potenzial von siRNA-basierten Therapeutika zur Behandlung von RNA-Viren untersucht. Basierend auf dem Genom des Coronavirus SARS-CoV-2 wurden chemisch modifizierte und stabilisierte siRNAs für unterschiedliche Zielregionen synthetisiert und auf ihre Wirksamkeit getestet. Die vielversprechendsten Kandidaten wurden mittels Cu^I-katalysierter Click-Chemie mit verschiedenen Substituenten konjugiert, die eine zielgerichtete Aufnahme in die Zielzellen ermöglichen sollte. In der Tat konnte mit einem ACE2-bindenden Hexapeptid die Virusreplikation und die virusinduzierte Apoptose in mukoziliären 3D-Lungenmikrogeweben verringert werden. Darüber hinaus wurde die schnelle Anpassungsfähigkeit von siRNAs an Virusmutationen demonstriert.

Im zweiten Teil der Arbeit lag der Fokus zunächst auf der Etablierung eines multifunktionalen Linkers, der die direkte, schnelle und selektive post-synthetische Funktionalisierung von siRNA mit *Targeting*-Molekülen ermöglicht. Die Linker Struktur weist vier terminale Azide auf, von denen eines ein Chelat-bildendes Picolyl-Azid und die restlichen Alkyl-Azide sind. Untersuchungen ergaben, dass die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten der terminalen Azid-Gruppen groß genug sind, um eine hochselektive Konjugation mittels Cu^I-katalysierter Click-Chemie in einer *one-pot*-Reaktion zu ermöglichen. Analog zu den bereits zugelassenen siRNA-Therapeutika Givosiran, Lumasiran, Inclisiran und Vutrisiran wurden zunächst zur gezielten Aufnahme in Hepatozyten GalNAc-Einheiten als Liganden für den ASGPR Rezeptor konjugiert. Anschließend erfolgte in weiteren Studien zur Adressierung von Lungenzelltypen die Konjugation an Peptide.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde durch die Inkorporation eines 5-Methylaminomethyl-2'-desoxy-uridins eine weitere Modifizierungsmöglichkeit in die siRNA integriert. Durch das

primäre Amin soll die Konjugation über einen säurelabilen Linker an diverse Moleküle erfolgen, um deren Auswirkung auf die Freisetzung aus dem Endosom genauer zu untersuchen.

Summary

Nucleic acid-based therapeutics offer the possibility to correct or regulate the protein synthesis of disease-causing proteins through targeted modulation in their gene expression. To achieve the intended therapeutic effect, the oligonucleotide must first reach the desired site of action in the appropriate dosage. Research is focused on developing highly stable nucleic acids with high specificity and efficient transport into the target cell while minimizing immune responses and off-target effects. Approaches include the modification of nucleobases and the sugar-phosphate backbone. In addition, the presence of bioconjugates in pharmaceutical research highlights the relevance of further development of new modification perspectives.

In this work, the potential of siRNA-based therapeutics for the treatment of RNA viruses was investigated. Based on the genome of the SARS-CoV-2 coronavirus, chemically modified and stabilized siRNAs were synthesized for different target regions and tested for their efficacy. The most promising candidates were modified with various substituents using Cu^I-catalyzed click chemistry, which should enable active uptake into the target cells. It was shown, that an ACE2-binding hexapeptide was able to reduce viral replication and virus-induced apoptosis in 3D mucociliary lung microtissues. In addition, the rapid adaptability of siRNAs to target viral mutations was demonstrated.

The second part of the work initially focused on establishing a multifunctional linker that enables the direct, rapid and selective post-synthetic functionalization of siRNA with several targeting molecules. The linker structure contains four terminal azides, one of which is a chelating picolyl azide and the others are alkyl azides. Investigations have shown that the different reaction rates of the terminal azide groups are high enough to enable highly selective conjugation using Cu^I-catalyzed click chemistry in a *one-pot* reaction. Analogous to the already approved siRNA therapeutics givosiran, lumasiran, inclisiran and vutrisiran, GalNAc units were initially conjugated as ligands for the ASGPR receptor for targeted uptake in hepatocytes. Subsequently, conjugation to peptides was performed in further studies for targeted delivery to lung cell types.

In the last part of this work, a further modification option was integrated into the siRNA by incorporating a 5-methylaminomethyl-2'-deoxy-uridine. The primary amine could be used for conjugation via an acid-labile linker to various molecules. This concept offers the possibility to investigate the endosomal release in more detail.

1. Einleitung

Die Entwicklung neuer Medikamente erfordert zunächst die Identifizierung eines relevanten therapeutischen Ziels, bevor eine Verbindung zur Beeinflussung dessen Funktion entwickelt werden kann. Herkömmlicherweise handelt es sich bei diesen Zielen um Proteine, deren Funktion durch *Small Molecules* zielgerichtet moduliert werden.^[1] Allerdings zeigte die Entschlüsselung des genetischen Codes im Rahmen des Humanen Genom Projekts, dass lediglich rund 1,5 % des humanen Genoms für Proteine codieren,^[2-4] von denen wiederum nur 14 - 22 % aktive Bindestellen aufweisen.^[5-6] Folglich kommt neben umfangreichen *Screening*-Prozessen zur Entwicklung passender *Small Molecules* für die komplexen räumlichen Strukturen dieser Bindestellen hinzu, dass einige Proteinklassen wie Transkriptionsfaktoren, Gerüstproteine oder Strukturproteine durch diesen traditionellen Ansatz nicht angreifbar sind.^[1] Ein alternativer Ansatz zur indirekten Modulierung des krankheitsverursachenden Zielproteins basiert auf dem Einsatz von Oligonukleotid Therapeutika. Oligonukleotid Therapeutika sind kurzkettige DNA oder RNA-Sequenzen, die durch hochspezifische Interaktion mit der Zielsequenz über Watson-Crick-Basenpaarung gezielt in die Genexpression oder Transkription eingreifen können.^[7] Auf Grundlage der krankheitsverursachenden Zielsequenz und deren Sekundärstrukturen können komplementäre Oligonukleotid Bibliotheken schnell und einfach synthetisiert werden, wodurch aktive Sequenzen zeitnah identifiziert werden können.^[8-9] Die Eigenschaften des Oligonukleotids im Hinblick auf Sicherheit und Wirksamkeit können zudem durch spezifisches Modifizieren der Nukleobasen sowie des Zucker-Phosphat-Rückgrats verbessert werden.^[9] Daher führt dieser Ansatz zu kürzeren Forschungs- und Entwicklungszeiten bei einer breiteren Anwendung.^[10] Der weltweite Einsatz von COVID-19 mRNA-Impfstoffen hat gezeigt, welchen revolutionären Einfluss die Verwendung von Nukleinsäure-basierten Therapeutika im Gesundheitswesen haben kann.^[11]

1.1. Oligonukleotid Therapeutika und ihre Wirkmechanismen

Antisense Oligonukleotide (ASOs) sind 8 - 30 Basen lange, synthetische Oligonukleotide, die komplementär (antisense) zu RNA-Transkripten sind (Abbildung 1).^[12-13] Aufgrund ihrer Wirkmechanismen können ASOs in zwei Kategorien unterteilt werden: 1) Wirkmechanismus durch Binden an die Ziel-RNA mit anschließender Störung ihrer Funktion ohne Förderung des RNA-Abbaus und 2) Wirkmechanismus durch Degradierung oder Aktivierung der Ziel-RNA mittels endogener Enzyme.^[12, 14] Faktoren wie das Design, chemische Modifikationen, die

Bindungsstelle und das Ziel-Zellkompartiment haben einen Einfluss auf den Wirkmechanismus des ASOs.^[12]

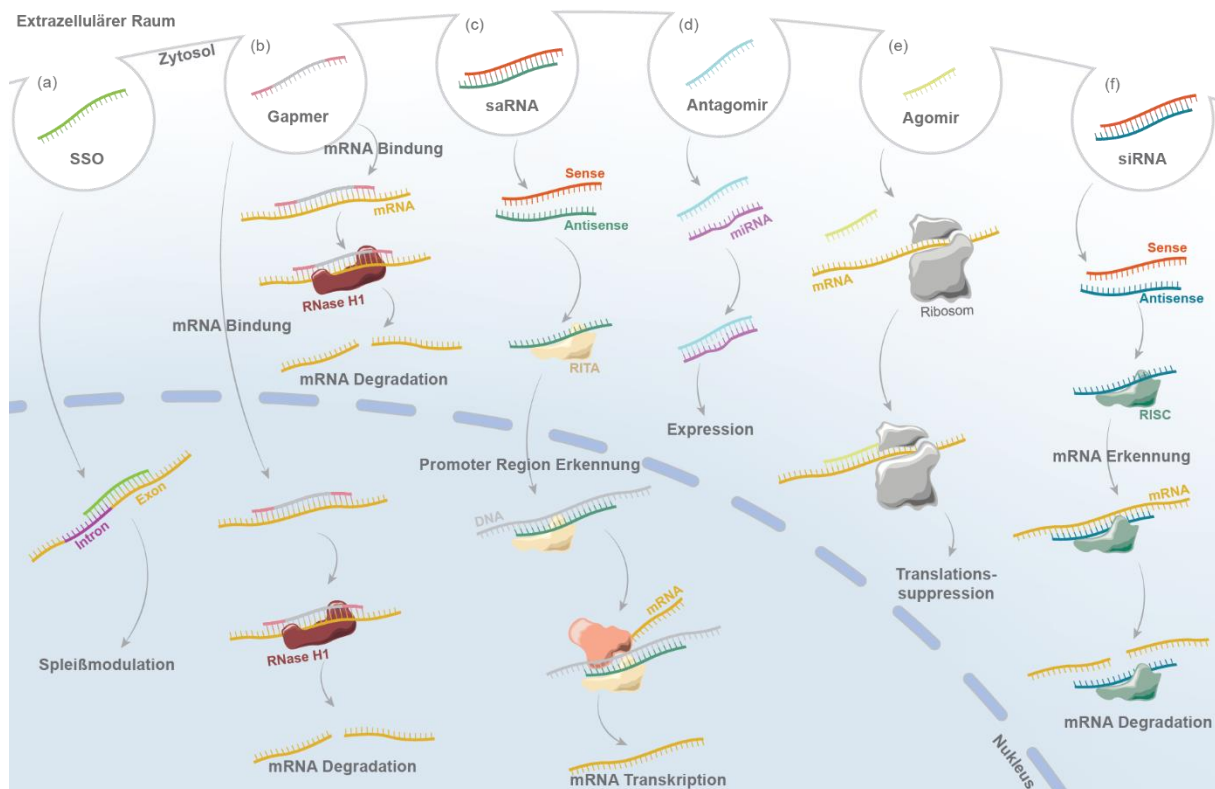


Abbildung 1. Vereinfachte Darstellung der Wirkmechanismen und intrazellulären Lokalisierung: **(a)** SSOs modulieren das Spleißen durch Binden an prä-mRNA; **(b)** Gapmere induzieren durch Bildung von Gapmer-RNA Duplexen im Zytosol sowie im Nucleus eine RNase-H1 vermittelte Degradierung der Ziel-RNA; **(c)** saRNAs rekrutieren den RITA-Komplex und durch Interaktion mit der Promotorsequenz des Zielgens kommt es zur Hochregulation der Transkription; **(d)** Antagomire binden spezifisch miRNAs, wodurch die Translation des Ziel-Genes nicht inhibiert wird; **(e)** Agomire unterdrücken durch Binden an die Ziel-mRNA die Genexpression; **(f)** siRNAs induzieren die RISC-vermittelte Ziel-mRNA Degradierung. Abbildung in Anlehnung an ANWAR *et al.* und HAMMOND *et al.*^[11, 15]

1.1.1. *Splice-switching* Oligonukleotide

Splice-switching Oligonukleotide (SSOs) können durch das Binden an prä-mRNA zur Blockierung des prä-mRNA Spleißens führen (Abbildung 1a).^[16] Es gibt zwei Arten von Spleißmodulation: 1) *Exon-Skipping* und 2) *Exon-Inklusion*.^[7] Beim *Exon-Skipping* bewirkt das Hybridisieren des SSOs an die prä-mRNA das Auslassen des Exons, wodurch der gestörte Leserahmen korrigiert und ein kürzeres, aber funktionelles Protein produziert wird.^[17] Bei Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) Patienten wird durch SSO-induziertes *Exon-Skipping* der Leserahmen der mutierten Dystrophin-prä-mRNA wiederhergestellt und die Produktion eines teilweise

funktionellen Dystrophin-Proteins ermöglicht.^[18-19] Bei der Exon-Inklusion binden SSOs an die prä-mRNA und hindern das Spleißosom und die Spleißfaktoren am Spleißen.^[20] Bei Patienten mit spinaler Muskelatrophie (SMA) wird durch SSOs die Menge der Exon-7-Inklusion in der *Survival-Motorneurons 2* (SMN2) mRNA erhöht, was zu einer erhöhten Menge an SMN-Protein führt.^[21]

1.1.2. RNase H1-vermittelte Degradierung

Ribonukleasen H sind metallabhängige Endonukleasen, die erstmals von HANS STEIN und PETER HAUSEN im Jahr 1969 beschrieben wurden.^[22-23] RNasen H kommen in allen Zweigen des Lebens vor und hydrolysieren die Phosphodiester-Bindung des RNA-Rückgrats in RNA-DNA Heteroduplexen, wodurch Spaltprodukte mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxyterminus erzeugt werden.^[23-24] Dieser RNase-H-Mechanismus bildete die Grundlage für DNA-enthaltende Antisense Oligonukleotide als potenzielle Therapeutika. Durch weitere Untersuchungen von STANLEY CROOKE und seinem Team konnte gezeigt werden, dass in humanen Zellen RNase H1 eine entscheidende Rolle bei der Aktivität von DNA-enthaltenden ASOs spielt.^[25] 1978 wurde von PAUL ZAMECNIK und MARY STEPHENSON das erste Mal die Inhibierung der Proteinexpression durch den Einsatz eines Antisense Oligonukleotids in Zellkultur nachgewiesen.^[26] Seitdem hat die Forschung deutliche Fortschritte bei der Entwicklung von ASO verzeichnet. Heutzutage involviert das typische Design eines RNase-H1-vermittelten ASOs eine Gapmer-Struktur. Gapmere sind traditionell 20mere und besitzen einen zentralen DNA-Bereich, der auf beiden Seiten von jeweils fünf modifizierten RNA-Nukleotiden umgeben ist.^[27] Bei diesen Modifikationen handelt es sich um Zuckermifikationen, die für eine höhere Bindungsaffinität sorgen. Das 2'-O-Methoxyethyl-Ribonukleotid flankierte 5-10-5 Gapmer Design dominiert momentan den Markt.^[28] Durch die Bindung des Gapmers mit der komplementären Ziel-RNA entsteht ein Gapmer-RNA Duplex, der RNA-DNA Heteroduplexe imitiert (Abbildung 1b). Der Gapmer-RNA Duplex rekrutiert RNase H1, was ein Gen-*Silencing* zur Folge hat.^[29] Da RNase H1 sowohl im Zytosol als auch im Zellkern ubiquitär ist, wird der RNase H1-vermittelte Ansatz häufig zur Unterdrückung krankheitsrelevanter Gene in Betracht gezogen.^[30] Basierend auf diesem Wirkmechanismus wurden bereits Therapeutika zur Behandlung von hereditärer Transthyretin-Amyloidose (hATTR), Familiärer Chylomikronämie Syndrom (FCS) sowie Amyotropher Lateralsklerose (ALS) zugelassen.^[31-33]

1.1.3. RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlich vorkommender Mechanismus in eukaryotischen Zellen, durch den sequenzspezifisch, post-transkriptionell die Expression eines Gens durch eine doppelsträngige RNA (dsRNA), die in ihrer Sequenz homolog zu dem Zielgen ist, inhibiert wird.^[34-37] Der in Pflanzen, Tieren und Menschen vorkommende Mechanismus ist essenziell für die Regulierung der Genexpression, die Abwehr von Viren und zum Schutz des Genoms gegen Transposons, und bildet die Grundlage für die Entwicklung von RNAi-basierten Medikamenten.^[38-39] ANDREW FIRE und CRAIG MELLO publizierten 1998 diese bahnbrechende Entdeckung und wurden für ihre Arbeit 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.^[40] Nur drei Jahre nach der Entdeckung des Phänomens der RNA-Interferenz zeigten ELBASHIR *et al.* sowie CAPLEN *et al.*,^[41-42] dass durch endogene oder synthetische *small-interfering* RNAs (siRNA) Gen-Silencing in Säugetierzellen induziert werden kann, ohne unspezifische Interferonreaktionen auszulösen.^[43] siRNAs sind kurze, nicht-codierende RNA Duplexe, die etwa 21-23 Basen lang sind (Abbildung 2).^[44] Die zwei komplementären Stränge werden als *Passenger* (Sense) und *Guide* (Antisense) Strang bezeichnet. Die effizienten siRNAs weisen eine 19+2mer Struktur auf, das heißt ein Duplex aus zwei 21 Nukleotid langen Strängen mit 19 komplementären Basen und jeweils 2 Nukleotid langen 3'-Überhängen sowie phosphorylierten 5'-Enden.^[45] Der Antisense Strang ist komplementär zu der Ziel-RNA und dessen *Seed-Region*, welche sich an Position 2-8 befindet, ist für die korrekte Erkennung dieser RNA verantwortlich.^[46]

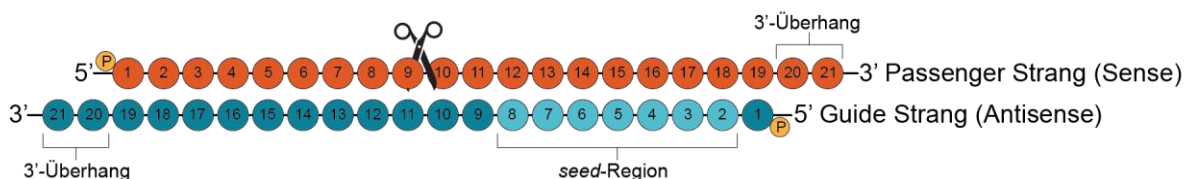


Abbildung 2. Beispielhafte Darstellung einer siRNA mit einer 19+2mer Struktur bestehend aus 5'-phosphorylierten *Passenger* und *Guide* Strängen mit jeweiligen 3'-Überhängen. Die *Seed-Region* befindet sich an Position 2-8 des *Guide* Strangs und die Argonaut 2 Schnittstelle zwischen Position 9 und 10 des *Passenger* Strangs.

Durch das Einbringen von siRNAs werden diese in den endogenen prä-RNA-induced silencing complex (RISC) geladen (Abbildung 1f). Während der Inkorporation in den RISC erfolgt die Diskriminierung zwischen dem Sense und dem Antisense Strang. Der Strang, dessen erste 1-4 Nucleotide des jeweiligen 5'-Endes thermodynamisch instabiler sind, wird mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in den RISC geladen während der andere Strang durch das Argonaut 2

Protein (AGO2) geschnitten wird.^[47-48] Der dabei ausgewählte Antisense Strang verbleibt im nun aktivierten RISC und ermöglicht durch Watson-Crick-Basenpaarung die Erkennung der Ziel-mRNA, wodurch die Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats der mRNA durch AGO2 induziert wird.^[49-51] siRNAs wurden zu einem vielversprechenden Werkzeug für die Entwicklung genspezifischer Therapeutika, und bereits fünf siRNA Medikamente haben bis dato die klinische Zulassung erhalten.^[52-56]

1.1.4. Weitere potenzielle therapeutische Oligonukleotide

Die direkt von der DNA transkribierten microRNAs (miRNA) kontrollieren die post-transkriptionelle Regulierung der Genexpression. Sie können in ihrer Funktion durch synthetische Einzelstränge, sogenannten Antagomiren und Agomiren, beeinflusst werden.^[57-59] Antagomire (anti-miRs) binden spezifisch an ihre komplementäre Ziel-miRNA Sequenz, wodurch dessen Funktion, an eine Ziel-mRNA zu binden, blockiert wird (Abbildung 1d).^[58, 60] Dadurch kommt es zur indirekten Aktivierung der Translation der mRNA in das entsprechende Protein.^[61] Agomire (miR-Mimic) haben den gegenteiligen Effekt und ahmen die miRNA nach, wobei die Sequenz des Agomirs streng komplementär zur miRNA-Bindestelle ist (Abbildung 1e). Dadurch bewirken Agomire eine stärkere Bindung an die Ziel-mRNA, wodurch eine zielspezifische Inhibierung der Genexpression gewährleistet wird.^[59] Fehlregulation von miRNAs tritt oft im Zusammenhang mit Krebs auf, was Antagomire und Agomire zu einem attraktiven Ansatz für Krebstherapie macht.^[61]

Small activating RNAs (saRNA), die erstmals durch Li *et al.* beschrieben wurden, sind synthetische 21 Basenpaar lange RNA Duplexe, die siRNAs in der Struktur, aber nicht der Funktion ähneln. Durch die Interaktion mit der Promotorsequenz des Zielgens sind saRNAs in der Lage, den RNA-induzierten Transkriptionsaktivierungskomplex (RITA) zu rekrutieren und zur Hochregulation der Genexpression zu führen (Abbildung 1c).^[62-63] Die globale klinische Studie des saRNA-Medikaments MTL-CEBPA von *MiNA Therapeutics* zeigte in Kombination mit Sorafenib bereits vielversprechende Ergebnisse bei fortgeschrittenem Leberkrebs und offenbart, welches große Potential der Ansatz der RNA-Aktivierung (RNAa) birgt.^[64-65]

Weitere potenzielle Oligonukleotide, die ihre Wirkung nicht durch Watson-Crick-Basenpaarung ausüben, sind Aptamere, mRNAs und selbst-amplifizierende mRNAs. Aptamere sind 20-100 Nukleotid lange Einzelstränge, die durch ihre 3D-Struktur und deren elektrostatischen Interaktionen spezifisch an das Ziel-Protein binden können.^[15, 66-67] mRNAs können zum einen zur Expression von therapeutischen Antikörpern und Proteinen eingesetzt werden, um einen

Funktionsverlust zu beheben, oder zum anderen zur Codierung für ein krankheitsassoziiertes Antigen dienen, um eine spezifische Immunantwort auszulösen.^[29] Selbst-amplifizierende mRNAs (sa-mRNAs) codieren zusätzlich zur eigenen Sequenz eine Replikase, wodurch sie sich in der Zielzelle selbst replizieren können.^[68] Im Fall von potenziellen Impfstoffen resultiert die anhaltende Produktion des Zielgens und die damit verbundene Auslösung der angeborenen Immunantwort in einer erhöhten Wirksamkeit bei geringerer Dosis.^[68-69] Der in Japan bereits zugelassene sa-mRNA-Impfstoff ARCT-154 für COVID-19 von *Arcturus Therapeutics* wies in der *Booster* Studie mit 5 µg eine höhere Immunantwort auf als 30 µg des mRNA-Impfstoffs von *Pfizer-BioNTech*.^[70]



Im Allgemeinen ist die therapeutische Anwendung ausschlaggebend für die Wahl der Modalität. Durch das Binden an Ziel-Sequenzen kann eine Modulation in der Funktion der adressierten mRNA, miRNA oder prä-mRNA ausgelöst werden, was zu einer Hochregulation, Runterregulation oder Modifikation des Zielgens führen kann. Folglich spielen das *Target*, der Wirkmechanismus, aber auch die biophysikalischen Eigenschaften des Oligonukleotides eine erhebliche Rolle.

1.2. Herausforderungen für die therapeutische Anwendung

Für die therapeutische Anwendung von Oligonukleotid Therapeutika müssen jedoch einige Herausforderungen überwunden werden. Dabei konzentriert sich die Forschung auf die Entwicklung hochstabiler Nukleinsäuren mit hoher Spezifität und effizientem Transport in die Zelle bei minimaler Immunantwort und *off-target* Effekten sowie die Skalierbarkeit in der Produktion und deren Kosten.^[10] Damit die therapeutische Wirkung des Oligonukleotides entfaltet werden kann, muss zunächst die beabsichtigte Dosierung am Wirkungsort erreicht werden. Eines der Haupthindernisse ist das Überwinden von zellulären Barrieren, wie die selektive Verabreichung in das Zielorgan/-gewebe, der Transport in spezifische Zellen und das Erreichen des richtigen zellulären Kompartments. Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften von Oligonukleotiden können diese nicht wie *Small Molecules* durch passive Diffusion in die Zielzelle gelangen, sondern benötigen ein geeignetes Transportvehikel.^[71] Erfolgt die Internalisierung des Oligonukleotides durch Endozytose, stellt die nächste Hürde die Freisetzung aus dem Endosom dar, da der Wirkungsort meist im Zytoplasma oder im Zellkern liegt. Dabei wird die therapeutische Wirkung durch die niedrigen Freisetzungsraten, den Abbau durch lysosomale Enzyme sowie Exozytose limitiert.^[72-73] Zusätzlich ist der Erfolg der therapeutischen Anwendung während des gesamten Prozesses abhängig von der Stabilität des Oligonukleotides gegenüber den im Blutkreislauf und Zytosol vorkommenden Endo- und


Exonukleasen sowie der Filterung durch die Niere und der damit einhergehenden Halbwertszeit.^[72] Des Weiteren sind viele Arten von Nukleinsäuren Aktivatoren des angeborenen Immunsystems und die daraus resultierende Immunreaktion kann zusätzlich durch das Transportvehikel verstärkt werden.^[74] Trotz all dieser Hürden konnte die Forschung in den letzten Jahren deutliche Fortschritte verzeichnen, wodurch bereits die ersten Nukleinsäure-basierten Medikamente zugelassen werden konnten (Tabelle 1) und viele weitere sich in der Entwicklung befinden.^[75] Zu den von der *Food and Drug Administration* (FDA) oder der *European Medicines Agency* (EMA) zugelassenen Oligonukleotiden zählen fünf RNase H1-vermittelte ASOs, vier *Exon-Skipping* SSOs, ein *Exon-Inklusion* SSO und fünf siRNAs.^{Stand 08/2023}

Tabelle 1. Zusammenfassung zugelassener Antisense Oligonukleotid Therapeutika. (Stand 08/2023)[28, 76]

Typ	Name	Zulassungsjahr	Indikation	Wirkmechanismus, Delivery-Mechanismus	Sequenz, Modifikationen	Ref.
ASO	Fomivirsen (Vitravene®)	1998 (zurückgezogen)	CMV-Retinitis	RNase H1 und TLR 9	5'-GCGTTTGCTCTTCTTCTTGGG-3'	[77]
Gapmer	Mipomersen (Kynamro®)	2013 (zurückgezogen)	Homozygote Familiäre Hypercholesterinämie (HoFH)	RNase H1	5'-GCCTCAGTCTGCTTCGCACC-3' C = 5-Methyl-C	[78]
SSO	Eteplirsen (Exondys 51®)	2016	Duchenne Muskeldystrophie (DMD)	Exon-Skipping	 5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'	[79]
SSO	Nusinersen (Spinraza®)	2016	Spinale Muskelatrophie (SMA)	Exon-Inklusion	5'-TCACTTTCATAATGCTGG-3' C = 5-Methyl-C	[80]
Gapmer	Inotersen (Tegsedi®)	2018	hereditären Transthyretin-Amyloidose (hATTR)	RNase H1	5'-TCTTG GTTACATGAAATCCC-3' C = 5-Methyl-C	[31]
siRNA	Patisiran (Onpattro®)	2018	hereditären Transthyretin-Amyloidose (hATTR)	RISC AGO2 Lipidnanopartikel	5'-GUAACCAAGAGUAUJCCAUT-3' Passenger 3'-TTCAUJGGUUCUCUAAGGUA-5' Guide	[52]
siRNA	Givosiran (Givlaari®)	2019	Akute Hepatische Porphyrie (AHP)	RISC AGO2 GalNAc Konjugat	 5'-CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA-3' Passenger 3'-UGGUCUUCUCACAGAGUAGAAU-5' Guide	[53]

○ DNA ● 2'-MOE ● PMO ● RNA ● 2'-OMe ● 2'-F ~ PS Modifikation  GalNAc

SSO	Golodirsen (Vyondys 53®)	2019	Duchenne Muskeldystrophie (DMD)	Exon-Skipping	<p>5'-GTTGCGCTCCGGTTCTGAAAGGTGTTTC-3'</p>	[81]
Gapmer	Volanesorsen (Waylivra®)	2019	Familiäres Chylomikronämie Syndrom (FCS)	RNase H1	<p>5'-TATTTTCGACCTGTTCTTCGA-3'</p> <p>C = 5-Methyl-C</p>	[32]
SSO	Viltolarsen (Viltepso®)	2020	Duchenne Muskeldystrophie (DMD)	Exon-Skipping	<p>5'-CCTCCGGTTCTGAAAGGTGTTTC-3'</p>	[82]
siRNA	Lumasiran (Oxlumo®)	2020	Primäre Hyperoxalurie (PH)	RISC AGO2 GalNAc Konjugat	<p>5'-GACUUCACUCCUGGAAAUUA-3' Passenger</p> <p>3'-ACCUGAAAGUAGGACCUUUAUAU-5' Guide</p>	[54]
siRNA	Inclisiran (Leqvio®)	2020	Heterozygote Familiäre Hypercholesterinämie (HeFH) oder Atherosklerotische Herz-Kreislauf-Erkrankungen (ASCVD)	RISC AGO2 GalNAc Konjugat	<p>5'-CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' Passenger</p> <p>3'-AAGAUCUGGACAAAACGAAAACA-5' Guide</p>	[55]
SSO	Casimersen (Amondys 45®)	2021	Duchenne Muskeldystrophie (DMD)	Exon-Skipping	<p>5'-CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG-3'</p>	[83]
siRNA	Vutrisiran (Amvuttra®)	2022	hereditären Transthyretin-Amyloidose (hATTR)	RISC AGO2 GalNAc Konjugat	<p>5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3' Passenger</p> <p>3'-CUACCCUAAAGUACAUUGGUUCU-5' Guide</p>	[56]
Gapmer	Tofersen (Qalsody®)	2023	Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	RNase H1	<p>5'-CAGGATACATTTCTACAGCT-3'</p> <p>C = 5-Methyl-C</p>	[33]

○ DNA ● 2'-MOE ● PMO ● RNA ● 2'-OMe ● 2'-F ~ PS Modifikation  GalNAc

1.2.1. Chemische Modifikationen

Die Verabreichung unmodifizierter Oligonukleotide führt zu deren schneller Degradierung durch Endo- und Exonukleasen, wodurch der Wirkungsort nicht in der beabsichtigten Dosierung erreicht werden kann. Vor allem die unzureichende Stabilität, aber auch weitere therapeutische Eigenschaften wie Immunogenität, Bindungsaffinität und Spezifität können durch die Einführung chemischer Modifikationen in das Oligonukleotid verbessert werden. Folglich zählen zu den häufig verwendeten Bausteinen in Oligonukleotid Therapeutika neben den natürlich vorkommenden RNA- und DNA-Nukleotiden auch nicht-kanonische Nukleotide, die an der Base, dem Zucker sowie dem Phosphat-Rückgrat modifiziert sein können (Abbildung 3). Die Anzahl, Auswahl und Positionierung der Modifikationen sollten an den Wirkmechanismus des therapeutischen Oligonukleotids angepasst werden.

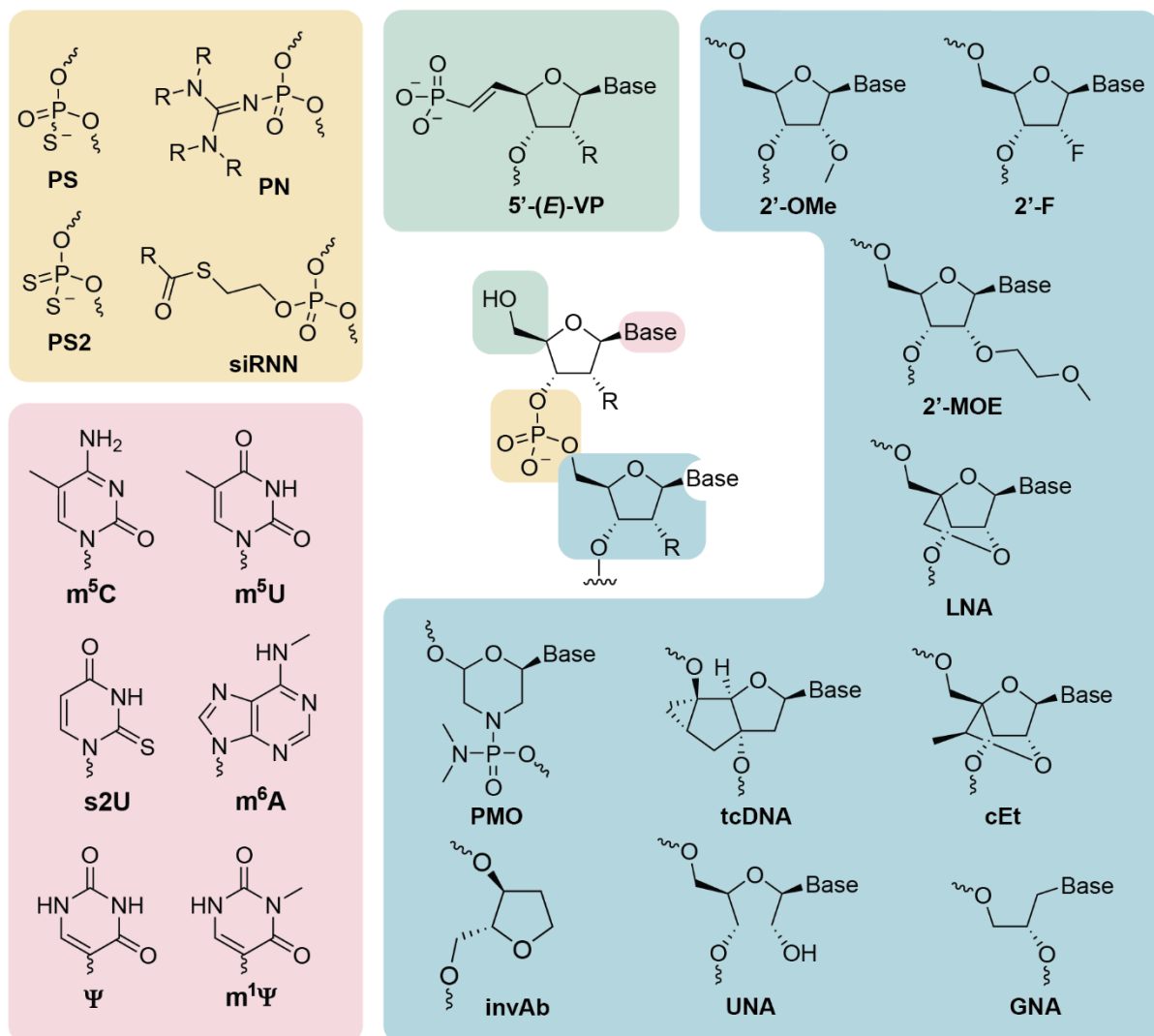


Abbildung 3. Übersicht der chemischen Modifikationen und Analoga, die in therapeutischen Oligonukleotiden Anwendung finden. Zur Optimierung von pharmakokinetischen Eigenschaften, Nuklease

Resistenz, Immunogenität, Bindungsaffinität sowie Spezifität werden Modifikationen im Bereich der Nukleobase (rot), des Zuckers (blau), des Phosphat-Rückgrats (gelb) und des 5'-Phosphats (grün) vorgenommen.

Rückgrat-Modifikationen

Die von FRITZ ECKSTEIN im Jahr 1966 erstmals synthetisierten Mononukleotide, in denen ein Sauerstoff des Phosphats durch ein Schwefelatom ersetzt wurde,^[84] werden als Phosphorothioate (PS) bezeichnet und zählen heute zu einer der Standardmodifikationen in therapeutischen Oligonukleotiden.^[85] PS-modifizierte Gpmere zeigen zwar eine reduzierte Bindungsaffinität zur Ziel-Sequenz auf, sind aber in der Lage, die RNase H1 zu rekrutieren und weisen aufgrund ihrer erhöhten Resistenz gegenüber endogenen Nukleasen eine erhöhte Stabilität in biologischen Flüssigkeiten auf.^[86-87] Aufgrund ihrer Fähigkeit, Plasmaproteine zu binden, weisen PS-ASOs eine verlängerte Zirkulationszeit *in vivo* auf, was in einer verbesserten Pharmakokinetik resultiert.^[88-89] Ein weiterer Vorteil ist die Interaktion mit membrangebundenen Proteinen, wodurch die Internalisierung von PS-ASOs in die Zelle gefördert werden kann.^[90-91] Die PS-ASO-Protein-Interaktionen wirken sich positiv auf die Verteilung im Gewebe, die zelluläre Aufnahme, den intrazellulären Transport und die Wirksamkeit aus, erhöhen jedoch gleichzeitig die Toxizität.^[88] Letzteres resultiert hauptsächlich aus der unspezifischen Bindung von PS-ASOs an Proteine.^[92] Dies führte dazu, dass Forscher neue Generationen von PS-ASOs entwickelten, die sowohl weniger toxisch als auch spezifischer sind. So konnten MIGAWA *et al.* zeigen, dass bereits durch den Austausch einer einzigen PS-Verknüpfung an der 2. oder 3. Position des 5'-Endes durch ein ungeladenes Alkylphosphonat die Toxizität reduziert oder gar eliminiert werden konnte.^[93] Auch eine 2'-OMe Modifikation an der 2. Position kann die unspezifische Proteinbindung reduzieren und dadurch die Hepatotoxizität deutlich verringern.^[94] Zusätzlich verbessert die Einführung von Zucker Modifikationen die Bindungsaffinität des ASOs an die Ziel-Sequenz, die durch die PS-Verknüpfungen reduziert wird.^[86] Folglich ist die Position und die Anzahl an PS-Verknüpfungen in ASOs entscheidend. Im Gegensatz zu ihrem PO-Analoga zeigen vollständig PS-modifizierte RNAi-Therapeutika eine deutlich geringere Aktivität,^[95] weshalb die Modifikation zur Stabilisierung gegen Exonukleasen und zur möglichen Zellinternalisierung in der Regel auf die Termini beschränkt wird.^[96]

Mit der Einführung jeder PS-Verknüpfung entsteht am Phosphor-Atom ein chirales Zentrum mit zwei möglichen Stereoisomeren (S_P und R_P), was ein racemisches Gemisch mit 2^n Spezies zur Folge hat (n = Anzahl an PS-Modifikationen). Die einzelnen Spezies könnten sich in ihren physiochemischen Eigenschaften unterscheiden. Stereoreine PS-ASOs können durch die

Verwendung von vordefinierten, diastereomerenreinen Synthese-Bausteinen hergestellt werden.^[97-100] IWAMOTO *et al.* zeigten, dass ein Gapmer mit einem 3'-S_PS_PR_P-5'-stereochemischen Muster in der *Gap*-Region die Spaltung der Ziel-Sequenz durch RNase H1 *in vitro* fördern und eine längere Wirkdauer *in vivo* erzielen kann.^[100] Untersuchungen von SAKAMURI *et al.* an *Alnylam's* Antithrombin-3 verdeutlichten die Auswirkung der Phosphor-Stereoisomere auf die *in vivo* Aktivität, wobei die Stereochemie am 5'-Ende sowie an der ersten Position des 3'-Endes des Antisense Strangs kritisch ist.^[101] Folglich sind Untersuchungen zur Identifizierung der aktivsten Stereoisomere von großer Bedeutung, um die Wirksamkeit von Oligonukleotid Therapeutika in Zukunft zu verbessern und somit deren Dosierung zu verringern.

Die Einführung von Phosphorodithioaten (PS2) in siRNAs kann zu einer signifikant verbesserten Serumstabilität und je nach Position zu einer Verbesserung des Gen-*Silencing* führen.^[102-103] Die chemische Modifikation, bestehend aus einem PS2 sowie einer 2'-OMe-Gruppe eines Nukleotides (MePS2), führte zusätzlich zu einer erhöhten Wirksamkeit aufgrund der erhöhten Beladung des RISC mit der siRNA.^[104]

Die von der STETSENKO Gruppe vorgestellte ladungsneutrale Rückgrat-Modifikation Phosphoryl-Guanidin (PN) weist im Gegensatz zu PS-Verknüpfungen eine hohe Resistenz gegenüber zellulären Nukleasen und eine verbesserte Affinität zur Ziel-Sequenz auf.^[105-106] Das sich in der klinischen Studie befindende stereoreine ASO WVE-N531 von *Wave Life Science* beinhaltet Phosphoryl-Guanidin-Modifikationen und wird für die potenzielle Therapie von Duchenne Muskeldystrophie durch Exon 53-*Skipping* entwickelt.^[107]

5' Modifikation der siRNA

Unter den Interaktionen zwischen dem RISC und der siRNA erweist sich die 5'-Phosphat-Bindungsstelle als eine der kritischsten. Damit eine präzise Spaltung der Ziel-mRNA erfolgen kann, muss die genaue Positionierung des 5'-Phosphat-Endes des Antisense Strangs in die MID-Domäne des humanen AGO2 erfolgen.^[108-111] Es konnte gezeigt werden, dass die Kinase hClp1 für die 5'-Phosphorylierung und folglich für die Aktivität von exogener siRNA verantwortlich ist.^[112] Allerdings beeinträchtigen 5'-Antisense modifizierte siRNAs die hClp1 Aktivität.^[113] Um trotzdem eine 5'-Phosphorylierung zu erhalten, kann das 5'-Ende chemisch durch Phosphonate, die im Gegensatz zu 5'-Phosphaten aufgrund ihrer Kohlenstoff-Phosphor-Bindung resistent gegen Phosphatasen sind, modifiziert werden.^[114] 5'-(*E*)-Vinyl-Phosphonat (VP) erhöht die Stabilität sowie die Bindungsaffinität der siRNA mit hAGO2, was zu einer erhöhten Anreicherung und Halbwertszeit der siRNA *in vivo* und zu einem verbesserten Gen-*Silencing* führt.^[114-116]

Ribose Modifikationen

Die chemische Modifizierung der 2'-Position des Ribose Zuckers zählt zu einer der häufigsten in therapeutischen Oligonukleotiden verwendeten Modifikationen. Durch die Substitution der nukleophilen 2'-OH Gruppe durch 2'-Methoxy (2'-OMe), 2'-Methoxyethyl (2'-MOE) und 2'-Fluoro (2'-F) wird die Nuklease Resistenz erhöht, was zu einer verbesserten Serumstabilität, längeren Halbwertszeit im Gewebe und folglich auch zu einer längeren Wirkdauer führt.^[72, 117] Durch den 2'-Substituent wird das Konformationsgleichgewicht in Richtung des C3'-*endo* *Puckers* verschoben, was auf der bevorzugten *gauche*-Ausrichtung des 2'-Substituenten mit dem cyclischen Sauerstoff beruht. Folglich liegt die Helix in einer A-Form vor, was die Bindungsaffinität des Oligonukleotides zur Ziel-RNA erhöht (ΔT : 2'-MOE: 0,9 - 1,7 °C; 2'-F: \approx 2,5 °C pro Nukleotid).^[86, 118-119] Die Einführung von 2'-OMe sowie 2'-F kann zusätzlich die Immunogenität und die dadurch induzierten *off-target* Effekte minimieren.^[120-122]

Bridged Nukleinsäuren (BNAs), die durch eine Verknüpfung des 2'- und 4'-Kohlenstoffatoms in eine C3'-*endo* Konformation gezwungen werden, erhöhen die Stabilität gegenüber Nukleasen und weisen aufgrund der strukturellen Veränderung eine stärkere Bindungsaffinität zur Ziel-RNA auf.^[123-124] Zu den bekanntesten Vertretern zählen *Locked* Nukleinsäuren (LNA),^[125-126] 2'-O-Ethyl-BNAs (cEt)^[127] sowie tricyclo-DNAs (tcDNA).^[128-129] Es konnte gezeigt werden, dass pro Inkorporation die Schmelztemperatur für LNA um 3 - 8 °C, für cEt um die 5 °C und für tcDNA um 2,4 °C steigt.^[124, 127, 129-131]

Weitere Modifikationen sind *Unlocked* Nukleinsäuren (UNAs), die aufgrund der fehlenden Bindung zwischen dem 2'- und 3'-Kohlenstoffatom flexibler und thermisch instabiler sind, wodurch die Beladung des Antisense Strangs in den RISC bevorzugt werden kann.^[132] Zu den UNAs zählen Glycol Nukleinsäuren (GNAs),^[133] die durch Einführen in die *Seed*-Region des Antisense Strangs die hepatotoxischen *off-target* Effekte reduzieren können.^[134] Blockierung der Termini mit einer invertierten abasischen Modifikation (invAb) kann siRNAs gegenüber Exonukleasen im Serum schützen.^[135]

In sterisch blockierenden Oligonukleotiden wird häufig die Ribose-Untereinheit durch eine Morpholin-Untereinheit ersetzt.^[136-138] Diese sogenannten Phosphordiamidat-Morpholino-Oligonukleotide (PMOs) sind ladungsneutral und haben einen positiven Einfluss auf den Zelleintritt.^[139] Eine weitere ladungsneutralisierende Modifikation sind die neuen sogenannten *short interfering RiboNucleic Neutrals* (siRNN) Moleküle, die anstelle der Phosphordiesterbindungen S-Acyl-2-thioethyl (SATE) besitzen. Diese Modifikation unterstützt die Zellaufnahme und wird anschließend im Zytoplasma durch Thioesterasen in natürliche Phosphordiesterbindungen umgewandelt.^[140-141]

Basen-Modifikationen

Die Basensubstitution von therapeutischen Oligonukleotiden befindet sich noch in der Entwicklungsphase. Dabei wird der Fokus primär auf natürlich vorkommende Basenanaloga gelegt, da das Sicherheitsrisiko bei einem möglichen Einbau in das Genom vermutlich geringer ist.^[140] Das Immunsystem ist darauf trainiert, Oligonukleotide als Fremdmoleküle zu erkennen. Dabei interagiert siRNA mit dem Toll-Like-Rezeptor (TLR) 3 auf der Zelloberfläche sowie mit den TLR 3, 7 und 8 in subzellulären Kompartimenten. DNA und vor allem Sequenzen, die CpG Motive enthalten, stimulieren die Immunantwort durch die Interaktion mit dem TLR 9.^[120] Die unerwünschte Immunantwort kann durch die Substitution mit 5-Methylcytidin, N6-Methyladenosin, 5-Methyluridin, 2-Thiouridin sowie Pseudouridin verringert werden.^[142] Des Weiteren werden methylierte Pyrimidine aufgrund ihrer Erhöhung der Schmelztemperatur um rund 0,5 °C pro Nukleotid inkooperiert.^[143]

1.2.2. Modifikationsmuster

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, ist die Anzahl, Auswahl und Positionierung der Modifikation abhängig von dem Wirkmechanismus des therapeutischen Oligonukleotids. Im Hinblick auf das Design ist für die *Splice-switching* Oligonukleotide nur essenziell, dass die Bindung an die Ziel-Sequenz ermöglicht wird, ohne diese zu degradieren. Hierzu werden oftmals BNAs und PMOs verwendet, um die Bindungsaffinität zur Zielsequenz zu erhöhen. Für Gapmere hingegen muss gewährleistet sein, dass die RNase H1-vermittelte Erkennung und Degradierung des Gapmer-RNA Duplexes nicht beeinträchtigt wird. Daher ist die Modifikation am 2'-Kohlenstoffatom der Desoxyribose im DNA „Gap“ nicht möglich.^[7] Zur Erhöhung der Schmelztemperatur der Gapmere werden daher lediglich die Enden des Oligonukleotides mittels BNAs modifiziert. Untersuchungen haben ergeben, dass cEt flankierte 3-10-3 Gapmere effizienter als deren MOE flankierten 5-10-5 Gapmer Äquivalente sind.^[144-145] Ebenfalls kann eine Modifizierung mittels LNA erfolgen.^[146]

Das Design einer siRNA beginnt mit der Evaluation einer geeigneten Ziel-Sequenz. Basierend auf ELBASHIR *et al.* eignen sich Regionen 50-100 Nucleotide *downstream* des Startcodons im *Open Reading Frames* (ORF) des Ziel-Gens mit einem 5'-AA(N19)TT, 5'-AA(N21) oder 5'-NA(N21)-Motiv.^[147-148] Zusätzlich sollten sich keine Sekundärstrukturen an der Stelle der Ziel-RNA befinden, da diese die Funktionalität der siRNA beeinträchtigen.^[149] Die siRNA Länge variiert zwischen 19-29 Nucleotiden, wobei längere siRNAs mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine

Immunantwort induzieren.^[150] Eine Verhinderung der Aktivierung des Immunsystems kann durch das Vermeiden von spezifischen Motiven sowie Sequenzen mit einem hohen GU- und AU-Anteil, die von TLRs erkannt werden, erzielt werden.^[151-152] Auch wenn unvorhergesehene *off-target* Effekte immer auftreten können, sollte die Sequenzübereinstimmung mit nicht-adressierter mRNA höchstens 78 % betragen.^[153] Durch biologische und bioinformatische Studien wurden positionsspezifische Nucleobasen sowie weitere Parameter für effiziente siRNAs bestimmt (Abbildung 4).^[154-160]

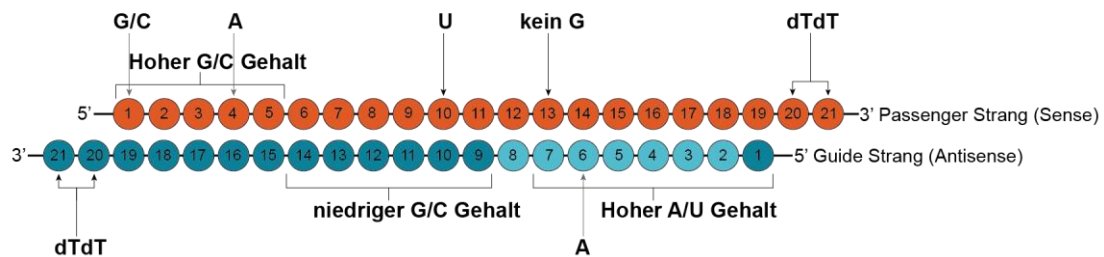


Abbildung 4. Positionsspezifische Nucleobasen und Parameter für effiziente siRNAs am Beispiel einer 19+2mer Struktur. Die *Seed*-Region ist hellblau gekennzeichnet. Abbildung in Anlehnung an FRIEDRICH *et al.* und FAKHR *et al.*^[150, 161]

Insgesamt sollte der G/C Gehalt der gesamten siRNA zwischen 30-60% liegen.^[156, 159] Für die richtige Beladung der siRNA in den RISC ist eine asymmetrische Nucleotid Verteilung im Duplex sowie eine schwache Basenpaarbindung am 5'-Ende des Antisense Strangs notwendig.^[48, 159-160] Die nötige Instabilität und die damit verbundene Reduktion von *off-target* Effekten kann durch einen hohen Gehalt an A/U am 5'-Ende des Antisense Strangs sowie einem hohem G/C Gehalt am 5'-Ende des Sense Strangs erzielt werden.^[154, 157, 160] Ein niedriger G/C Anteil zwischen der Position 9-14 des Antisense Strangs erlaubt eine zusätzliche Flexibilität in dieser Region, was für die Spaltung oder Freisetzung der mRNA von Vorteil sein könnte.^[48] Des Weiteren zeigten AMARZGUIOUI *et al.*, dass die Einführung von A an der 6. Position die Effizienz der siRNA steigern kann.^[160] Weitere Untersuchungen durch JAGLA *et al.* und REYNOLDS *et al.* ergaben für den Sense Strang, dass die Präsenz von A an Position 4 und U an Position 10 sowie die Abwesenheit von G an Position 13 und G oder C an Position 1 die Wirksamkeit der siRNA steigern.^[157-158] Zusätzlich sollten interne Wiederholungen, Palindrome sowie CCC- und GGG-Sequenzen sowohl im Sense als auch im Antisense Strang aufgrund dadurch möglicher Sekundärstrukturen vermieden werden.^[157-158] Integrierte dTdT 3'-Überhänge verleihen dem siRNA Duplex zusätzlich eine gewisse Resistenz gegenüber Nucleasen.^[158-160]

Im Modifikationsmuster der auf dem Markt und in der Entwicklung befindenden siRNA Therapeutika lässt sich die Weiterentwicklung des siRNA-Designs seit der anfänglichen Verwendung von nackten siRNAs erkennen (Abbildung 5).^[10, 41]

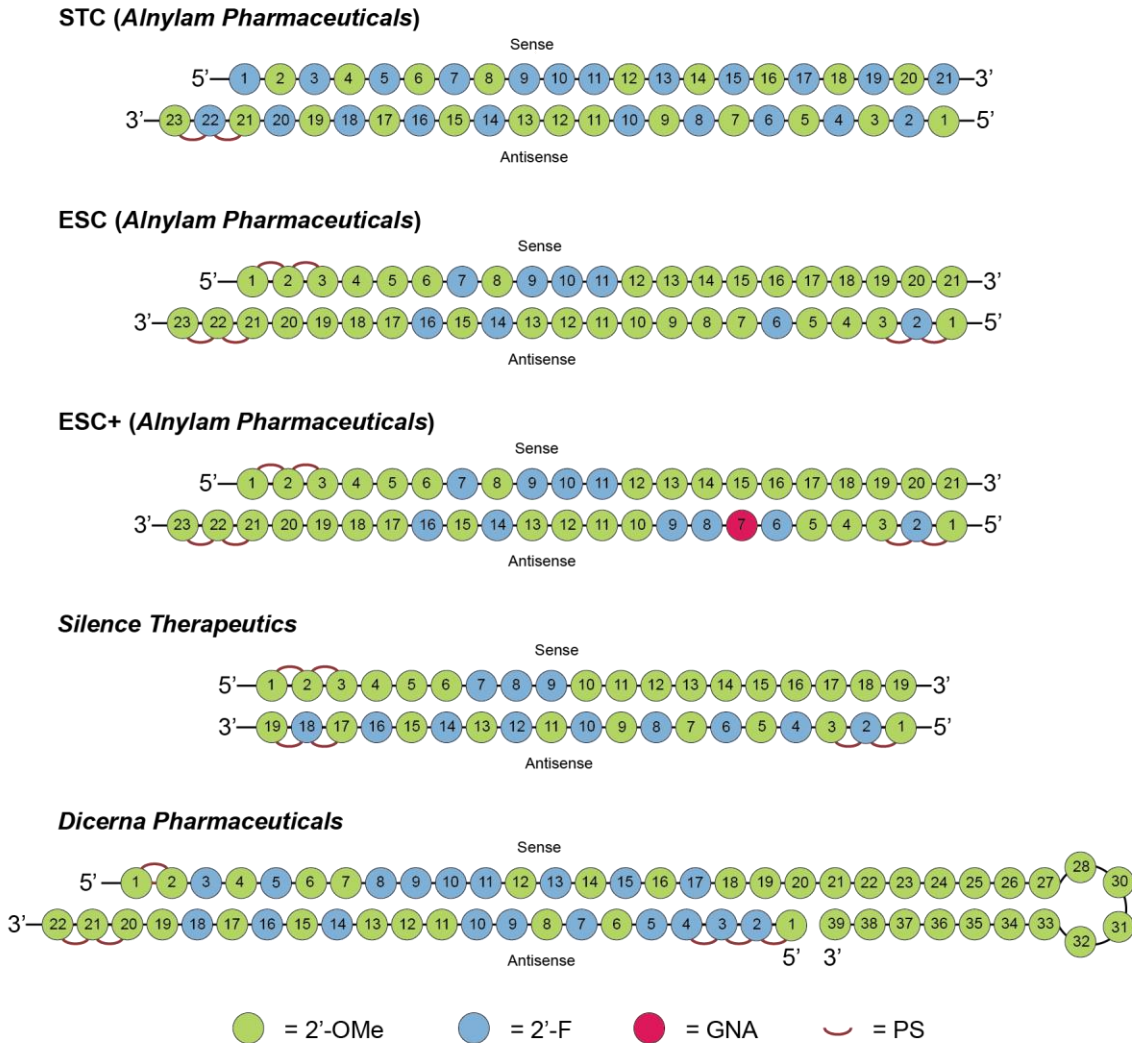


Abbildung 5. Repräsentative Modifikationsmuster von siRNA Therapeutika. Abgebildet sind die von *Alnylam Pharmaceuticals* entwickelten STC, ESC und ESC+ Modifikationsmuster sowie die siRNA-Designs von *Dicerna Pharmaceuticals* und *Silence Therapeutics*. Abbildung in Anlehnung an HU *et al.*^[10]

Bereits 2005 wurde durch ALLERSON *et al.* nachgewiesen, dass vollständig modifizierte siRNAs mit alternierenden 2'-OMe und 2'-F modifizierten Nucleotiden im Gegensatz zu nackten siRNAs die Plasmastabilität und somit die *in vitro* Wirksamkeit um mehr als das 500-fache verbessern.^[162] Auch *in vivo* zeigten diese siRNAs in Kombination mit Phosphorothioaten eine verbesserte Stabilität, was in einer höheren Aktivität der RNAi resultierte.^[163] Eine ähnliche chemische Konfiguration bildet die Grundlage für das von *Alnylam Pharmaceuticals* entwickelte *Standard Template Chemistry* (STC) Modifikationsmuster, auf dem das eingestellte RNAi Therapeutikum Revusiran zur Behandlung von Transthyretin-Amyloidose basiert.^[164-165] Durch weitere Stabilisierung des siRNA Rückgrats entwickelte sich das *Enhanced Stabilization Chemistry* (ESC) Design, auf dem Givosiran zur Behandlung von akuter hepatischer Porphyrie basiert.^[53, 164] Durch die Einführung weiterer Phosphorothioate und der Reduzierung an potentiell toxisch wirkenden 2'-F Modifikationen konnte die Wirksamkeit und die Wirkdauer bei

geringerer Dosierung verbessert werden.^[166-168] Das neueste Design, ESC+, beinhaltet die Einführung einer GNA-Modifikation an Position 7 des Antisense Strangs zur thermischen Destabilisierung in der *Seed*-Region. Dadurch konnte das Sicherheitsprofil in Ratten aufgrund der Verringerung von *off-target* Effekten sowie der daraus resultierenden Hepatotoxizität deutlich verbessert werden.^[133] Auch andere Pharmaunternehmen wie *Arrowhead Pharmaceuticals*,^[169] *Dicerna Pharmaceuticals*^[170] und *Silence Therapeutics*^[171] widmen sich der Entwicklung neuer Modifikationsmuster, um leistungsstarke/wirkungsvolle siRNA Therapeutika zu etablieren.

1.2.3. Transportsysteme

Obwohl die verschiedenen Oligonukleotide unterschiedliche Wirkmechanismen aufweisen, müssen sie alle effektiv und in großer Menge in die betreffenden Zellen eingebracht werden. PS-modifizierte ASOs können ohne ein Transportsystem durch die Interaktion mit membrangebundenen Proteinen von Zellen internalisiert werden,^[14] wobei es hauptsächlich zur Anreicherung in der Leber und den Nieren kommt.^[172] siRNAs benötigen aufgrund ihrer Größe (13-14 kDa), Hydrophilie und des negativ geladenen Rückgrats ein Transportsystem, um ihre therapeutische Wirkung im Gewebe zu entfalten.^[173] Zur Lösung dieser Herausforderungen werden drei Hauptstrategien verfolgt: Transfektion der Oligonukleotide mittels Nanocarrier-Formulierung, die Konjugation der Oligonukleotide mit Molekülen zur Förderung der passiven Zellaufnahme oder Rezeptor-Liganden zur aktiven Adressierung von spezifischen Membranrezeptoren. Voraussetzungen für alle Strategien beinhaltet ein biokompatibles und nicht-immunogenes Transportsystem.^[139, 173-174]

Eine wichtige Klasse an Transportsystemen für Oligonukleotide stellen Nanocarrier dar, zu denen Liposome^[52], Peptide^[175], Dendrimere^[176], Exosome^[177], sphärische Nukleinsäuren (SNAs)^[178] und DNA-Nanostrukturen^[179] zählen. Durch gezieltes Modifizieren können biophysikalische Eigenschaften wie Größe, Morphologie, Struktur und Oberflächeneigenschaften des Nanocarriers kontrolliert werden, wodurch die Stabilität, die zelluläre Aufnahme, der intrazelluläre Transport und die endosomale Freisetzung verbessert werden können.^[29] Das von *Alnylam Pharmaceuticals* entwickelte Patisiran ist in einem Lipid-basierten Nanopartikel (LNP) verpackt, dessen Zusammensetzung den Transport aufgrund der Interaktion zwischen dem absorbierten Apolipoprotein E (ApoE) auf dem LNP und dem *low-density* Lipoprotein (LDL) Rezeptor in Hepatozyten gewährleistet.^[180] Durch das veränderte Verhältnis von kationischen und anionischen Lipiden kann die Aufnahme in die Lunge oder die Milz gezielt gesteuert werden.^[181] Eine Alternative zu LNPs, die eine zelluläre Toxizität hervorrufen, sind

widerstandsfähige endogene Vesikel wie Exosomen, die erfolgreich mit siRNAs, mRNAs und sogar Plasmiden beladen werden können.^[182-183]

Oligonukleotide können durch präzise Konjugation an Liganden, die spezifisch auf den Zielzellen exprimierte Oberflächenrezeptoren adressieren, internalisiert werden.^[29] Als Liganden können verschiedene Biomoleküle wie Proteine^[184], Antikörper^[185-188], Peptide^[71, 189-194], Lipide^[195-199], Kohlenhydrate^[200-201] und Vitamine^[202-203] dienen. Das bekannteste, adressierbare Rezeptorprotein ist der Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR), der lediglich auf Hepatozyten hoch exprimiert ist und spezifisch terminale Galactose- sowie *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc)-Reste bindet.^[204] Dabei ist die Anzahl sowie die räumliche Anordnung der Zuckereinheiten entscheidend für die Bindungsaffinität.^[200, 205-206] Die Rezeptor-Liganden-Bindung ist abhängig vom pH-Wert und dissoziiert unter den sauren Bedingungen im Endosom.^[207] Anschließend wird der ASGPR in einem Zeitrahmen von 15 Minuten an die Zelloberfläche recycelt.^[208] Diese Eigenschaften machen den ASGPR zum idealen Rezeptor für aktives *Targeting* und führten in Kombination mit dem von MANOHARAN und seinen Mitarbeitern optimierten trivalenten GalNAc-Liganden zu einer Reihe an zugelassenen siRNA-Konjugaten.^[28, 133, 167-168, 209-212] Für die zukünftige Behandlung von extra-hepatozytischen Erkrankungen wird weiterhin an neuen *Targeting*-Plattformen geforscht. UEHARA *et al.* zeigten, dass der auf Makrophagen und dendritischen Zellen vorkommende Mannose Rezeptor C-Typ 1 (CD206) selektiv durch eine mit vier α -Mannose-Einheiten konjugierte siRNA adressiert werden kann und folglich zur Runterregulation des Zielgens führt.^[201] Ein weiterer vielversprechender Rezeptor ist der ubiquitär exprimierte Transferrin Rezeptor (TfR), der aufgrund seiner Expression auf Hirn-Endothelzellen zunehmend Interesse weckt.^[213] TfR-gerichtete Liganden könnten somit das Haupthindernis - die Blut-Hirn-Schranke - zur Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems überwinden.^[214-215] Darüber hinaus konnten SUGO *et al.* bereits zeigen, dass TfR durch Antikörper-siRNA-Konjugate adressiert werden kann, um ein *Gen-Silencing* in Muskelgewebe zu bewirken.^[187] Trotz der vielversprechenden Ansätze und zahlreichen weiteren Strategien^[216-218] bleibt der effiziente und spezifische Transport von therapeutischen Oligonukleotid-Konjugaten in nicht-hepatozytische Zielgewebe eine Herausforderung, die überwunden werden muss.

1.2.4. Endosomale Freisetzung

Oligonukleotide werden, nachdem sie das Ziel-Gewebe erreicht haben, mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen.^[76, 219] Nach der Internalisierung durchlaufen diese verschiedene endosomale Reifestadien, angefangen beim frühen Endosom über das späte Endosom, von dem

aus die Oligonukleotide entweder ans Lysosom für die Degradierung oder an multivesikuläre Körper für die Exozytose weitergeleitet werden können.^[11, 220-221] Die Freisetzung von Oligonukleotiden aus dem Endosom ist für die therapeutische Anwendung essenziell und stellt gleichzeitig aufgrund der molekularen Größe, der Hydrophilie sowie des negativ geladenen Phosphor-Zucker-Rückgrats eine der größten Herausforderungen dar. Es wurde gezeigt, dass lediglich 1-2 % der GalNAc-konjugierten Gapmere^[222] und 0,3 % der GalNAc-konjugierten siRNAs^[223] ins Zytosol gelangen und *in vivo* mit ihrer Ziel-Sequenz interagieren. Die restlichen rund 99 % des therapeutischen Oligonukleotides bleiben in den Endosomen eingeschlossen.^[224-225] Die niedrigen Freisetzungsraten aus dem Endosom, der Abbau der Oligonukleotide durch lysosomale Enzyme und Exozytose limitieren die Menge an verfügbarem Oligonukleotid für eine therapeutische Wirkung.^[72-73] Gleichzeitig dienen die eingeschlossenen Oligonukleotide als Depot, die über einen längeren Zeitraum langsam aus dem Endosom entweichen können, was zu einer längeren Wirkdauer führt.^[73] Folglich ist es von entscheidender Bedeutung, ein Gleichgewicht zwischen der Verbesserung der endosomalen Freisetzung für eine bessere Wirksamkeit und dem Depot-Effekt für eine längere Wirkdauer zu wahren.^[76]

Der Mechanismus der Freisetzung von Oligonukleotiden aus dem Endosom in das Zytoplasma ist trotz jahrzehntelanger Forschung bis heute nicht aufgeklärt und limitiert die Entwicklung von effizienten *Delivery*-Systemen. Für viele potenzielle Ansätze zur Freisetzung aus dem Endosom bildet die Änderung des pH-Werts von der Aufnahme an der Zelloberfläche (pH \approx 7,4) bis hin zum Lysosom (pH \approx 4,5) die Basis.^[220-221, 226] Moleküle, die aufgrund des niedrigen pH-Werts im Endosom protoniert werden können, führen durch die Aufnahme von H₂O, H⁺ und Cl⁻ zur Steigerung des osmotischen Drucks und schließlich zur Ruptur des Endosoms (*Proton-Sponge*-Effekt) oder zur Membrandestabilisierung.^[10, 224, 227-228] *Small Molecules*, wie das Malariamedikament Chloroquin^[229] oder das von BOST *et al.* entwickelte CMP05^[230], welches bereits eine verbesserte Aufnahme von SSOs ermöglicht hat, können durch den *Proton-Sponge*-Effekt die endosomale Freisetzung induzieren. Ein weiteres bereits für Oligonukleotide eingesetztes *Small Molecule* ist Amphotericin B, dass durch die Ausbildung von Transmembranporen die Membrandestabilisierung induziert.^[231-232] Ein weiterer vielversprechender Ansatz sind zellpenetrierende Peptide (CPPs).^[227, 233] Viele der kurzen kationischen und/oder amphipathischen Peptide haben ihren Ursprung in natürlich vorkommenden Proteinelementen.^[234] Das kationische Peptid TAT (48-60) und das amphipathische Peptid Penetratin, die von dem HIV-1-TAT-Transaktivator Protein und der Homöodomäne des Antennapedia-Proteins abgeleitet sind,^[235-236] führten jeweils bei einer Konjugation an eine siRNA zu einer Steigerung des Gen-*Silencing in vivo*.^[237] BROWN *et al.* zeigten, dass die Verabreichung des amphipathischen GalNAc-INF7-Peptid Konjugats nach der Applizierung einer GalNAc-konjugierten siRNA zu einer deutlichen Steigerung des Gen-*Silencing*

in vivo führen kann.^[223] Das von der SZOKA Gruppe synthetische amphipathische GALA-Peptid nimmt bei einem niedrigen pH-Wert eine spiralförmige Konformation an und induziert eine Destabilisierung der Lipiddoppelschicht.^[238] Die HARASHIMA Gruppe zeigte, dass die Modifikation eines kationischen Liposoms, bestehend aus Phosphatidylcholin und Cholesterin, mit dem GALA-Peptid den Transport sowie die endosomale Freisetzung von siRNA verbessert.^[239]

Obwohl es mit den verschiedenen Ansätzen für Oligonukleotid Therapeutika möglich ist, aus dem Endosom zu entkommen, besteht die Herausforderung darin, ein bestimmtes Maß zwischen der Freisetzung und unerwünschten Nebeneffekten zu wahren. Daher sind die Kriterien für das „Freisetzungsmolekül“ nahezu endlos. Zu den Kriterien zählen laut STEVEN DOWDY (I) eine ≥ 10 -fach höhere Freisetzungsrates, (II) eine kovalente Bindung zum Oligonukleotid für die ortsspezifische Wirkung, (III) ein lediglich im Endosom aktiver Mechanismus, (IV) idealerweise nur eine lokale Zerstörung der endosomalen Membran anstatt einer Ruptur des gesamten Endosoms, (V) eine metabolische Stabilität zur Verhinderung einer vorzeitigen Aktivierung/ eines vorzeitigen Abbaus, (VI) keine Beeinflussung oder Dominierung der Targeting-Domäne, (VII) eine Umgehung des adaptiven Immunsystems und Ermöglichung mehrfacher Verabreichungen durch Vermeidung von Protein- und Peptid-basierten Molekülen (VIII) keine Toxizität der möglichen Nebenprodukte sowie (IX) eine hohe Skalierbarkeit der Synthese für die klinische Anwendung.^[225] Diese Eigenschaften müssen durch innovative Ideen umgesetzt werden, damit Oligonukleotid Therapeutika zukünftig effizienter die endosomalen Kompartimente verlassen können, um das Zytosol oder den Zellkern zu erreichen und dort ihr vollständiges Potential zu entfalten.

1.3. Potential von Konjugations- und Linkerstrategien

Biokonjugation ist ein mächtiges Werkzeug zur Funktionalisierung von Oligonukleotid Therapeutika. Durch die kovalente Bindung des Oligonukleotides an spezifische Moleküle können verschiedene Herausforderungen wie die Erhöhung der Bioverfügbarkeit und die Verlängerung der biologischen Halbwertszeit verbessert werden. Auch die Verbesserung der Pharmakokinetik und die gezielte Abgabe an bestimmte Gewebe oder Zelltypen können dadurch ermöglicht werden. Darüber hinaus kann die Internalisierung in die Zielzellen und die effiziente Flucht aus dem Endosom erleichtert werden. Diese Maßnahmen tragen zur Erhöhung der Wirksamkeit und zur Minimierung von Nebenwirkungen bei.^[240] Aufgrund der bemerkenswerten Möglichkeiten für die therapeutische Anwendung ist die Entwicklung von neuen Modifikationsperspektiven essenziell.

Die Modifikation von Oligonukleotiden kann an unterschiedlichen Positionen innerhalb des Moleküls mit verschiedenen Strategien erfolgen, wodurch eine Vielzahl an Biokonjugaten mit unterschiedlichen Eigenschaften generiert werden können (Abbildung 6a). Insbesondere die 3'- und 5'-Enden der Oligonukleotide werden bevorzugt mit Liganden konjugiert, um die Basenpaarung nicht zu beeinträchtigen.^[76] Allerdings haben Studien gezeigt, dass eine 5'-Phosphorylierung des Antisense Strangs in siRNAs von großer Bedeutung für die Interaktion mit der MID-Domäne des AGO2 ist und daher nicht chemisch modifiziert werden sollte.^[47-48, 241] Obwohl beide Stränge in den RISC-Komplex geladen werden, wird die Konjugation des Sense Strangs zur möglichen Verringerung von *off-target* Effekten und zur Bewahrung des *on-target* Potentials bevorzugt. Die Modifikation des Phosphor-Zucker-Rückgrats sowie der Nucleobasen ist ebenfalls denkbar und bietet eine gewisse Flexibilität in Bezug auf die Anzahl sowie die Positionierung der Konjugation (Abbildung 6b).^[242]

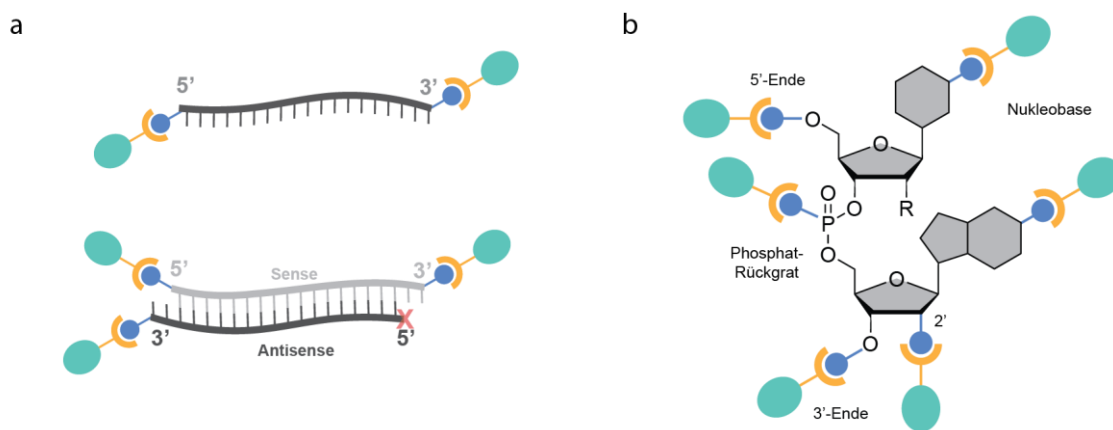


Abbildung 6. (a) Präferierte Konjugationsstellen in ASOs und siRNAs. (b) Potenzielle Konjugationsstellen in Oligonukleotiden. Abbildung in Anlehnung an MANGLA *et al.*^[76]

Im Zusammenhang mit therapeutischen Oligonukleotiden werden funktionale Linker zur Konjugation von Liganden immer relevanter. Dabei besteht die Herausforderungen für Linker darin, optimale pharmakokinetische Eigenschaften und eine hohe Stabilität im Blutkreislauf aufzuweisen und gleichzeitig die spezifische Freisetzung des Oligonukleotides in der Zielzelle zu ermöglichen.^[243-244] Für einen maximalen therapeutischen Effekt sind Faktoren wie Länge, Flexibilität sowie Löslichkeit der Linker Struktur ausschlaggebend.^[76] Abhängig vom therapeutischen Vorhaben können sowohl spaltbare als auch nicht-spaltbare Linker eingesetzt werden. Stabile Linker-Strategien beruhen vorwiegend auf Amid-, Triazol- sowie Maleimid-Verknüpfungen (Abbildung 7). Spaltbare Linker hingegen nutzen meistens Strategien, die auf der intrazellulären reduktiven Umgebung oder auf der pH-Änderung von Zelleintritt bis hin zum lysosomalen Kompartiment basieren (Abbildung 8).^[76, 245]

Nicht-spaltbare Linker

Die Amid-Bindung kann durch die biokompatible Reaktion einer in das Oligonukleotid integrierten primären Amin-Gruppe und einer aktivierten Carbonsäure gebildet werden und beeinflusst nur minimal die physiochemischen Eigenschaften des gebildeten Konjugats.^[76] Folglich wurde die Konjugationsstrategie bereits für zahlreiche Konjugate wie GalNAc-Oligonukleotide, lipophile Oligonukleotide und Antikörper-Oligonukleotide verwendet.^[53-56, 195-196, 246-249]

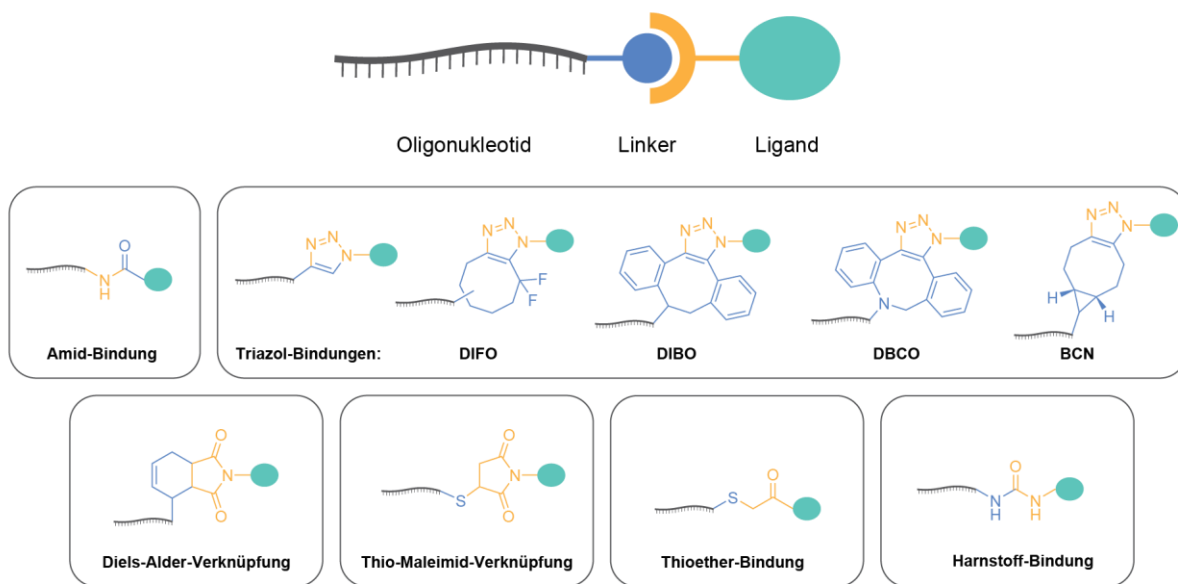


Abbildung 7. Gängige stabile Verknüpfungsstrategien zur Funktionalisierung von Oligonukleotiden mit Liganden.

Die Click-Chemie hat sich zu einem mächtigen Werkzeug in der Konjugationschemie entwickelt. Der von SHARPLESS geprägte Begriff der Click-Chemie umfasst mit wässrigen Lösungen kompatible, selektive und stereospezifische Reaktionen, die eine breite Anwendung mit sehr hohen Ausbeuten aufweisen.^[250] Ein Beispiel ist die auf der Huisgen Cycloaddition^[251] basierende Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC)^[252-253]. Die synthetisch einfach zugänglichen Azid und Alkin Funktionalitäten sind aufgrund ihrer nicht vorhandenen Reaktivität gegenüber anderen in der Natur vorkommenden funktionalen Gruppen bedingt bioorthogonal sowie biokompatibel und reagieren unter der Zugabe von Cu^I quantitativ zum chemisch stabilen 1,4-disubstituierten Triazol.^[254] Aufgrund der Tatsache, dass exogene Metalle wie Kupfer bereits in geringen Konzentrationen *in cellulo* sowie *in vivo* eine Cytotoxizität aufweisen,^[255-256] führte zu einem erheblichen Interesse an der Entwicklung von vergleichbaren sowie physiologisch kompatiblen Click-Reaktionen.^[257] Im Zusammenhang mit der Konjugation von Oligonukleotiden findet auch die sogenannte *Strain-Promoted* Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC)^[258] Anwendung.

Diese basiert auf der in 1961 von WITTIG und KREBS gemachten Beobachtung, dass die Reaktion von Cyclooctin mit Phenylazid unmittelbar zu dem entsprechenden Triazol-Derivat in hohen Ausbeuten erfolgte.^[259] Grund für die hohe Reaktivität ist die Ringspannung des Cyclooctins, da es das Alkin in einen Bindungswinkel von 163° zwingt.^[258, 260] Neuartig substituierte Cyclooctine wie Difluorocyclooctin (DIFO)^[261] und Dibenzocyclooctin (DIBO)^[262] konnten die Reaktionsrate deutlich verbessern, wiesen allerdings eine fehlende Regioselektivität bei der durch die Ringspannung induzierten Cycloaddition auf. Die daraufhin entwickelten achiralen Cyclooctine Dibenzoazacyclooctin (DBCO)^[263] und Bicyclo[6.1.0]nonin (BCN)^[264] resultieren in der Bildung eines einzelnen Regioisomers und stellen heutzutage eine beliebte Konjugationsstrategie für Oligonukleotide dar.^[218, 265-267] Eine weitere Möglichkeit zur Konjugation sind Diels-Alder- und inverse Diels-Alder-Reaktionen, in denen es zur Reaktion zwischen einem Dienophil und einem Dien kommt. Das Dien kann dabei direkt in das Oligonukleotid integriert werden, da es unter den Synthese Bedingungen stabil ist.^[268]

Eine weitere potenzielle hocheffiziente Reaktion zur Biokonjugation stellt die Michael-Additionen dar.^[254, 257] Maleimide werden häufig als Michael-Akzeptoren zur Konjugation von Oligonukleotiden verwendet, da diese mit primären Thiolen in wässriger Lösung ohne die Zugabe eines Katalysators zu stabilen Thio-Maleimid-Linkern reagieren.^[76] Sowohl die Einführung einer Maleimid-Einheit als auch die einer Thiol-Gruppe in das Oligonukleotid ist möglich, wodurch die direkte Konjugation mit Antikörpern oder funktionalisierten Peptiden erfolgen kann.^[187, 217, 269] Weitere Verknüpfungsstrategien über Thioether oder Harnstoff können durch nukleophile Addition erfolgen.^[270]

Spaltbare Linker

Disulfidbindungen stellen aufgrund des Redoxunterschieds zwischen dem oxidierenden extrazellulären und dem reduzierenden intrazellulären Raum einen vielversprechenden Ansatz dar.^[271] Die Reduktion des Disulfids kann durch Glutathion erfolgen, dessen Konzentration im Zytosol (1-10 mM) deutlich höher ausfällt als im Plasma (1-6 μM).^[272-274] Zur Vermeidung von Homodimeren können Disulfide durch die Reaktion einer aktivierten Thiol-Gruppe wie S-Pyridylthiol mit einem Thiol gebildet werden.^[275-276] Disulfidbindungen können nicht nur als Konjugationsstrategie verwendet werden,^[277] sondern auch zur Freisetzung des Oligonukleotides vom Liganden in Linker Strukturen integriert werden. Der von PONTARELLI *et al.* entwickelte Phosphoramidit-Linker mit Disulfidbindung und terminaler Tosyl-Gruppe kann mittels Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut und anschließend zur weiteren Funktionalisierung post-synthetisch modifiziert werden.^[278]

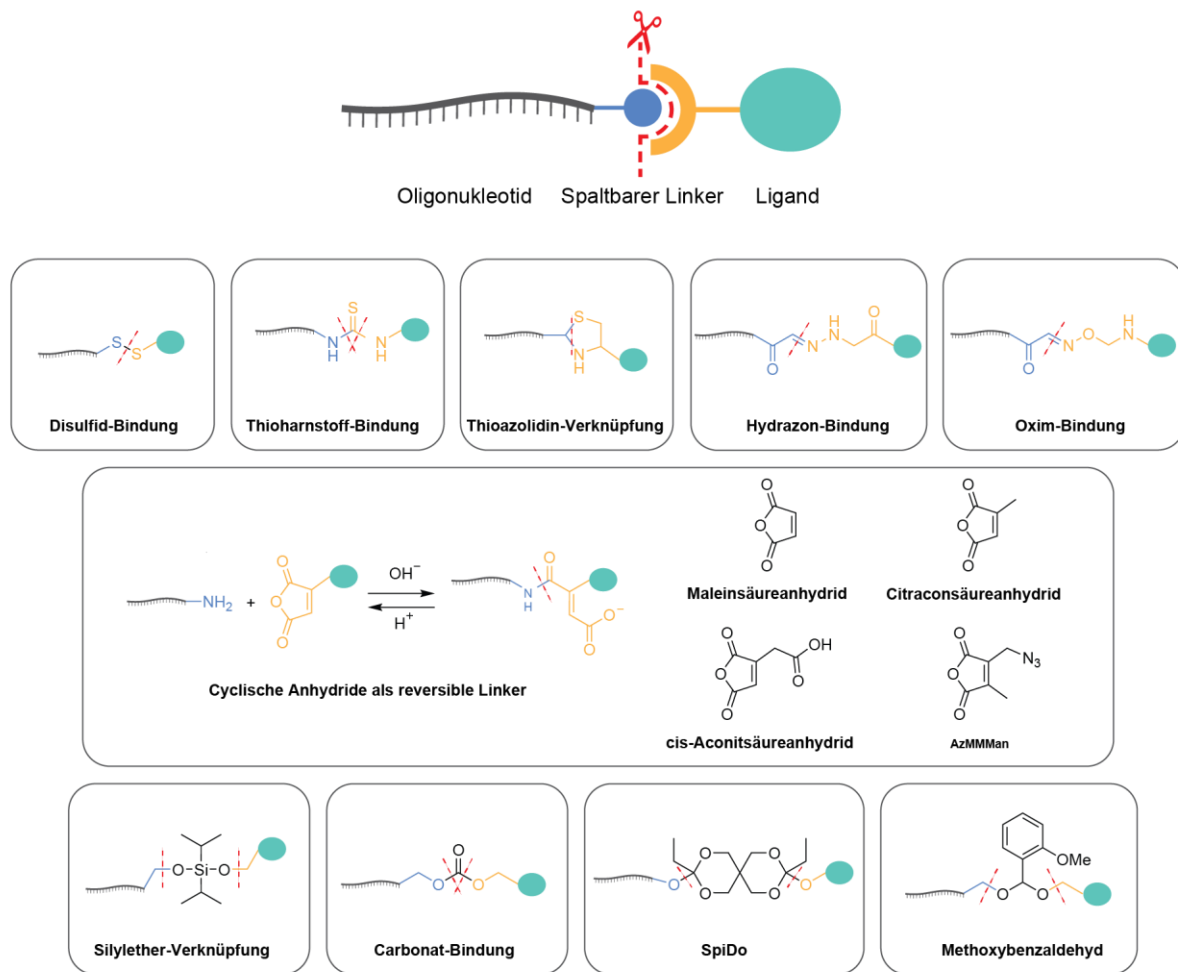


Abbildung 8. Spaltbare Verknüpfungsstrategien zur Funktionalisierung von Oligonukleotiden mit Liganden.

Effiziente pH-sensitive Linker müssen zum einen eine hohe Stabilität bei physiologischem pH-Wert aufweisen und zum anderen im sauren Milieu hydrolysieren, um somit eine Freisetzung zu erzielen.^[243] Spaltbare Linker umfassen eine Reihe verschiedener Reaktionen, wie die eines primären Amins mit Isothiocyanat zu Thioharnstoff oder die eines Aldehyds mit einer 1,2-Aminothiold-Gruppe zu Thiazolidin, einer Hydrazin-Gruppe zu Hydrazon oder einer Aminoxy-Gruppe zu Oxim.^[270] Die Synthese von 5'-lipophilen Oligonukleotid-Konjugaten über eine Hydrazon-Verbindung konnte durch MESCHANINOVA *et al.* gezeigt werden.^[279] Eine weitere Möglichkeit sind zyklische Anhydrid-Derivate wie Maleinsäureanhydrid, Citraconsäureanhydrid und *cis*-Aconitsäureanhydrid, die durch säurekatalysierte Hydrolyse der Amidbindung in der Freisetzung eines Amins resultieren.^[280-282] Der von der WAGNER Gruppe publizierte Azidomethyl-Methylmaleinsäureanhydrid (AzMMMan)-Linker ermöglicht zusätzlich die Funktionalisierung mittels Click-Chemie und wird spurlos im leicht sauren Milieu wie in Tumorgewebe oder dem frühen Endosom gespalten.^[283] Des Weiteren können die säurelabilen Gruppen in den Linker integriert werden. Potenzielle Ansätze bieten die bereits für Antikörper-

Wirkstoff-Konjugate (ADC) entwickelten Linker. Mylotarg und Besponsa von *Pfizer* sowie Trodelvy von *Gilead Sciences* konnten durch die Integration von Hydrazon- und Carbonat-basierten Linkern erste klinische Erfolge erzielen.^[284-287] Eine verbesserte Stabilität weist der 2019 entwickelte, neuartige Silylether-basierte Linker auf, dessen Halbwertszeit sich im menschlichen Plasma auf $t_{1/2} = 7$ d beläuft.^[288] Neben Hydrazon-, Carbonat- und Silylether-Linkern besitzen weitere chemische Einheiten wie Acetale oder Orthoester das Potential, unter sauren Bedingungen selektiv gespalten zu werden. JACQUES *et al.* untersuchten *in vitro* die lysosomale Spaltung des reaktiven sowie selektiven Spirodiorthoester (SpiDo), der nach 90 Minuten eine signifikante Hydrolyse bei pH 5 und 6 zeigt.^[289-290] Eine noch geringere Hydrolyserate wies der Methoxybenzaldehyd Acetal-Linker auf,^[289] was das Potential von Acetal-Linkern in Bezug auf Plasmastabilität bei gleichzeitiger selektiver Freisetzung unter lysosomalen Bedingungen zeigt.

Verschiedene Ansätze werden für die Entwicklung von effizienten Linkern für Oligonukleotid-Konjugate verfolgt. Faktoren wie die Stabilität im biologischen Medium, chemische und biologische Reaktivität, Spaltbarkeit und Löslichkeit des Linker sind essenziell für die Eigenschaften des gewünschten Konjugats und diesbezügliche Entscheidungen werden anhand der Anforderung der therapeutischen Anwendung getroffen.^[291] Die zunehmende Präsenz von Biokonjugaten in der pharmazeutischen Entwicklung verdeutlicht, dass hochspezifische Biokonjugationschemie sowie die Entwicklung von effizienten Linkern zu den Schlüsselementen in der Weiterentwicklung von Nukleinsäure-basierten Therapeutika zählen.^[240]

2. Aufgabenstellung

Die Geschwindigkeit der Ausbreitung des Coronavirus SARS-CoV-2 (schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus Typ 2) im Jahr 2019 resultierte in einer weltweiten Pandemie und verdeutlichte die Notwendigkeit anpassungsfähiger antiviraler Strategien zur Bekämpfung von RNA-Viren. Daher liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Erforschung von Methoden, die eine schnelle Anpassung ermöglichen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Entwicklung einer siRNA im Fokus stehen, die potenziell zur Prävention oder Behandlung einer SARS-CoV-2 Infektion eingesetzt werden kann. Im Mittelpunkt sollte die Erhöhung der Nuklease Resistenz und folglich der Halbwertszeit durch die Optimierung der Stabilität der siRNA durch chemische Modifikationen stehen. Die Herausforderung der effizienten sowie zielgerichteten Aufnahme der siRNAs in Lungenzellen und -gewebe sollte durch das Adressieren des Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (ACE2) Rezeptors erzielt werden. Hierfür sollte eine Alkin-Funktionalität in die siRNA inkorporiert werden, die eine Konjugation mittels Cu^I-katalysierter Click-Chemie an ein ACE2-bindendes Peptid ermöglicht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Etablierung eines Linker-Systems erfolgen, das die effiziente Konjugation mehrerer *Targeting*-Moleküle ermöglicht. Ziel ist es, durch präzise post-synthetische Modifizierung mit Zuckern oder Peptiden die gezielte Adressierung und Aufnahme in spezifische Zelltypen zu untersuchen.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte eine weitere Modifizierungsmöglichkeit in die siRNA integriert werden. Diese sollte zur Konjugation von diversen endosomalen *Escape* induzierenden Molekülen genutzt werden, um die Freisetzung aus dem Endosom zu untersuchen. Studien hierzu sind entscheidend, um die Wirksamkeit von Oligonukleotid Therapeutika langfristig zu steigern.

3. Veröffentlichte Arbeiten

3.1. Unterdrückung der SARS-CoV-2 Replikation mit stabilisierten und durch Click-Chemie modifizierten siRNAs

„*Suppression of SARS-CoV-2 Replication with Stabilized and Click-Chemistry Modified siRNAs*“
F. R. Traube[#], M. Stern[#], A. J. Tölke[#], M. Rudelius, E. Mejías-Pérez, N. Raddaoui, B. M. Kümmerer, C. Douat, F. Streshnev, M. Albanese, P. R. Wratil, Y. V. Gärtner, M. Nainytė, G. Giorgio, S. Michalakis, S. Schneider, H. Streeck, M. Müller, O. T. Keppler*, T. Carell*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, 61, e202204556.

[#]: Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zur Publikation beigetragen.

*: Korrespondierende Autoren

Prolog

SARS-CoV-2 (schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus Typ 2) ist das Coronavirus, das als Auslöser der Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19) identifiziert wurde und zu einer weltweiten Pandemie führte. Die Geschwindigkeit der Ausbreitung und die Entstehung von aggressiven SARS-CoV-2 Varianten erforderte die Entwicklung von antiviralen Medikamenten, die schnell an Mutationen anpassbar sind. Dieses Manuskript zeigt das Potential von chemisch modifizierten und stabilisierten siRNAs für die Entwicklung von antiviralen Therapeutika in Bezug auf SARS-CoV-2. Die anhand des SARS-CoV-2 Genoms entworfenen und optimierten siRNA Sequenzen zeigten eine deutliche Reduktion in der Viruslast sowie der virusinduzierten Zytotoxizität in mit SARS-CoV-2 infizierten Zelllinien. Darüber hinaus konnte die schnelle Anpassungsfähigkeit von siRNAs aufgrund einer Virusmutation in der siRNA-Binderegion demonstriert werden. Als potenzieller Ansatz für den Transport in die Zelle wurde die effizienteste siRNA mittels Cu^I-katalysierter Click-Chemie mit einem ACE2-bindenden Peptid konjugiert. Die Peptid-konjugierte siRNA führte zur Verringerung der Virusreplikation und der virusinduzierten Apoptose in mukoziliären 3D-Lungenmikrogeweben.

Autorenbeitrag

Im Rahmen dieser Veröffentlichung war ich für die Synthese und Aufreinigung der verschiedenen Oligonukleotide verantwortlich. Außerdem war ich für die Entwicklung und Durchführung der Click-Reaktionen zuständig, wodurch die Oligonukleotide mit Peptiden oder Fluorophoren konjugiert wurden. Des Weiteren habe ich die Untersuchungen bezüglich der

Stabilitäten der unterschiedlich modifizierten siRNAs geplant und durchgeführt. FRANZISKA TRAUBE hat die biologischen Untersuchungen außerhalb des P3 Labors und MARCEL STERN innerhalb des P3 Labors durchgeführt und beaufsichtigt. Dabei wurden wir von ERNESTO MEJÍAS-PÉREZ, NADA RADDAOUI, FILIPP STRESHNEV, MANUEL ALBANESE, PAUL WRATIL, YASMIN GÄRTNER und MILDA NAINYTĖ unterstützt. MARTINA RUDELIUS hat die RNA-FISH-Experimente durchgeführt, analysiert und die Apoptose quantifiziert. HENDRIK STREECK und BEATE KÜMMERER waren verantwortlich für die Vero-E6 Studien. CÉLINE DOUAT hat das Peptid synthetisiert. NADA RADDAOUI, GRAZIA GIORGIO und STYLIANOS MICHALAKIS führten die konfokale Mikroskopie durch. SABINE SCHNEIDER und MARKUS MÜLLER waren für das Design der siRNA Sequenzen zuständig. OLIVER KEPPLER und THOMAS CARELL leiteten und überwachten die gesamte Studie.

Lizenz

Kopie der *Open Access* Publikation auf Basis der *Creative Commons CC BY License*, die den nicht-kommerziellen Abdruck des Artikels erlaubt.

Artikel einsehbar unter:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.202204556>

Lizenz einsehbar unter:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Die Hintergrundinformationen dieser Veröffentlichung sind im Anhang II abgebildet.

SARS-CoV-2

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202204556

International Edition: doi.org/10.1002/anie.202204556

German Edition: doi.org/10.1002/ange.202204556

Suppression of SARS-CoV-2 Replication with Stabilized and Click-Chemistry Modified siRNAs

Franziska R. Traube⁺, Marcel Stern⁺, Annika J. Tölke⁺, Martina Rudelius,
 Ernesto Mejías-Pérez, Nada Raddaoui, Beate M. Kümmerer, Céline Douat, Filipp Streshnev,
 Manuel Albanese, Paul R. Wratil, Yasmin V. Gärtner, Milda Nainytė, Grazia Giorgio,
 Stylianos Michalakis, Sabine Schneider, Hendrik Streeck, Markus Müller, Oliver T. Keppler,*
 and Thomas Carell*

Abstract: The emergence of more transmissible or aggressive variants of SARS-CoV-2 requires the development of antiviral medication that is quickly adjustable to evolving viral escape mutations. Here we report the synthesis of chemically stabilized small interfering RNA (siRNA) against SARS-CoV-2. The siRNA can be further modified with receptor ligands such as peptides using Cu^I-catalysed click-chemistry. We demonstrate that optimized siRNAs can reduce viral loads and virus-induced cytotoxicity by up to five orders of magnitude in cell lines challenged with SARS-CoV-2. Furthermore, we show that an ACE2-binding peptide-conjugated siRNA is able to reduce virus replication and virus-induced apoptosis in 3D mucociliary lung microtissues. The adjustment of the siRNA sequence allows a rapid adaptation of their antiviral activity against different variants of concern. The ability to conjugate the siRNA via click-chemistry to receptor ligands facilitates the construction of targeted siRNAs for a flexible antiviral defence strategy.

Introduction

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the causative agent of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, resulting in a high disease burden and socioeconomic distress. The current success in curbing the COVID-19-related death toll is based to a large extent on chemically modified messenger RNA (mRNA)-based vaccines.^[1] However, the emergence of SARS-CoV-2 variants of concern (VoCs) has reduced the protective efficacy of vaccination.^[2] This makes the development of variant-adjusted vaccines or of alternative anti-viral therapies a prime global goal. One emerging concept in anti-COVID-19 medication involves the development of nucleic acid-based therapeutics, which can degrade the viral genome and can be quickly adjusted to viral mutations. This fast adjustability is a major advantage of nucleic acid-based therapies in comparison to other antiviral medications, e.g. antibodies that target the SARS-CoV-2 spike protein (S protein).^[3] Mutations in the S protein reduce the efficacy of therapeutic, neutralizing monoclonal antibodies.^[4] Small molecule-based anti-SARS-CoV-2 compounds have recently also entered the market, but their efficacy is potentially also

[*] Dr. F. R. Traube,⁺ MSc. A. J. Tölke,⁺ Dr. N. Raddaoui, MSc. F. Streshnev, MSc. Y. V. Gärtner, Dr. M. Nainytė, Dr. S. Schneider, Dr. M. Müller, Prof. Dr. T. Carell
 Department of Chemistry

Ludwig-Maximilians-Universität München
 Butenandtstr. 5–13, 81377 Munich (Germany)
 E-mail: Thomas.carell@lmu.de

Dr. M. Stern,⁺ Dr. E. Mejías-Pérez, Dr. M. Albanese, Dr. P. R. Wratil,
 Prof. Dr. O. T. Keppler

Max von Pettenkofer Institute and Gene Center
 Ludwig-Maximilians-Universität München
 Feodor-Lynen-Straße 25, 81377 Munich (Germany)
 E-mail: Keppler@mvp.lmu.de

Prof. Dr. M. Rudelius
 Institute of Pathology, Ludwig-Maximilians-Universität München
 Marchioninstr. 68, 81377 Munich (Germany)

PD Dr. B. M. Kümmerer, Prof. Dr. H. Streeck
 Institute of Virology, Universitätsklinikum Bonn
 Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn (Germany)

PD Dr. B. M. Kümmerer
 German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site
 Cologne/Bonn
 53127 Bonn (Germany)

Dr. C. Douat
 Department of Pharmacy
 Ludwig-Maximilians-Universität München
 Butenandtstr. 5–13, 81377 Munich (Germany)

MSc. G. Giorgio, Prof. Dr. S. Michalakis
 Department of Ophthalmology, University Hospital
 Ludwig-Maximilians-Universität München
 80336 Munich (Germany)

[⁺] These authors contributed equally to this work.

© 2022 The Authors. Angewandte Chemie International Edition published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

threatened by mutations in the respective viral enzymes as well as potential side effects that impact their risk profile.^[5]

Nucleic acid-based therapeutics include small interfering RNAs (siRNAs). These are about 21 base-pair long, non-coding RNA duplexes that are able to induce degradation of complementary cellular RNAs. After cellular uptake, the siRNA duplex is loaded into the RNA-induced silencing complex (RISC). Here, the duplex is processed to a single strand that binds with high specificity to complementary RNAs present in the cytosol, resulting in their cleavage.^[6] siRNA therapeutics are already in clinical use, which proves the validity of the concept.^[7]

SARS-CoV-2 is a positive-sense, single-stranded RNA virus, which enters the host cell via the human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) receptor. The viral RNA genome needs to be replicated for the assembly of new virus particles. In addition, the viral genomic RNA is copied into subgenomic mRNAs (sgmRNAs) for the biosynthesis of viral proteins.^[8] Hence, during productive infection, the virus produces two types of single-stranded RNAs (ssRNAs) and both the genomic RNA and the sgmRNA strands are in principle targetable by siRNA-mediated cleavage, which creates a dual-hit possibility.^[9] Such an siRNA-based degradation concept has the advantage that the siRNAs can be rapidly adjusted if mutations occur in the viral target RNA sequences. It also allows the simultaneous targeting of multiple viral genomic sites. Altogether, these advantages make an siRNA-based approach a promising concept to target and control constantly evolving RNA viruses.

Results and Discussion

To investigate the feasibility of an siRNA-based strategy against SARS-CoV-2, we analysed the genomic structure of the virus and designed several siRNAs (**L1**, **R-2** to **R-5**, **S-6** to **S-9**) complementary to different viral RNA target regions (Figure 1a, Figure S1a, Table S1). All of them were designed to contain two 2'-deoxy-thymidine (T) nucleotides at the respective 3'-ends to increase the stability towards exonuclease-based degradation.^[10] Using this design principle, we prepared several siRNAs against the coding regions of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp, Nsp12), the S protein and the 5'-leader sequence (L) (Figure 1a). A non-targeting (scrambled) siRNA (**Ctrl.-10**) served as a negative control.

The efficacy of the designed siRNAs was first assessed in a human lung adenocarcinoma cell line A549 with the help of a dual-luciferase reporter assay (Figure S1b, Table S2). For the assay, A549 were transfected with a plasmid that encodes for *Renilla* luciferase and the firefly luciferase. The *Renilla* luciferase reporter gene was fused to small genomic target sequences of SARS-CoV-2. Efficient targeting of the designed siRNAs resulted in degradation of the *Renilla* luciferase transcript and consequently lower protein expression. As a readout, the *Renilla* luciferase activity was quantified relative to the firefly luciferase activity that served as an intraplasmid-encoded reporter for normalization to balance differences in the transfection efficiency.

Using this assay, we detected for the siRNAs **L-1** (target: L), **R-2** and **R-5** (target: RdRp, Nsp12) and **S-6** (target: S) high knockdown efficiencies between 80 % and 92 % relative to the non-targeting control siRNA with a scrambled sequence (**Ctrl.-10**, Figure 1b).

Following this initial pre-screening, we measured the antiviral potency of the four most promising siRNAs in Vero-E6 cells infected with an authentic, replication-competent SARS-CoV-2 isolate of the B.3 pangolin lineage. The siRNAs were applied using lipofectamine as the transfection agent either 1 h prior to infection or 1 h post-infection. We quantified the efficacy of the siRNAs by measuring the plaque forming units (PFU) three days post-infection. This assay allowed us to confirm the high anti-SARS-CoV-2 activity of the siRNAs **R-2** and **S-6**. The siRNA **R-5**, in contrast, was ineffective in this assay (Figure 1c, d), likely because the full-length genomic SARS-CoV-2 RNA has a hairpin loop at the target position,^[11] which probably impairs its accessibility for the siRNA-RISC-complex. Since only small fragments of the viral genome were fused to the *Renilla* luciferase gene in the dual-luciferase reporter assay to test **R-5** (Table S2), secondary and tertiary RNA structures were different and did therefore not impair **R-5** efficacy. The siRNAs **R-2** and **S-6** reduced the viral loads up to 96 % when cells were transfected one hour before virus challenge (Figure 1c, Figure S1c) and up to 99.95 % when cells were transfected one hour after virus challenge (Figure 1d, Figure S1d). Based on these results, we selected **R-2** and **S-6** for further studies (Figure 1e).

To obtain more detailed efficacy data, we established an assay to quantify SARS-CoV-2-induced cytotoxicity over a high dynamic range of virus inoculum. For these studies we used MDA-MB-231-hACE2 cells, which were engineered to overexpress the hACE2 virus entry receptor. This makes them highly susceptible to SARS-CoV-2.^[12] Titration of the SARS-CoV-2 inoculum on these cells resulted in a volume-dependent increase of cell death, which was monitored by microscopy and quantified by a luminometric cell viability assay. As an antiviral positive control, the clinical RdRp inhibitor remdesivir (RDV)^[13] potently blocked SARS-CoV-2 replication and virus-induced cell death (Figure S2a).

We next inoculated target cells with SARS-CoV-2 (B.1.177 pangolin lineage, 20E.EU1) either 21 h or 4 h before, or 2 h after siRNA treatment. For siRNA delivery, we used lipofection-mediated transfection. The depicted data show a highly effective protection of the siRNA-treated cells from virus-induced cytotoxicity, when **R-2** or **S-6** were applied 21 h before virus challenge (Figure S2a–c). Cells transfected with the non-targeting scrambled siRNA **Ctrl.-10** and also untreated MDA-MB-231-hACE2 cells showed, in contrast, dramatically decreased viability (Figure 1f). In experiments with Vero-E6 cells, we observed a substantial protective effect when the siRNAs were applied either one hour prior (Figure 1c) or post-infection (Figure 1d). This indicates cell type-specific differences in the dynamics of siRNA delivery and antiviral potency. In the assay using MDA-MB-231-hACE2, pre-treatment with siRNAs **R-2** and **S-6** protected the cells from being killed by both VoCs Alpha (B.1.1.7, Figure 1g) and Beta (B.1.351, Figure 1h).

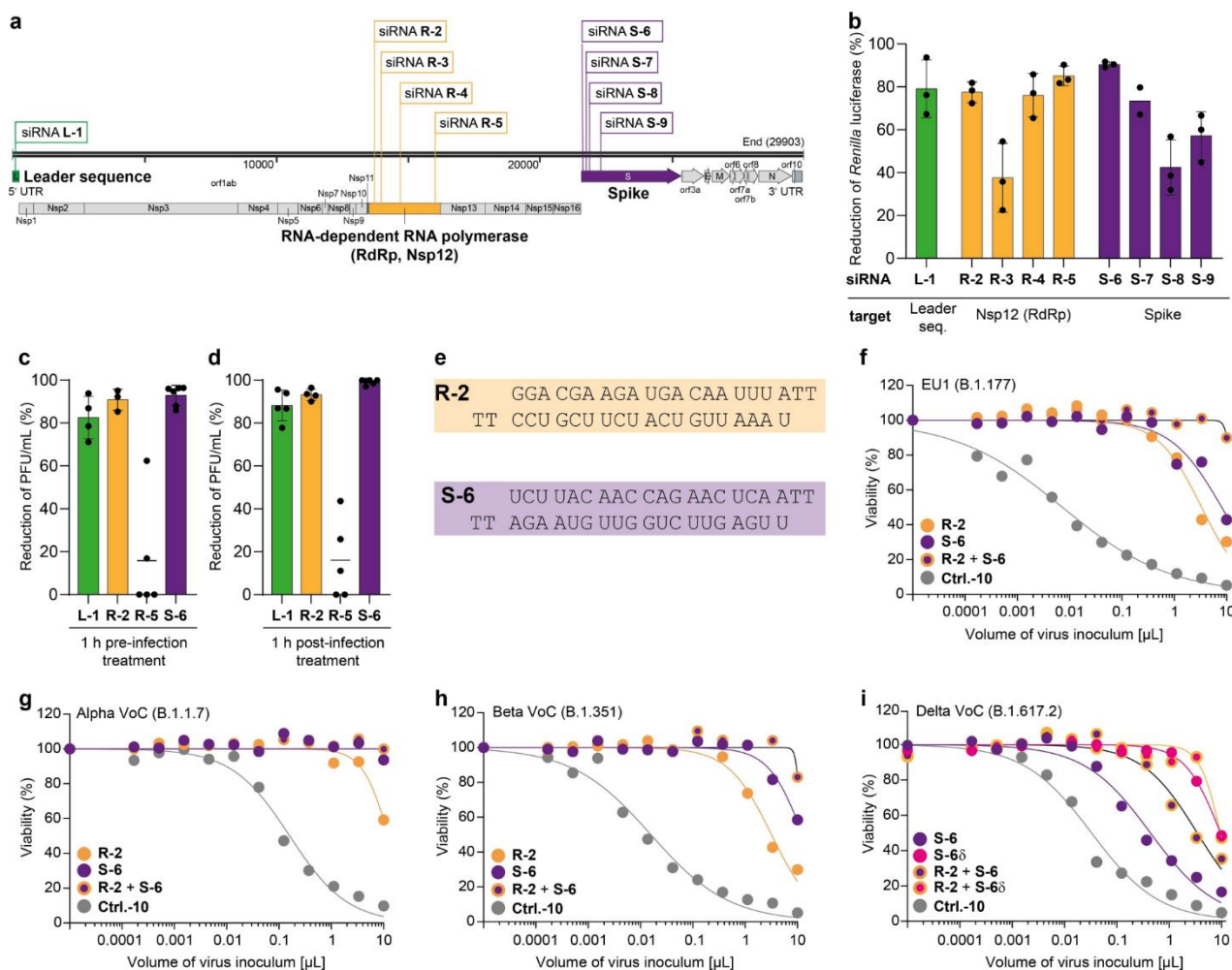


Figure 1. Development of efficient siRNAs targeting SARS-CoV-2. a) Target sequences of designed siRNAs within the SARS-CoV-2 genome. b) Screening of antiviral efficacy of different siRNAs using a surrogate luciferase-reporter assay. Bars show mean, error bars represent SD. c), d) Reduction of plaque forming units (PFU) per mL normalized to **Ctrl.-10**-treated Vero-E6 cells in the context of siRNA treatment (17 nM) and SARS-CoV-2 infection (MOI 0.01) 72 h p.i. c) siRNA was transfected one hour before or d) one hour after virus challenge. Bars show mean, error bars represent SD. e) siRNA sequences of the most potent siRNAs, **R-2** and **S-6**. f)–i) Viability of MDA-MB-231-hACE2 cells depends on the SARS-CoV-2 variant B.1.177 (EU1) (f), B.1.1.7 (Alpha VoC) (g), B.1.351 (Beta VoC) (h), B.1.617.2 (Delta VoC) (i), virus inoculum, and specific siRNA treatment (40 nM, lipofection). Dots show the mean of two technical replicates from one representative biologically independent experiment. Details about reproducibility and statistical analysis are given in the Methods section in the Supporting Information.

Notably, the combination of siRNAs **R-2** and **S-6** was particularly effective (Figure 1f–h). The virus inoculum required to eliminate 50% of the cells (cytotoxic volume (CV_{50})) increased relative to **Ctrl.-10**, for **R-2** from 78- to 456-fold, and for **S-6** to >798-fold. With a combination of **R-2** and **S-6**, we observed >80% cell viability even at the highest virus inoculum. The protective siRNA effect with this mixture was so strong that we were unable to determine any meaningful CV_{50} values for the applied volumes of virus inoculum (Table S3).

We next examined the anti-viral effect of the siRNA **S-6** using the SARS-CoV-2 VoC Delta (B.1.617.2, Figure 1i). Here, we detected a loss of activity of **S-6** in line with the known C to G point mutation at position 21618, which is present directly in the binding target region of the siRNA (Figure S2d).^[14] This activity loss could be partially compen-

sated when we combined **S-6** with **R-2**, but maximum efficiency could not be restored, showing that viral mutations in the siRNA-binding region can have a dramatic effect on the antiviral activity. In order to prove that the siRNA approach allows rapid adaptation to virus mutations we adjusted the **S-6** sequence to account for the mutation in VoC Delta (**S-6 δ**). Indeed, when we examined the efficacy of **S-6 δ** , we noted that the original antiviral activity was re-established (Figure 1i). This result demonstrates the fast adaptability of the siRNA-based medication approach.

All siRNA-based therapeutics that are in clinical use feature modified nucleosides with either 2'OMe or 2'F substituents (Figure 2a) next to the presence of phosphothioates. These chemical modifications establish a higher stability and resistance against endonucleases that are present in human serum.^[7a] Using the design principle

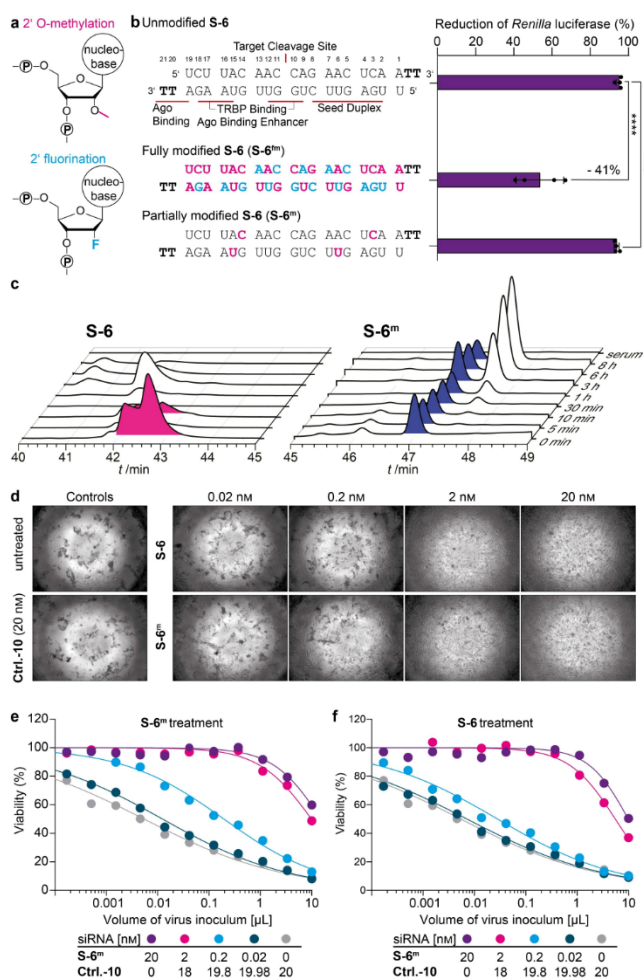


Figure 2. Chemical stabilization of the antiviral siRNAs. a) Methoxy- and fluor modifications on the 2'-OH position of the ribose to improve siRNA stability. b) Chemically modified versions of **S-6** were compared to the unmodified version in the surrogate luciferase reporter assay. Ordinary one-way ANOVA combined with Dunnett's multiple comparisons test was performed **** p_{adj} -value < 0.0001. TRBP = TAR RNA binding protein that loads siRNA into RISC. c) Serum stability of unmodified **S-6** and **S-6^m**. d) Brightfield microscopy images of virus-induced cytopathic effects on MDA-MB-231-hACE2 cells and siRNA concentration-dependent protection of cells challenged with 0.01 μ L B.1.177 stock two days earlier. e), f) Viability of SARS-CoV-2-infected MDA-MB-231-hACE2 cells to determine the CV_{50} in the context of titration of virus inoculum (0.0001 to 10 μ L) and of siRNA concentrations (0.02 to 20 nM, lipofection). Dots represent the mean of two technical replicates from one biologically independent experiment. In (e) **S-6^m** was added, whereas in (f) the unmodified **S-6** was used. For each concentration, CV_{50} differences between **S-6^m** and **S-6** were analysed using multiple t-tests with FDR multiple comparisons control. Details about reproducibility and statistical analysis are given for all experiments in the Methods section.

adapted from Givosiran,^[15] we prepared a fully modified siRNA **S-6^m** (Figure 2b). We performed serum stability studies over multiple time points and noted that **S-6^m** showed the expected increase of stability in serum in comparison to **S-6**. To our surprise, however, we observed in a subsequent siRNA efficacy study using the dual-luciferase reporter assay a 40% loss of activity (dual-luciferase

reporter assay, Figure 2b). Furthermore, a complete loss of activity was observed in virus challenge studies using replication-competent SARS-CoV-2 (Figure S3a). Therefore, we screened various differently modified siRNAs and found that an only partially modified **S-6**, with just four 2'-OMe-modifications (**S-6^m**), featured already the required stability in serum (Figure 2c), while the antiviral activity was preserved. **S-6^m** had full activity in the dual-luciferase reporter assay (Figure 2b) and brightfield microscopy of MDA-MB-231-hACE2 cells, that had been pre-treated with **S-6^m** and challenged with SARS-CoV-2, indicated a very high protective effect of **S-6^m** (Figure 2d).

Next, we performed a quantitative assessment of the activity of **S-6^m**. While MDA-MB-231-hACE2 cells pre-treated with **Ctrl.-10** showed the expected concentration-dependent cytotoxicity two days after virus challenge, pre-treatment with **S-6^m** (Figure 2e) prevented cell death at siRNA concentrations as low as 2 nM. Importantly, we observed a significantly higher protective effect of **S-6^m** compared to unmodified **S-6** (Figure 2f) at both 2 nM and 0.2 nM (Table S4). These results were confirmed in a second SARS-CoV-2-susceptible cell line, A549-hACE2^[16] (Figure S3b, c).

While RNA therapeutics and vaccines are typically delivered into cells and tissues using cationic lipid- or polymer-based nanoparticles, the delivery agents often have adverse effects. In particular, delivery into epithelial cells, as required for the treatment of SARS-CoV-2 infection in patients, is often not possible.^[7a,17] To investigate delivery into epithelial cells, we first assessed whether our siRNAs can prevent SARS-CoV-2 infection and virus-induced cell death in human 3D mucociliary lung EpiAirwayTM microtissues. These microtissues are derived from differentiated airway epithelial cells originating from the tracheobronchial tract. They feature a realistic air-liquid interface including pseudo-stratified structures with numerous apical cilia as well as apical mucous secretion.^[18] EpiAirwayTM microtissues are hACE2-positive. As such they are SARS-CoV-2-susceptible and consequently suitable for the evaluation of antiviral approaches.^[19]

We noted that all attempts to use lipid- or polymer-based transfection reagents to deliver the siRNA into the microtissues were not successful. In addition, the sporadically observed effects could not be assigned to an siRNA-specific block of infection (Figure S4a, b). In order to investigate if an siRNA delivery into these microtissues is possible without a transfection agent, we chemically modified our siRNA with receptor ligands. We prepared chimeric siRNA-ligand conjugates that we hypothesized would facilitate cellular delivery. This approach is similar to the clinically approved *N*-acetyl galactosamine-modification of siRNAs that target liver cells.^[7] For siRNA modification, we used the highly efficient and mild Cu^I-catalysed click-chemistry.^[20] The initial idea was to connect the siRNA to short peptides that are known to interact with the hACE2 receptor as part of the receptor-binding domain of the SARS-CoV S protein^[21] (Figure 3a). For the synthesis of the chimeric peptide-siRNA, we utilized a Cu^I-induced click-ligation between an N₃-Linker-YKYRYL (**P**) peptide and

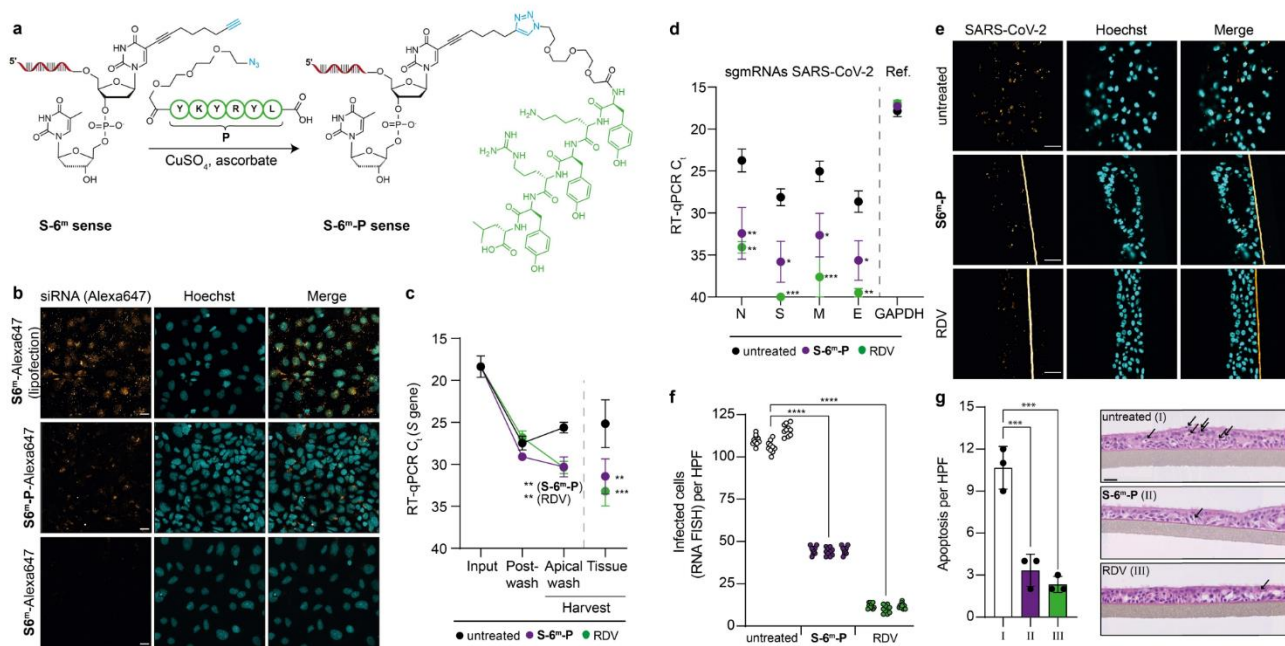


Figure 3. RBD-peptide siRNA conjugates suppress SARS-CoV-2 infection in human 3D lung microtissues. a) Depiction of the **S-6^m-P-sense** strand synthesis using click-chemistry. b) hACE2-peptide-dependent delivery of **S-6^m-P-Alexa647** compared to **S-6^m-Alexa647** (900 nm each, no transfection reagent) into human Caco-2 cells. Lipofection of **S-6^m-Alexa647** (20 nM) served as a positive control. Scale bar: 25 μ m. c), d) C_t values of SARS-CoV-2 RT-qPCR in 3D lung microtissues 72 h after virus challenge (SARS-CoV-2 B.1.177 stock) are shown. Tissues were pre-treated with either **S-6^m-P** siRNA (300 nM, no transfection reagent) or RDV (10 μ M) or left untreated before virus challenge. Dots represent mean, error bars represent SEM. Two-way ANOVA combined with Dunnett's multiple comparisons test was performed. c) RT-qPCR on *S* gene of SARS-CoV-2. d) RT-qPCR on viral intracellular sgmRNAs in harvested tissue, GAPDH served as a reference. e), f) SARS-CoV-2 RNA FISH analysis of 3D lung microtissues, either pre-treated with **S-6^m-P** (300 nM, no transfection reagent) or RDV (10 μ M) or left untreated, following SARS-CoV-2 infection (stock B.1.177). e) Representative microscopic images 72 h p.i., scale bars: 60 μ m. f) Quantitative analysis of e). Nested one-way ANOVA combined with Dunnett's multiple comparisons test was performed. g) Histopathological analysis of **S-6^m-P** (300 nM, no transfection reagent), RDV-pre-treated (10 μ M) or untreated 3D lung microtissues 72 h post SARS-CoV-2 infection to quantify apoptosis of epithelial cells. Bar represents mean, error bars represent SD. Ordinary one-way ANOVA combined with Dunnett's multiple comparisons test. Representative images are displayed, scale bar is 30 μ m, arrows indicate apoptotic cells. c), d), f), g) * p_{adj} -value < 0.05, ** p_{adj} -value < 0.01, *** p_{adj} -value < 0.001, **** p_{adj} -value < 0.0001. Details about reproducibility and statistical analysis are given for all experiments in the Methods section.

an siRNA, which we modified with an alkyne-bearing dT at 3'-end (**S-6^m-sense**).^[22] For synthetic simplicity, we inserted the alkyne-bearing dT units at the 2nd position at the 3'-ends. After the click-reaction with the azido-modified peptide, the peptide-siRNA **S-6^m-P-sense** was rinsed through a size exclusion column to remove residual Cu-salts and was then purified by HPLC. MALDI-TOF analysis confirmed the successful synthesis of the peptide-siRNA conjugate. The so prepared **S-6^m-P-sense** strand was finally hybridized to the corresponding **S-6^m-antisense** strand to furnish the peptide-modified siRNA chimera **S-6^m-P**.

In a pilot experiment, we analysed peptide-mediated uptake of the siRNA into Caco-2 cells, which endogenously express the virus entry receptor hACE2, using Alexa647-labelled **S-6^m** and **S-6^m-P**. We investigated the cellular uptake of the siRNAs by confocal microscopy, which allows the recording of z-stacks to assess whether the siRNA has been taken up by the cells or is bound to the cell surface. We indeed observed uptake of the siRNA into Caco-2 cells and, importantly, this uptake was dependent on the conjugation to the peptide (Figure 3b). However, the microscopy analyses also revealed that the peptide-mediated

siRNA uptake into cells was in this assay considerably less efficient compared to the lipofection-based delivery.

Next, we explored whether the peptide modified siRNA (**S-6^m-P**) can prevent SARS-CoV-2 replication in the Epi-AirwayTM microtissues. For this experiment, we pre-treated the human 3D lung microtissues with siRNA **S-6^m-P** (300 nM, 24 h pre-treatment basal and apical, no transfection reagent). RDV was again used as an antiviral positive control (10 μ M, 2 h pre-treatment). Untreated microtissue served as an additional negative control (Figure 3c, Input). Microtissues were subsequently challenged with SARS-CoV-2, followed by apical washes to remove input virus. Thereafter, post-wash samples were taken (Figure 3c, Post-Wash) and microtissues were subsequently cultivated for three additional days. Afterwards, viral replication was quantified by RT-qPCR, both in the apical wash of the intact microtissues (Harvest) and in lysates of dispersed tissue (Tissue). In addition, we also quantified cell-associated levels of several SARS-CoV-2 transcripts. These viral transcripts (sgmRNAs, Figure 3d) are synthesized in productively infected cells to express the viral nucleocapsid (N), as well as the spike (S), membrane (M), and envelope (E) proteins. These sgmRNAs can be distinguished in the RT-

qPCR from the viral genomic RNA by the presence of the 5'-leader sequence, which is attached to every viral transcript, but only present once at the very 5'-end of the viral genomic RNA. We observed an siRNA-peptide chimera-mediated inhibitory effect on SARS-CoV-2, which was comparable to the small molecule inhibitor RDV. Pre-treatment with **S-6^m-P** provided a ≈ 25 -fold reduction of the virus load in the apical wash and ≈ 80 -fold reduction of cell-associated SARS-CoV-2 total RNA levels (Figure 3c and Figure S4c, d). Moreover, **S-6^m-P** efficiently repressed the levels of all four viral transcripts investigated in a range from 130- to 400-fold reduction (Figure 3d and Figure S4e, f).

Next, we performed RNA-fluorescence *in situ*-hybridization (RNA FISH) to further quantify SARS-CoV-2-positive cells in infected lung microtissues. This allowed us to confirm the protective effect of our peptide-conjugated siRNA. In this experiment, we also observed a significant reduction of the number of infected cells after pre-treatment with **S-6^m-P** (Figure 3e, f and Figure S4g). Importantly, we detected virus-induced apoptotic cell death in untreated SARS-CoV-2-infected tissues, but not after pre-treatment with **S-6^m-P** or RDV (Figure 3g, Figure S4h). These data fully support the protective effect of **S-6^m-P**.

However, we noted that despite the siRNA treatment of the lung microtissue, genetic viral material was still detectable in the supernatant by RT-qPCR (Figure 3c). To characterize this further, we re-investigated the virus titration experiments with the siRNA **S-6^m** and lipofectamine transfection. In these experiments, we noted the same discrepancy. While the cell viability data indicated a complete suppression of virus replication at 72 h post infection (Figure 4a), residual virus material was, in contrast, still detectable by RT-qPCR (Figure 4b) with only minor C_t value differences between **S-6^m**- and **Ctrl.-10**-pre-treated cells. To exclude a primer-specific artefact, we performed additional PCR quantification with *RdRp*, *E* and *M* gene-targeted primers and observed that the impact of **S-6^m** was in fact strongest for the *S* gene (Figure 4c). Based on these results, we hypothesized that the application of **S-6^m** induced a highly specific viral RNA degradation, limited to the siRNA-targeting region. We reasoned that this might result in secretion of defective particles that lack the *S* protein and are thus non-infectious. To test this hypothesis, we performed a supernatant transfer experiment, in which the culture supernatant of siRNA-pre-treated SARS-CoV-2-infected A549-hACE2 cells was used to challenge MDA-MB-231-hACE2 cells (Figure 4d). We compared the effects of pre-treatment of A549-hACE2 cells with either siRNAs **R-2**, **S-6^m** or an equimolar combination thereof, relative to **Ctrl.-10**. We found that while **Ctrl.-10**-treated A549-hACE2 supernatants induced a titratable cytopathic effect on MDA-MB-231-hACE2 cells, supernatants of **R-2**-, **S-6^m**- and in particular **R-2+S-6^m**-treated A549-hACE2 cells did not show evidence for a productive SARS-CoV-2 infection with release of infectious virions (Figure 4e). These data suggest that the PCR-based analysis of the antiviral effect indeed underestimates the antiviral impact of the applied siRNAs.

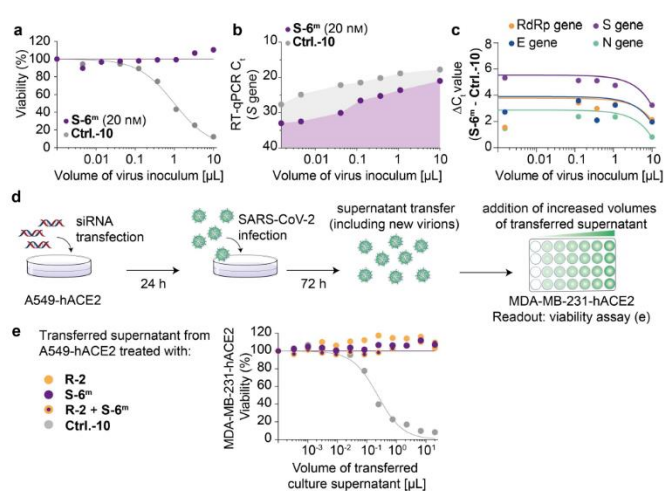


Figure 4. Effects of siRNA treatment on SARS-CoV-2 replication. a) Viability of SARS-CoV-2 (stock B1.177) challenged A549-hACE2 cells 72 h post infection. Dots represent mean of two technical replicates from one representative experiment. b) SARS-CoV-2 RT-qPCR to monitor SARS-CoV-2 RNA that was released into the supernatant of the infected A549-hACE2 cells displayed in (a). c) Comparison of the ΔC_t values including trend lines for RT-qPCR on different SARS-CoV-2 coding regions. The same sample as in (b) was analysed. d) Schematic overview of transfer experiment to assess infectious virus titer in the supernatant of siRNA-pre-treated, infected A549-hACE2 cells. An inoculum of 25 μ L of B1.177 was used. e) Viability of MDA-MB-231-hACE2 cells exposed to supernatants of A549-hACE2 cells that had been pre-treated with either **R-2** or **S-6^m** or a combination thereof or with **Ctrl.-10** prior to SARS-CoV-2 challenge.

This result is of importance for future antiviral siRNA developments.

Conclusion

In summary, the data presented here show that chemically modified and stabilized siRNAs offer a superb potential to develop antiviral therapies. A particular strength of the concept is its flexibility to rapidly adapt the siRNA sequences to newly arising mutants. Since the Omicron VoC (BA.1), similar to the Alpha and Beta VoCs, carries no mutation in the RNA regions targeted in this study, we expect that the here reported siRNA sequences will be active on such variants as well.

In contrast to small molecule-based approaches, the siRNA-based approach allows targeting of multiple viral sites at once, reducing the risk of escape variants. Furthermore, our study shows that fully-modified siRNAs are not efficient in blocking virus replication. All the siRNAs that are in clinical use as of today target cellular genes that, in contrast to viruses, do not underlie a constant evolutionary pressure. Our data show that siRNAs can in principle be used to effectively suppress genetically rapidly evolving viral RNAs. Of note, our siRNA approach resulted in a stronger protective effect on virus-induced cytotoxicity than on suppression of viral RNA species. Our data indicate that a partial 2'-OMe-modification is the ideal compromise for

high siRNA stability and strong antiviral activity. Finally, click-chemistry can be applied to modify the siRNA further, e.g. with receptor ligands such as peptides. This may allow the generation of potent antiviral siRNAs that can be used for cell type-specific targeting. The future challenge is to identify high-affinity receptor ligands that facilitate optimal siRNA internalization. Collectively, this study demonstrates that ligand-coupled, optimized siRNA-based therapeutics can be generated that efficiently restrict the infection by RNA viruses. For the treatment of patients with COVID-19 inhalation of siRNA-peptide conjugates may be a viable strategy.

Acknowledgements

We thank Katharina Hofmann, Helga Mairhofer, Christopher Dächert, Natascha Grzimek-Koschewa and Janett Wieseler for excellent technical support and discussion. We are grateful to Ulrike Protzer for providing access to the P3 laboratory of the Institute of Virology, TUM. We are grateful to Jochen Rech and Veit Hornung for help with qPCR analysis and laboratory access, respectively. We thank Andreas Sing for providing SARS-CoV-2 clinical isolates and Maximilian Münchhoff, Helmut Blum, Stefan Krebs and Alexander Graf for SARS-CoV-2 sequencing and analysis. We thank the Bayerische Forschungsstiftung (T.C. and O.T.K.) and Bay-VOC (O.T.K.) for generous financial support. B.M.K was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—Project-ID 369799452-TRR237 and the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), project TTU 01.806. The project has received additional funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement EpiR, No 741912. Further financial support was obtained from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) via SFB1309 (Project-ID 325871075) and SPP 1784 (Project-ID 277203618). We thank the Volkswagen Foundation for generous support through the EvoRib VW-project. 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: Corona pandemic · SARS-CoV-2 · antiviral compounds · siRNA · peptide RNA conjugates

- [1] M. Shrotri, T. Swinnen, B. Kampmann, E. P. K. Parker, *Lancet Glob. Health* **2021**, *9*, e590–e592.
- [2] X. Chen, A. S. Azman, W. Lu, R. Sun, N. Zheng, S. Ge, X. Deng, J. Yang, D. T. Leung, H. Yu, *medRxiv* **2021**, 2021.08.26.21262699.
- [3] a) A. Hussain, A. Hasan, M. M. Nejadi Babadaei, S. H. Bloukh, M. E. H. Chowdhury, M. Sharifi, S. Haghghat, M. Falahati, *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *130*, 110559; b) S. J. Zost, P. Gilchuk, J. B. Case, E. Binshtein, R. E. Chen, J. P. Nkolola, A. Schäfer, J. X. Reidy, A. Trivette, R. S. Nargi, R. E. Sutton, N. Suryadevara, D. R. Martinez, L. E. Williamson, E. C. Chen, T. Jones, S. Day, L. Myers, A. O. Hassan, N. M. Kafai, E. S. Winkler, J. M. Fox, S. Shrihari, B. K. Mueller, J. Meiler, A. Chandrashekar, N. B. Mercado, J. J. Steinhardt, K. Ren, Y.-M. Loo, N. L. Kallewaard, B. T. McCune, S. P. Keeler, M. J. Holtzman, D. H. Barouch, L. E. Gralinski, R. S. Baric, L. B. Thackray, M. S. Diamond, R. H. Carnahan, J. E. Crowe, *Nature* **2020**, *584*, 443–449; c) P. C. Taylor, A. C. Adams, M. M. Hufford, I. de la Torre, K. Winthrop, R. L. Gottlieb, *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 382–393.
- [4] a) W. T. Harvey, A. M. Carabelli, B. Jackson, R. K. Gupta, E. C. Thomson, E. M. Harrison, C. Ludden, R. Reeve, A. Rambaut, S. J. Peacock, D. L. Robertson, C.-G. U. Consortium, *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 409–424; b) D. Zhou, W. Dejnirattisai, P. Supasa, C. Liu, A. J. Mentzer, H. M. Ginn, Y. Zhao, H. M. E. Duyvesteyn, A. Tuekprakhon, R. Nutalai, B. Wang, G. C. Paesen, C. Lopez-Camacho, J. Slon-Campos, B. Hallis, N. Coombes, K. Bewley, S. Charlton, T. S. Walter, D. Skelly, S. F. Lumley, C. Dold, R. Levin, T. Dong, A. J. Pollard, J. C. Knight, D. Crook, T. Lambe, E. Clutterbuck, S. Bibi, A. Flaxman, M. Bittaye, S. Belij-Rammerstorfer, S. Gilbert, W. James, M. W. Carroll, P. Klenerman, E. Barnes, S. J. Dunachie, E. E. Fry, J. Mongkolsapaya, J. Ren, D. I. Stuart, G. R. Screaton, *Cell* **2021**, *184*, 2348–2361.e2346.
- [5] L. Zhao, S. Li, W. Zhong, *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, DOI: 10.3389/fphar.2022.840639.
- [6] a) A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811; b) N. J. Caplen, S. Parrish, F. Imani, A. Fire, R. A. Morgan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9742–9747; c) S. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 188–200.
- [7] a) B. Hu, L. Zhong, Y. Weng, L. Peng, Y. Huang, Y. Zhao, X.-J. Liang, *Signal Transduction Targeted Ther.* **2020**, *5*, 101; b) X. Zhang, V. Goel, G. J. Robbie, *J. Clin. Pharmacol.* **2020**, *60*, 573–585.
- [8] P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder, V. Thiel, *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 155–170.
- [9] a) P. V. Maillard, A. G. van der Veen, E. Z. Poirier, C. Reis e Sousa, *EMBO J.* **2019**, *38*, e100941; b) B.-J. Li, Q. Tang, D. Cheng, C. Qin, F. Y. Xie, Q. Wei, J. Xu, Y. Liu, B.-J. Zheng, M. C. Woodle, N. Zhong, P. Y. Lu, *Nat. Med.* **2005**, *11*, 944–951.
- [10] C. Selvam, D. Mutisya, S. Prakash, K. Ranganna, R. Thilagavathi, *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *90*, 665–678.
- [11] T. C. T. Lan, M. F. Allan, L. E. Malsick, J. Z. Woo, C. Zhu, F. Zhang, S. Khandwala, S. S. Y. Nyeo, Y. Sun, J. U. Guo, M. Bathe, A. Nää, A. Griffiths, S. Rouskin, *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1128.
- [12] P. R. Wratil, M. Stern, A. Priller, A. Willmann, G. Almanzar, E. Vogel, M. Feuerherd, C. C. Cheng, S. Yazici, C. Christa, S. Jeske, G. Lupoli, T. Vogt, M. Albanese, E. Mejías-Pérez, S. Bauernfried, N. Graf, H. Mijocevic, M. Vu, K. Tinnfeld, J. Wettengel, D. Hoffmann, M. Muenchhoff, C. Daechert, H. Mairhofer, S. Krebs, V. Fingerle, A. Graf, P. Steininger, H. Blum, V. Hornung, B. Liebl, K. Überla, M. Prelog, P. Knolle, O. T. Keppler, U. Protzer, *Nat. Med.* **2022**, *28*, 496–503.

- [13] A. J. Pruijssers, A. S. George, A. Schäfer, S. R. Leist, L. E. Gralinski, K. H. Dinno III, B. L. Yount, M. L. Agostini, L. J. Stevens, J. D. Chappell, X. Lu, T. M. Hughes, K. Gully, D. R. Martinez, A. J. Brown, R. L. Graham, J. K. Perry, V. Du Pont, J. Pitts, B. Ma, D. Babusis, E. Murakami, J. Y. Feng, J. P. Bilello, D. P. Porter, T. Cihlar, R. S. Baric, M. R. Denison, T. P. Sheahan, *Cell Rep.* **2020**, *32*, 107940.
- [14] A. Grimson, K. K.-H. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim, D. P. Bartel, *Mol. Cell* **2007**, *27*, 91–105.
- [15] a) R. L. Setten, J. J. Rossi, S.-P. Han, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2019**, *18*, 421–446; b) M. Balwani, E. Sardh, P. Ventura, P. A. Peiró, D. C. Rees, U. Stölzel, D. M. Bissell, H. L. Bonkovsky, J. Windyga, K. E. Anderson, C. Parker, S. M. Silver, S. B. Keel, J.-D. Wang, P. E. Stein, P. Harper, D. Vassiliou, B. Wang, J. Phillips, A. Ivanova, J. G. Langendonk, R. Kauppinen, E. Minder, Y. Horie, C. Penz, J. Chen, S. Liu, J. J. Ko, M. T. Sweetser, P. Garg, A. Vaishnav, J. B. Kim, A. R. Simon, L. Gouya, *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 2289–2301.
- [16] M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T. S. Schiergens, G. Herrler, N.-H. Wu, A. Nitsche, M. A. Müller, C. Drosten, S. Pöhlmann, *Cell* **2020**, *181*, 271–280.e278.
- [17] a) B. Ballarín-González, K. A. Howard, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 1717–1729; b) B. B. González, E. B. Nielsen, T. B. Thomsen, K. A. Howard in *RNA Interference from Biology to Therapeutics* (Ed.: K. A. Howard), Springer US, Boston, **2013**, pp. 97–125.
- [18] X. Cao, J. P. Coyle, R. Xiong, Y. Wang, R. H. Heflich, B. Ren, W. M. Gwinn, P. Hayden, L. Rojasasakul, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2021**, *57*, 104–132.
- [19] a) H. Zarkoob, A. Allué-Guardia, Y.-C. Chen, O. Jung, A. Garcia-Vilanova, M. J. Song, J.-G. Park, F. Oladunni, J. Miller, Y.-T. Tung, I. Kosik, D. Schultz, J. Yewdell, J. B. Torrelles, L. Martinez-Sobrido, S. Cherry, M. Ferrer, E. M. Lee, *bioRxiv* **2021**, 2021.05.11.443693; b) Y. Liu, J. Liu, K. S. Plante, J. A. Plante, X. Xie, X. Zhang, Z. Ku, Z. An, D. Scharton, C. Schindewolf, V. D. Menachery, P.-Y. Shi, S. C. Weaver, *bioRxiv* **2021**, 2021.03.08.434499; c) S.-I. Hattori, N. Higashi-Kuwata, H. Hayashi, S. R. Allu, J. Raghavaiah, H. Bulut, D. Das, B. J. Anson, E. K. Lendy, Y. Takamatsu, N. Takamune, N. Kishimoto, K. Murayama, K. Hasegawa, M. Li, D. A. Davis, E. N. Kodama, R. Yarchoan, A. Wlodawer, S. Misumi, A. D. Mesecar, A. K. Ghosh, H. Mitsuya, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 668.
- [20] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442–3444; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3491–3493.
- [21] A.-W. Struck, M. Axmann, S. Pfefferle, C. Drosten, B. Meyer, *Antiviral Res.* **2012**, *94*, 288–296.
- [22] a) K. Brunner, J. Harder, T. Halbach, J. Willibald, F. Spada, F. Gnerlich, K. Sparrer, A. Beil, L. Möckl, C. Bräuchle, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1946–1949; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 1968–1971; b) J. Willibald, J. Harder, K. Sparrer, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12330–12333.

Manuscript received: March 28, 2022

Accepted manuscript online: July 8, 2022

Version of record online: August 12, 2022

3.2. Effiziente Cu-katalysierte Tandem-Click-Synthese von mehrfach zuckermodifizierten Oligonukleotiden

„Efficient Tandem Copper-Catalyzed Click Synthesis of Multisugar Modified Oligonucleotides“
A. J. Tölke, J. F. Gaisbauer, Y. V. Gärtner, B. Steigenberger, A. Holovan, F. Streshnev, S. Schneider, M. Müller, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, e202405161.

Prolog

Nukleinsäure-basierte Therapeutika gewinnen aufgrund ihrer Fähigkeit gezielt in die Genexpression von krankheitsverursachenden Proteinen einzugreifen zunehmend an Bedeutung. Dabei liegt der Fokus auf der Optimierung der Stabilität, der Adressierung von spezifischen Zelltypen und der erfolgreichen Aufnahme in die Zielzellen. Eine Reihe an zugelassenen siRNA-Therapeutika ermöglichen durch die Konjugation an einen trivalenten GalNAc-Liganden das Adressieren des ASGPR und somit die gezielte Aufnahme in Hepatozyten. Die Funktionalisierung erfolgt durch eine (GalNAc)₃-Linker-modifizierte Festphase, die aus sterischen Gründen zu einer suboptimalen Phosphoramidit-Kopplung und somit kostspieligen Synthese führt. Dieses Manuskript zeigt die Synthese eines multifunktionalen Linkers zur effizienten Konjugation von siRNA an drei Zuckereinheiten mittels Cu^I-katalysierter Click-Chemie in einer *one-pot*-Reaktion. Die Linker Struktur weist vier terminale Azide auf, von denen eines ein Chelat-bildendes Picolyl-Azid und die restlichen Alkyl-Azide sind. Die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten der terminalen Azid-Gruppen bilden die Grundlage für die direkte, schnelle und selektive post-synthetische Konjugation eines Alkin-modifizierten Oligonukleotides über den Linker zu drei Zuckereinheiten.

Autorenbeitrag

Im Rahmen dieser Veröffentlichung war ich für die Synthese des multifunktionalen Linkers, der siRNAs sowie der Zuckerbausteine verantwortlich. Außerdem war ich für die Etablierung und Optimierung der Click-Protokolle und deren Durchführung und Quantifizierung zuständig. Die Synthese und Untersuchungen im Zusammenhang mit der hochmodifizierten siRNA, Untersuchungen zur Spezifität der Click-Reaktion mittels ¹H-NMR sowie Untersuchungen der Anomerisierung der Zuckerbausteine wurden unter meiner Anleitung durchgeführt. Des Weiteren war ich für die Auswertung der Ergebnisse und die Mitverfassung des Manuskripts verantwortlich.

Lizenz

Kopie der *Open Access* Publikation auf Basis der *Creative Commons CC BY License*, die den nicht-kommerziellen Abdruck des Artikels erlaubt.

Artikel einsehbar unter:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.202405161>

Lizenz einsehbar unter:

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Die Hintergrundinformationen dieser Veröffentlichung sind im Anhang III abgebildet.



Efficient Tandem Copper-Catalyzed Click Synthesis of Multisugar-Modified Oligonucleotides

Annika J. Tölke, Julia F. Gaisbauer, Yasmin V. Gärtner, Barbara Steigenberger, Anna Holovan, Filip Streshnev, Sabine Schneider, Markus Müller, and Thomas Carell*

Abstract: Nucleic acids in the form of siRNA, antisense oligonucleotides or mRNA are currently explored as new promising modalities in the pharmaceutical industry. Particularly, the success of mRNA-vaccines against SARS-CoV-2, along with the successful development of the first sugar-modified siRNA therapeutics has inspired the field. The development of nucleic acid therapeutics requires efficient chemistry to link oligonucleotides to chemical structures that can improve stability, boost cellular uptake, or enable specific targeting. For the siRNA therapeutics currently in use, modification of the 3'-end of the oligonucleotides with triple-*N*-acetylgalactosamine (*GalNAc*)₃ was shown to be of significance. This modification is currently achieved through cumbersome multistep synthesis and subsequent loading onto the solid support material. Herein, we report the development of a bifunctional click-reactive linker that allows the modification of oligonucleotides in a tandem click reaction with multiple sugars, regardless of the position within the oligonucleotide, with remarkable efficiency and in a one-pot reaction.

Introduction

Click chemistry is defined as a highly efficient method that allows the linking of two molecules in a short period of time, with high yields and with minimal formation of undesired side products.^[1–2] This is particularly important for linking chemical entities to biomolecules because biomolecules are

typically only available in small quantities and are often highly sensitive towards harsh reaction conditions. In addition, the chemical modification of the biomolecules often must be performed under aqueous conditions.^[2–4]

Previously it was shown that oligonucleotides can be efficiently manipulated with Cu-catalyzed alkyne-azide click (CuAAC) reactions.^[5–9] For this purpose, alkyne bearing nucleosides have been developed that can be enzymatically or chemically incorporated into oligonucleotides as reaction partners for azides.^[3,10] The technology is highly efficient to the extent that hundreds of alkyne-modified nucleosides present, for example, in PCR-products react with the corresponding azides without leaving a single unreacted alkyne-nucleoside.^[11] The unusually high efficiency is probably caused by the imidazole-substructure within the purine nucleosides along with other potentially electron-donating, lone-pair-featuring sp²-*N*-atoms present in the nucleoside heterocycles, which may allow pre-complexation of the Cu⁺ ion to the oligonucleotide as needed for efficient catalysis.

The development of oligonucleotide therapeutics involves their modification with chemical entities that increase the stability of the DNA or RNA fragment, can improve the cellular uptake and potentially add targeting capabilities to the oligonucleotides.^[12–15] Inclisiran (**1**) and Givosiran are two examples. They are both double-stranded siRNA therapeutics, featuring a triple-*N*-acetyl-galactosamine (*GalNAc*)₃ modification at the 3'-end of the sense strand (Figure 1).^[16–19] This modification is responsible for efficient targeting and delivery of these siRNA pharmaceuticals into liver cells.^[20–22]

The current methodology employed for the siRNA functionalization requires the synthesis of a (*GalNAc*)₃-linker with fully protected sugar OH groups, which is then loaded onto a long-chain amino alkyl controlled pore glass support (lcaa CPG) before solid-phase synthesis of the oligonucleotide.^[16] Because of the steric bulk of the linker molecule, the subsequent coupling of phosphoramidites often proceed with suboptimal yields, which make the syntheses of these siRNA therapeutics expensive both from the synthetic, but also from the purification point-of-view.^[23–24] The high cost of the new modalities is a potential burden associated with all modified oligonucleotide therapeutics and a significant challenge for the global health system.^[25] Herein, we report the development of a simple dendrimeric, four-armed tetra-azide linker that allows oligonucleotides to be functionalized with multiple sugars “one-pot”. Used alongside alkyne-modified phosphoramidites that can be incorporated at any given position with

[*] M.Sc. A. J. Tölke, B.Sc. J. F. Gaisbauer, M.Sc. Y. V. Gärtner, Dr. A. Holovan, M.Sc. F. Streshnev, Dr. S. Schneider, Dr. M. Müller, Prof. T. Carell

Department of Chemistry
 Ludwig-Maximilians-Universität München
 Butenandtstr. 5–13, 81377 Munich, Germany
 E-mail: Thomas.carell@lmu.de

Dr. B. Steigenberger
 Mass Spectrometry Core Facility
 Max Planck Institute of Biochemistry
 Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, Germany

© 2024 The Authors. Angewandte Chemie International Edition published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

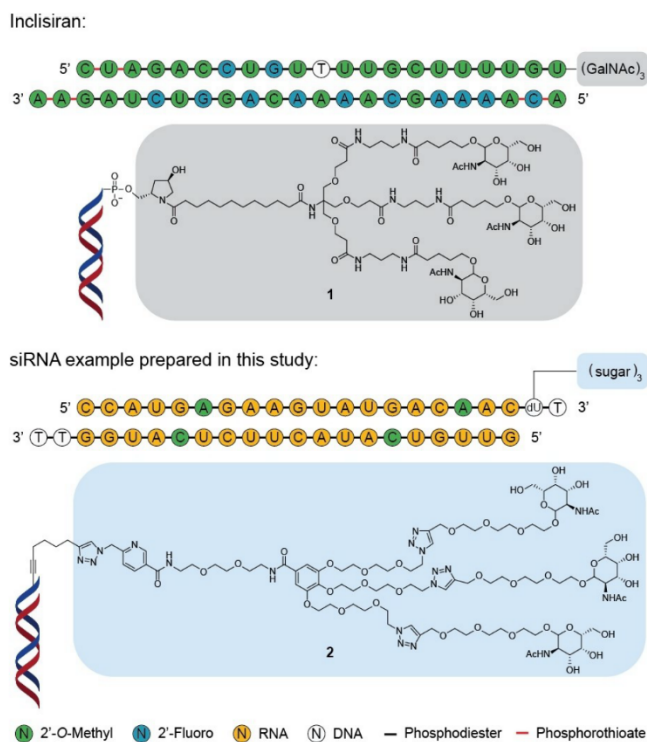


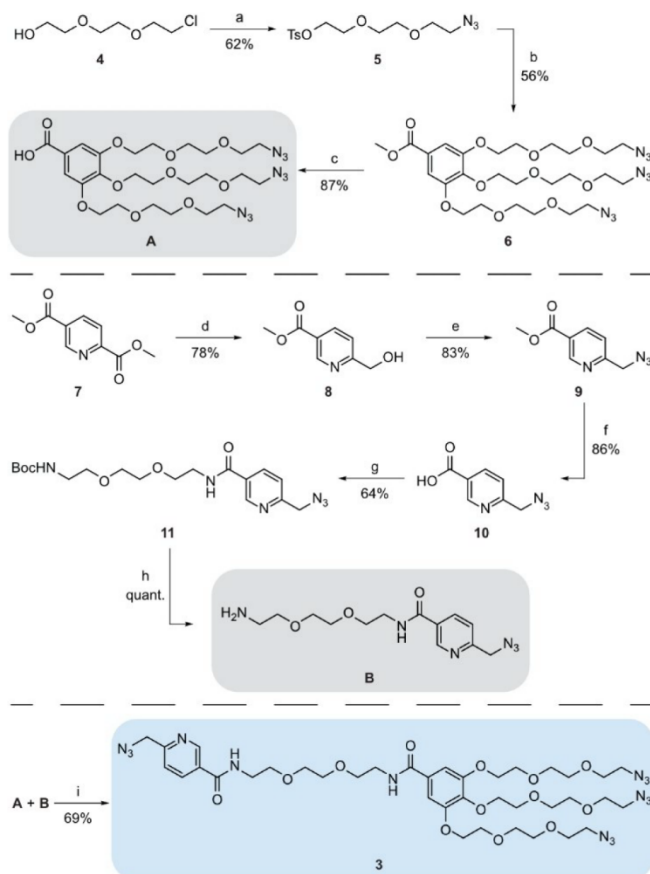
Figure 1. Depiction of inclisiran (**1**),^[19] an approved siRNA therapeutic modified with (GalNAc)₃, and an example of a siRNA with a dendrimeric tandem click linker and (GalNAc)₃ (**2**) as prepared in this study.

high yield by standard coupling protocols, this linker allows the direct, fast and highly efficient synthesis of multisugar-modified oligonucleotides such as **2** (Figure 1) via a tandem click procedure.

Results and Discussion

For the design of the tandem click linker **3** we used the information that picolyl azides react much faster compared to ordinary alkyl azides.^[26–27] We envisioned that this rate difference should be large enough to enable a highly selective tandem click modification of oligonucleotides in just one single experimental setup. The question associated with the idea was of whether the picolyl-substitution within the linker would provide a sufficiently high rate enhancement in the presence of the many pyridine-like sp²-N-atoms that are present in the oligonucleotides. Herein we report that the rate difference prevails and is large enough to enable the envisioned one-step tandem click modification of oligonucleotides.

The synthesis of the tandem click linker **3** is shown in Scheme 1. Important for the linker design were solubility considerations, because ultimately the click modification has to operate in water. Starting material for the synthesis was consequently triethylglycol (TEG)-chloride **4**, which was converted into the tosyl-TEG-azide **5**. Reaction with methyl-3,4,5-trihydroxybenzoic acid methyl ester generated the



Scheme 1. Synthesis of the tandem linker **3** for the one-pot modification of oligonucleotides using click chemistry. Reagents and conditions: a) 1) NaN₃, H₂O, 75 °C, 21 h; 2) TsCl, NEt₃, THF, rt, 17 h; b) methyl gallate, K₂CO₃, DMF, 80 °C, 40 h; c) NaOH, MeOH, 40 °C, 4.5 h; d) NaBH₄, CaCl₂, THF/MeOH 1 : 2, 0 °C, 2 h; e) 1) MsCl, NEt₃, THF, rt, 3 h; 2) NaN₃, THF/H₂O 1 : 1, 50 °C, 16 h; f) LiOH, MeOH, rt, 1 h; g) *tert*-butyl-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl) carbamate, HATU, DIPEA, DMF, rt, 15 h; h) HCl (4 m in dioxane), DCM/MeOH 10 : 1, rt, 1.5 h; i) **A**, **B**, HATU, DIPEA, DMF, rt, 18 h.

triple-azide-TEG-dendrimer **6**, which was saponified to building block **A**. In parallel, we reduced 2,5-dicarboxypyridine methyl ester **7** with NaBH₄ to the picolyl-alcohol **8**, which was next converted to the picolyl-azide **9**. Saponification with LiOH provides the carboxylic acid **10**, which was reacted with *tert*-butyl-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl) carbamate for solubility reasons to give the PEG-azide-pyridine **11**. Boc-deprotection to **B** and coupling to the dendrimer structure **A** generated the ready-to-use tandem click linker **3**.

To modify oligonucleotides with this linker, we incorporated an alkyne-containing deoxyuridine nucleoside in the 3' overhang of the siRNA sense strand. It is worth noting, however, that the building block can in principle be incorporated at any given position. Because many siRNAs feature dTdT-overhangs, we decided for this study to insert the alkyne-containing dU-phosphoramidite as the second nucleotide during the solid-phase synthesis. The syntheses of the oligonucleotides **ORN 1–2** were performed as reported

earlier, without any need to adjust the standard RNA synthesis protocol.

For the click reaction (Figure 2a), we dissolved the alkyne-bearing oligonucleotide in ddH₂O (4 mM) and added 2.5 eq. of the tandem click linker **3** (20 mM in DMSO), CuSO₄ (50 mM in 100 mM Tris((1-hydroxy-propyl-1H-1,2,3-

triazol-4-yl)methyl)amine (THPTA) solution in ddH₂O) and ascorbate (50 mM in ddH₂O) to reduce the Cu²⁺ to Cu⁺. The reaction mixture was shaken for 30 min (although 10 min were sufficient in most cases) at room temperature. Analysis of the reaction mixture by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry showed complete conversion of the oligonucleotide. Subsequently and without any purification or any other workup, we added a fresh solution of CuSO₄ including the THPTA-ligand, along with ascorbate and the corresponding sugar-alkynes. Initially we used the alkyne-bearing glucose (**Glc**) as shown in Figure 2a. This time the mixture was conveniently shaken overnight, although a time dependent analysis showed that the second click is typically complete after 1 h. In principle, the whole tandem click reaction requires 10 min for the first click plus 1 h for the second click reaction (Figure 2b). The product of the tandem click reaction was subsequently analyzed by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry. The MALDI-TOF analysis showed no unreacted starting material and the corresponding HPLC-chromatogram revealed one main signal, which gave us confidence that the reaction proceeded quantitatively. We repeated the experiment several times and obtained the same clean tandem conversions in all cases. After the tandem click reactions, we typically performed a single HPLC purification step. This allowed us to easily remove all the reagents and (if needed) to separate all byproducts.

To investigate the specificity of the reaction, we first performed a trapped ion mobility spectrometry experiment using oligonucleotide **ORN 2sense** (Figures S7 and S8). In a second experiment we performed an ¹H NMR analysis of a reaction using an alkyne-modified nucleoside (Figure S6). In both cases we found no evidence of the non-chelating azides reacting in the initial click reaction under our conditions. Additionally, we examined if the CuAAC reagents could eventually promote an anomerization with **Glc**. Gratifyingly, no anomerization was observed (Figure S10).

Furthermore, to show the broad scope of the tandem click reaction and the possibility to generate a variety of other sugar-modified oligonucleotides, we repeated the tandem click reaction with other alkyne-bearing sugars such as *N*-acetyl-galactosamine (**GalNAc**) and mannose (**Man**). In all cases, high yields between 80–90% (Table S4) and clean conversions were obtained. Byproducts that we detected in small quantities were the linker attached to four sugars (since linker is used in a slight excess) and up to 5% of a species in which two oligonucleotides and two sugars were attached to one linker. We observed that the formation of this side product can be reduced by increasing the Cu⁺ concentration. This changed the ratio of product to by-product from 95:5 to 98:2 (Table S5). Finally, we investigated if the herein reported tandem click reaction can be employed to achieve the synthesis of the oligonucleotide **ORN 3sense 3xGalNAc**, which has the same sequence and chemical modification pattern of inclisiran (Figure 1). To this end we prepared the corresponding oligonucleotide **ORN 3sense** with a special octadiynyl-2'-methoxyuridine-phosphoramidite (**12**) incorporated at the 3'-end (Figure 3a). The synthesis of **12** is depicted in the Supporting Informa-

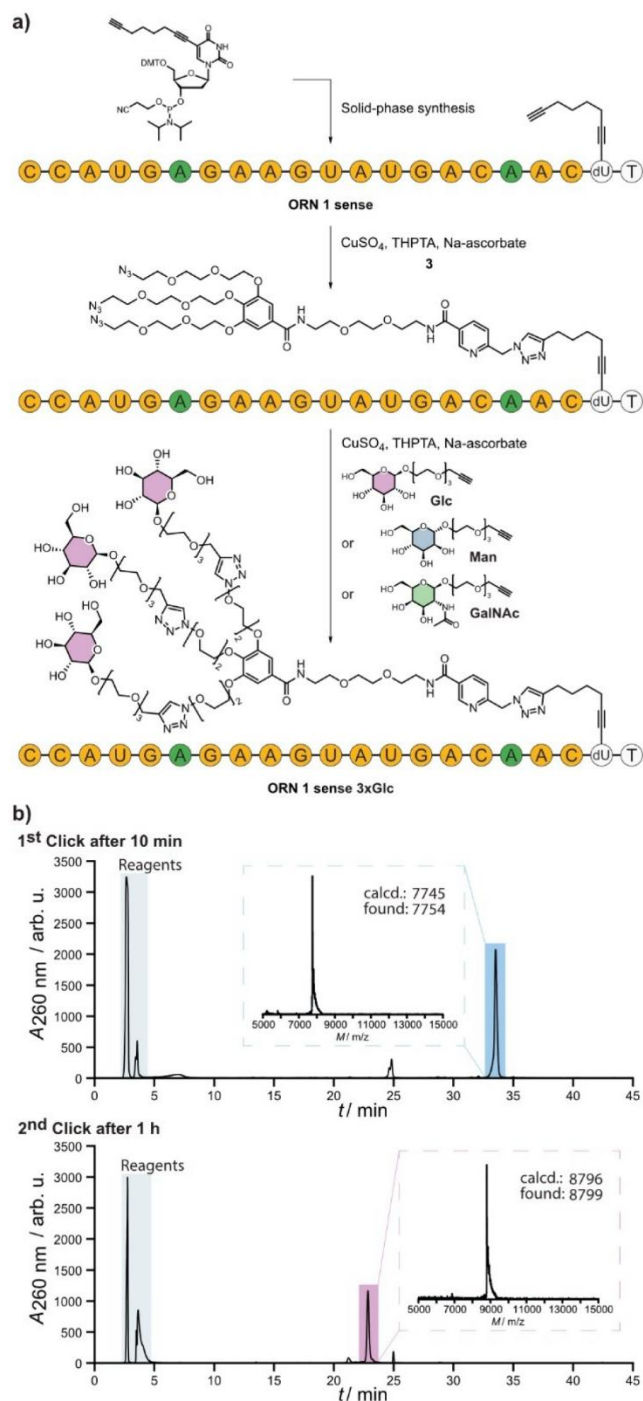


Figure 2. Reaction of alkyne-modified **ORN 1sense** with the tandem click linker **3** and different sugar-alkynes (**Glc**, **Man**, **GalNAc**). a) Overview of the tandem click reaction. b) Time-dependent analysis investigated by HPLC and MALDI-TOF analysis of the main signal. For the color code for the nucleosides, see Figure 1.

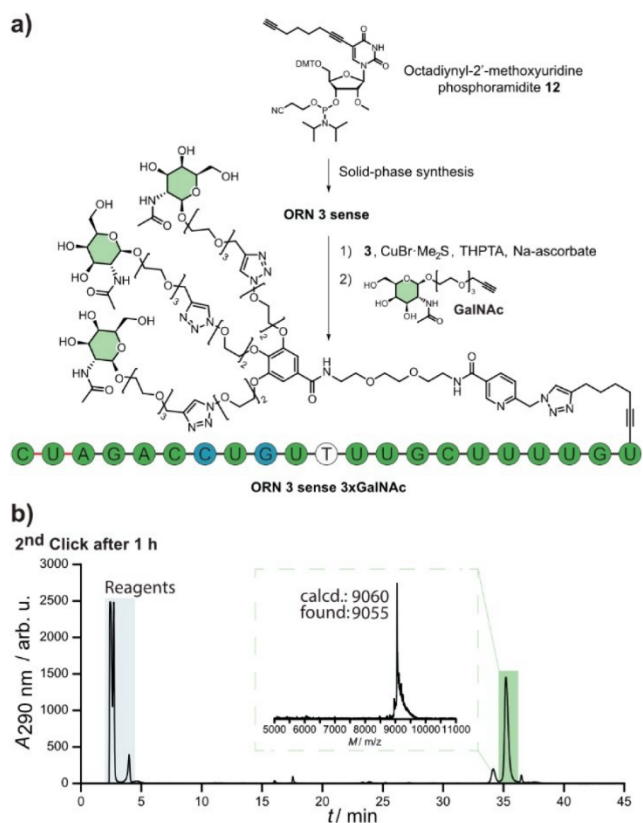


Figure 3. Synthesis of ORN 3 sense 3xGalNAc. a) Overview of the tandem click reaction. b) Crude HPL-chromatogram and MALDI-TOF analysis of the main signal. For the color code for the nucleosides, see Figure 1.

tion (Scheme S1). After successful incorporation of **12** into ORN 3 sense containing ribose- and backbone modifications (phosphorothioates, 2'-OMe, 2'-F) frequently used in oligonucleotide therapeutics,^[12–13] a tandem click reaction with linker **3** and GalNAc was carried out. To prevent desulfurization of the phosphorothioate linkages, CuBr·Me₂S (50 mM in 100 mM THPTA solution in ddH₂O) was used as a copper source.^[28–29] Analysis of the reaction mixture by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry showed complete conversions after 30 min for the first click reaction and after an additional 1 h for the second click reaction. The product was obtained in high yields of 70–80% and byproducts were only detectable in traces (Figure 3b).

Conclusion

In summary, we have developed a tandem click synthesis that allows fast single-pot conversion of siRNAs and other oligonucleotides into highly modified structures, for example, with three sugar units at their respective ends. We performed the tandem click reaction using a dendrimer containing four terminal azides, of which one is a chelating picolyl-azide and three are “normal” alkyl azides. It is known that these azides have vastly different reactivities in the copper-catalyzed click reaction with alkynes. Incorporation

of an alkyne-bearing nucleoside into oligonucleotides, for example, the sequence of inclisiran, allowed us to perform a one-pot tandem click reaction to modify oligonucleotides with three sugar ligands. This method exhibits a broad scope, since both the linker unit and the modifying groups (here sugars) can be easily varied. The possibility of utilizing linkers with multiple arms further enhances the versatility of this approach. In principle, our linker could be adjusted to have two or more than three arms. Importantly, the method allows the functionalization of complex “real life” sequences with multiple ribose and backbone modifications, such as inclisiran.

Acknowledgements

We thank the CRC 1032 (ID: 201269156) and the CRC 1309 (ID: 325871075) for financial support. This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No 741912 (EPIR) and under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 765266 (LightDyNAMics). Further support was obtained by the BMBF Cluster4Future program CNATM and the Bayerische Forschungsstiftung (AZ-1459-20C). We also thank M.Sc. Felix Xu for helpful scientific discussions. 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 in the supplementary material of this article.

Keywords: Click chemistry • Oligonucleotides • Sugar modification • siRNA therapeutics • Bioconjugation

- [1] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [2] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128–1137.
- [3] N. Z. Fantoni, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 7122–7154.
- [4] C. D. Hein, X. M. Liu, D. Wang, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2216–2230.
- [5] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639–3642.
- [6] E. Paredes, S. R. Das, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 125–131.
- [7] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1258–1267.
- [8] K. Brunner, J. Harder, T. Halbach, J. Willibald, F. Spada, F. Gnerlich, K. Sparrer, A. Beil, L. Möckl, C. Bräuchle, K.-K.

- Conzelmann, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1946–1949.
- [9] F. R. Traube, M. Stern, A. J. Tölke, M. Rudelius, E. Mejías-Pérez, N. Raddaoui, B. M. Kümmerer, C. Douat, F. Streshnev, M. Albanese, P. R. Wratil, Y. V. Gärtner, M. Nainytė, G. Giorgio, S. Michalakis, S. Schneider, H. Streeck, M. Müller, O. T. Keppler, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202204556.
- [10] D. Perrone, E. Marchesi, L. Preti, M. L. Navacchia, *Molecules* **2021**, *26*, 3100.
- [11] J. Gierlich, K. Gutmiedl, P. M. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9486–9494.
- [12] T. C. Roberts, R. Langer, M. J. A. Wood, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2020**, *19*, 673–694.
- [13] S. Anwar, F. Mir, T. Yokota, *Pharmaceutica* **2023**, *15*, 1130.
- [14] K. Astakhova, R. Ray, M. Taskova, J. Uhd, A. Carstens, K. Morris, *Mol. Pharmaceutics* **2018**, *15*, 2892–2899.
- [15] W. Ho, X.-Q. Zhang, X. Xu, *Adv. Healthcare Mater.* **2016**, *5*, 2715–2731.
- [16] J. K. Nair, J. L. Willoughby, A. Chan, K. Charisse, M. R. Alam, Q. Wang, M. Hoekstra, P. Kandasamy, A. V. Kel'in, S. Milstein, N. Taneja, J. O'Shea, S. Shaikh, L. Zhang, R. J. van der Sluis, M. E. Jung, A. Akinc, R. Hutabarat, S. Kuchimanchi, K. Fitzgerald, T. Zimmermann, T. J. van Berkel, M. A. Maier, K. G. Rajeev, M. Manoharan, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16958–16961.
- [17] R. L. Setten, J. J. Rossi, S. P. Han, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2019**, *18*, 421–446.
- [18] M. Balwani, E. Sardh, P. Ventura, P. A. Peiró, D. C. Rees, U. Stölzel, D. M. Bissell, H. L. Bonkovsky, J. Windyga, K. E. Anderson, C. Parker, S. M. Silver, S. B. Keel, J.-D. Wang, P. E. Stein, P. Harper, D. Vassiliou, B. Wang, J. Phillips, A. Ivanova, J. G. Langendonk, R. Kauppinen, E. Minder, Y. Horie, C. Penz, J. Chen, S. Liu, J. J. Ko, M. T. Sweetser, P. Garg, A. Vaishnav, J. B. Kim, A. R. Simon, L. Gouya, *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 2289–2301.
- [19] Y. N. Lamb, *Drugs* **2021**, *81*, 389–395.
- [20] H. Cui, X. Zhu, S. Li, P. Wang, J. Fang, *ACS Omega* **2021**, *6*, 16259–16265.
- [21] A. J. Debacker, J. Voutila, M. Catley, D. Blakey, N. Habib, *Mol. Ther.* **2020**, *28*, 1759–1771.
- [22] C. R. Brown, S. Gupta, J. Qin, T. Racie, G. He, S. Lentini, R. Malone, M. Yu, S. Matsuda, S. Shulga-Morskaya, A. V. Nair, C. S. Theile, K. Schmidt, A. Shahraz, V. Goel, R. G. Parmar, I. Zlatev, M. K. Schlegel, J. K. Nair, M. Jayaraman, M. Manoharan, D. Brown, M. A. Maier, V. Jadhav, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 11827–11844.
- [23] R. T. Pon, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2001**, Chapter 3, Unit 3.1.
- [24] P. Kandasamy, S. Mori, S. Matsuda, N. Erande, D. Datta, J. L. S. Willoughby, N. Taneja, J. O'Shea, A. Bisbe, R. M. Manoharan, K. Yucius, T. Nguyen, R. Indrakanti, S. Gupta, J. A. Gilbert, T. Racie, A. Chan, J. Liu, R. Hutabarat, J. K. Nair, K. Charisse, M. A. Maier, K. G. Rajeev, M. Egli, M. Manoharan, *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 2506–2523.
- [25] J. A. Kulkarni, D. Witzigmann, S. B. Thomson, S. Chen, B. R. Leavitt, P. R. Cullis, R. van der Meel, *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16*, 630–643.
- [26] H. Jiang, T. Zheng, A. Lopez-Aguilar, L. Feng, F. Kopp, F. L. Marlow, P. Wu, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 698–706.
- [27] C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5852–5856.
- [28] M. Ora, M. Peltomäki, M. Oivanen, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2939–2947.
- [29] M. Honcharenko, D. Honcharenko, R. Strömberg, *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 1622–1628.

Manuscript received: March 15, 2024

Accepted manuscript online: April 12, 2024

Version of record online: May 16, 2024

4. Unveröffentlichte Arbeiten

4.1. Spezifische Adressierung von Oberflächenrezeptoren

In der vorangegangenen Arbeit (Kapitel 3.1) konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Biokonjugation einer SARS-CoV-2 adressierenden siRNA mit dem ACE2-bindenden Peptid YKYRYL_{OH} eine Reduktion in der Viruslast sowie der virusinduzierten Apoptose in 3D Lungengewebe erzielt werden konnte. Zur weiteren Steigerung der Wirksamkeit der chemisch modifizierten siRNA gegen SARS-CoV-2 sollte im nächsten Schritt dieser Arbeit der Transport in die betroffenen Zellen optimiert werden.

Im Jahr 2020 zeigten CANTUTI-CASTELVETRI *et al.* und DALY *et al.*, dass neben dem ACE2-Rezeptor ebenfalls das Oberflächenprotein Neuropilin-1 (NRP1) für die Aufnahme des SARS-CoV-2 Virus und die damit verbundene Infektion verantwortlich ist.^[292-293] Es ist bekannt, dass Neuropilin-Rezeptoren durch die Bindung an C-terminale Aminosäuresequenzen, die der *C-end rule* (CendR) entsprechen, aktiviert werden können.^[294] Dieses C-terminale Motiv RXXR_{OH}, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt, entsteht bei der Spaltung des Spike-Proteins in seine zwei Untereinheiten S1 und S2 durch die wirtseigene Protease Furin. Die Interaktion von NRP1 mit dem S1 CendR Motiv Arg-Arg-Ala-Arg konnte mit Hilfe von Röntgenkristallographie sowie verschiedenen biochemischen Experimenten, wie beispielsweise der selektiven Inhibierung der S1-NRP1 Interaktion durch Antikörper, nachgewiesen werden.^[292] Im Hinblick auf die Expression stellt der NRP1-Rezeptor neben dem ACE2-Rezeptor ein attraktives therapeutisches Ziel dar. HIKMET *et al.* untersuchten die Expression des ACE2-Rezeptors mittels Immunhistochemie in über 150 verschiedenen Zelltypen und zeigten, dass der ACE2-Rezeptor im respiratorischen System nur in geringer Proteinmenge exprimiert wird.^[295] Im Gegensatz dazu ist der Neuropilin-Rezeptor reichlich in fast allen Lungen-, Geruchs- und Endothelzellen exprimiert.^[292] Zusätzlich zeigte eine Genexpressionsanalyse, dass es sogar zu einer Hochregulation der Neuropilin-Rezeptoren im Lungengewebe von COVID-19 Patienten kommt.^[296] Die Adressierung des Neuropilin-1 Rezeptors birgt daher ein großes Potential für den gezielten siRNA Transport in die betroffenen Zellen.

Die Auswirkung auf die Aufnahme Peptid-konjugierter siRNAs in die Zelle sollte anhand der endogenen, ubiquitär exprimierten Ziel-mRNA humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (hGAPDH) untersucht und verglichen werden. Die hGAPDH-siRNA (**GAP**-siRNA) sowie deren *scrambled* Kontroll-siRNA (**SCR**-siRNA) wurden von SABINE SCHNEIDER in Anlehnung an HAMASAKI *et al.* entwickelt.^[297] Die zugelassenen siRNA-basierten Therapeutika weisen zur Steigerung der Stabilität und der Resistenz gegenüber Endonukleasen 2'-OMe, 2'-F

Substituenten sowie Phosphorothioate auf (Kapitel 1.2).^[72] In der vorangegangenen Arbeit (Kapitel 3.1) konnte gezeigt werden, dass bereits eine teilweise modifizierte siRNA mit lediglich vier 2'-OMe Modifikationen und 2'-Desoxy-Thymidinen am 3'-Überhang die nötige Stabilität für Zellkultur-Studien aufweisen. Daher wurde das Modifikationsmuster für die hGAPDH-Sequenz adaptiert (Abbildung 9). Die Einführung einer Alkin-Modifikation in den jeweiligen Sense Strang erfolgte durch den Einbau eines 2'-Desoxy-Oktadiinyl-Uridin-Phosphoramidits an der zweiten Position des 3'-Überhangs mittels Festphasensynthese. Diese Alkin-Funktionalität ermöglicht eine regioselektive post-synthetische Peptid-Modifizierung mittels Cu^I-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) für die selektive Biokonjugation. Die Modifikation erfolgte am Sense Strang, um potenzielle Auswirkungen auf die RNA-Interferenz zu minimieren und eine gute Zugänglichkeit für den Antisense Strang zu gewährleisten. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte mittels automatisierter Festphasenchemie. Die HPLC und MALDI-TOF-MS Daten zeigen die erfolgreiche Synthese der modifizierten Oligonukleotid Sequenzen **ON1**, **ON2**, **ON3** und **ON4** (Kapitel 6.3).

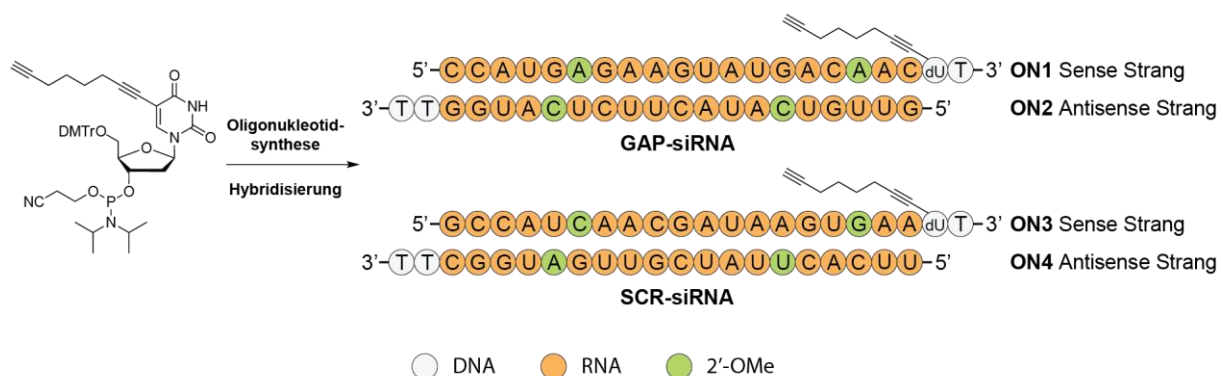


Abbildung 9. Übersicht der synthetisierten siRNAs **GAP-siRNA** und **SCR-siRNA** und das dafür verwendete 2'-Desoxy-Oktadiinyl-Uridin-Phosphoramidit.

Mono-Peptid-Oligonukleotid Konjugate

Im nächsten Schritt sollte die Biokonjugation der RNA-Oligonukleotide **ON1** und **ON3** mit Rezeptor-spezifischen Peptiden erfolgen. Der Neuropilin-1 Rezeptor sollte mit Hilfe des durch TEESULA *et al.* identifizierten NRP1 bindenden CendR-Peptid RPARPAR_{OH} adressiert werden.^[294] Parallel dazu sollte auch das Adressieren des ACE2-Rezeptors optimiert werden. Dafür wurde das durch STRUCK *et al.* beschriebene Hexapeptid YKYRYL_{OH} von MARKUS MÜLLER anhand der Struktur der Bindungstasche des ACE2-Rezeptors um zwei Aminosäuren am N-Terminus ergänzt. Die zusätzlichen Aminosäuren könnten eine weitere potenzielle Kontaktstelle zwischen dem Peptid und der Bindungstasche darstellen.

Für die Synthese der Peptid-Oligonukleotid-Konjugate wurden die von CÉLINE DOUAT synthetisierten Peptide N₃-PEG3-RPARPAR_{OH} (**R_{Azid}**) und N₃-PEG3-YNKYRYL_{OH} (**Y_{Azid}**) jeweils mit den Alkin-enthaltenden Oligonukleotiden **ON1** und **ON3** durch Zugabe von CuSO₄, THPTA und Natriumascorbat unter Argon Atmosphäre zur Reaktion gebracht (Abbildung 10).

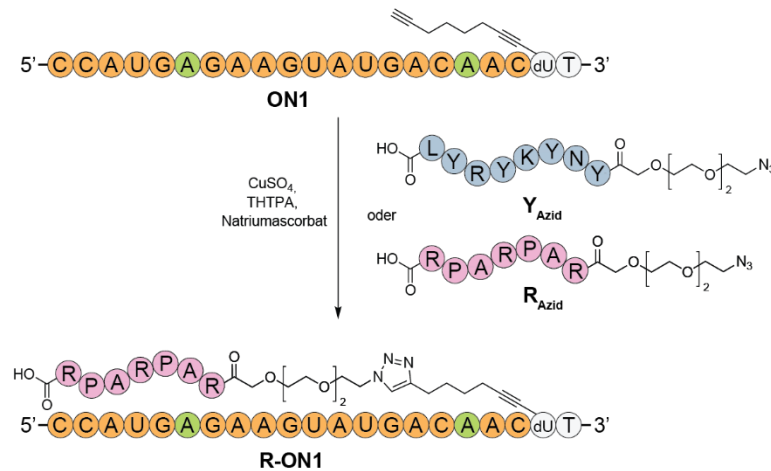


Abbildung 10. Exemplarische Darstellung der CuAAC zwischen dem Oligonukleotid **ON1** und dem Peptid N₃-PEG3-RPARPAR_{OH} (**R_{Azid}**).

Die einzelnen CuAAC Reaktionen wurden mittels MALDI-TOF-MS überwacht, wobei die vollständige Umsetzung des Oligonukleotids zum Peptid-Oligonukleotid-Konjugat bereits nach 30 min nachgewiesen werden konnte. Die Peptid-Oligonukleotid-Konjugate wurden anschließend mittels HPLC aufgereinigt und MALDI-TOF-MS charakterisiert (Kapitel 6.3).

Multivalente Peptid-Oligonukleotid Konjugate

Die Dissoziationskonstanten des RPARPAR_{OH}-NRP1-Komplexes sowie des anfänglichen YKYRYL_{OH}-ACE2-Komplexes liegen mit $K_D = 1,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$ [294] und $K_D = 46 \mu\text{M}$ [298] im niedrigen mikromolaren Bereich. Interessanterweise stellten TEESULA *et al.* bei ihrer Untersuchung der Interaktion zwischen CendR-Peptiden und dem NRP1 fest, dass der Transport und die Durchlässigkeit ins Gewebe durch einen multimeren RPARPAR_{OH}-Komplex um das 100-fache gesteigert werden konnte.[294] Es wäre daher denkbar, dass die beobachtete Affinitätserhöhung im Zusammenhang mit einer erhöhten Avidität steht, wobei ebenfalls eine Rezeptordimerisierung oder -multimerisierung (Rezeptor-Clustering) eine denkbare Hypothese wäre. Daher sollte zum Erreichen einer möglichst hohen Peptid-Rezeptor-Affinität untersucht werden, ob das Modifizieren des Oligonukleotides mit mehreren Peptiden einen positiven Effekt für die zelluläre Aufnahme birgt.

Zur Realisation dieses Vorhabens wurde der bereits im Kapitel 3.2 vorgestellte universell einsetzbare multifunktionale Linker **L4** sowie eine durch FILIPP STRESHNEV synthetisierte Linker-Variante **L3** verwendet (Abbildung 11). Das in den Linkern integrierte Picolylazid reagiert in Click-Reaktionen aufgrund der Ausbildung von Kupfer-Chelaten deutlich schneller mit dem Reaktionspartner als die konventionellen Azide.^[299-300] Das erlaubt eine selektive erste Click-Reaktion zwischen dem Picolylazid und einem Alkin-enthaltenden Oligonukleotid, und durch anschließende Zugabe eines Alkin-enthaltenden Peptids erfolgt die zweite Click-Reaktion mit den konventionellen Aziden. Der Unterschied in den Reaktivitäten der Azide ermöglicht eine selektive Biokonjugation in einer *one-pot*-Reaktion.

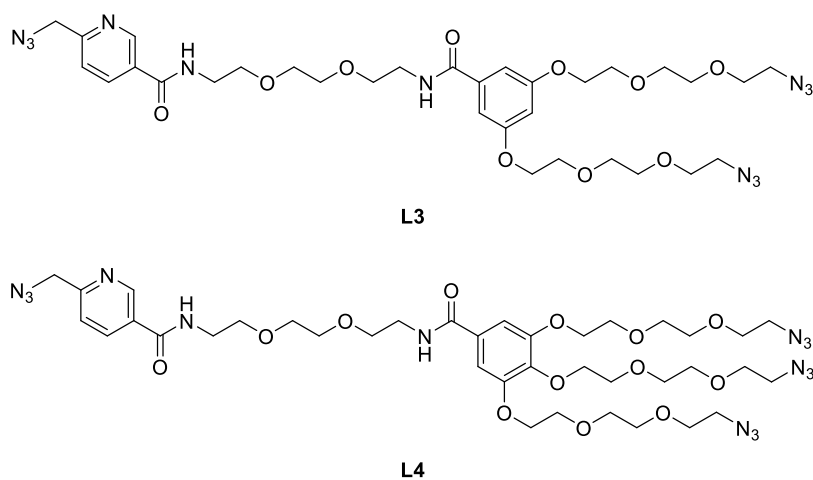


Abbildung 11. Chemische Struktur der multifunktionalen Linker **L3** und **L4**.

Die Alkin-modifizierte Oligonukleotide **ON1** und **ON3** wurden entweder mit dem Linker **L3** (Abbildung 12a) oder dem Linker **L4** (Abbildung 12b) durch Zugabe von CuSO₄, THPTA und Natriumascorbat unter Argon Atmosphäre zur Reaktion gebracht. Die Bildung der einzelnen Linker-Oligonukleotid-Konjugate wurde mittels HPLC und MALDI-TOF-MS überwacht, eine vollständige Umsetzung des Oligonukleotides konnte bereits nach 10 min beobachtet werden. Ausführliche Untersuchungen zur Selektivität und Kinetik der Reaktion wurden in Kapitel 3.2 am Beispiel des Linkers **L4** durchgeführt und diskutiert. Die verschiedenen Linker-Oligonukleotid-Konjugate wurden ohne weitere Aufreinigung in einer zweiten Click-Reaktion mit den durch CÉLINE DOUAT synthetisierten Alkin-enthaltenden Peptiden Alkin-PEG4-RPARPAR_{OH} (**R_{Alkin}**) und Alkin-PEG4-YNKYRYL_{OH} (**Y_{Alkin}**) funktionalisiert, wodurch abhängig vom Linker Di-Peptid- oder Tri-Peptid-Oligonukleotid-Konjugate erhalten werden konnten.

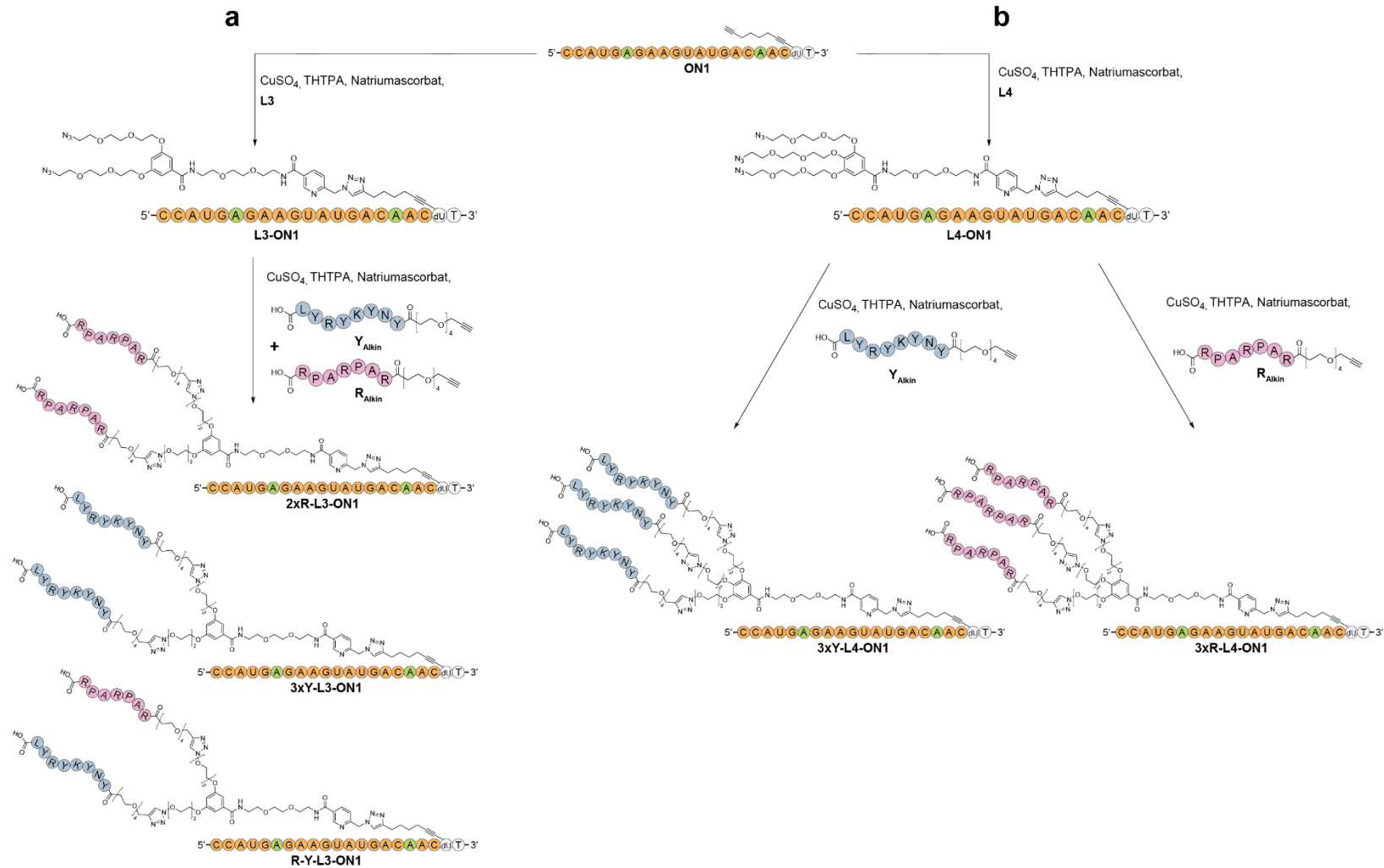


Abbildung 12. Exemplarische Darstellung der CuAAC zur Bildung von (a) Di-Peptid-Oligonukleotid-Konjugaten durch die Reaktion des Oligonukleotides **ON1** mit dem Linker **L3** und anschließender Zugabe der Peptide Alkin-PEG4-YNKYRYL_{OH} (**Y_{Alkin}**) und Alkin-PEG4-RPARPAR_{OH} (**R_{Alkin}**) sowie zur Bildung von (b) Tri-Peptid-Oligonukleotid-Konjugaten durch die Reaktion des Oligonukleotides **ON1** mit dem Linker **L4** und anschließender Zugabe des Alkin-PEG4-YNKYRYL_{OH} (**Y_{Alkin}**) Peptids oder des Alkin-PEG4-RPARPAR_{OH} (**R_{Alkin}**) Peptids.

Di-Peptid-Oligonukleotid Konjugate

Die Konjugation der **L3**-Oligonukleotid-Konjugate erfolgte durch gleichzeitige Zugabe des **R_{Alkin}**- und **Y_{Alkin}**-Peptids (1/1, 8,0 Äq.), was theoretisch zur Bildung von drei verschiedenen Konjugaten führen könnte: **2xR-L3**-Oligonukleotid, **2xY-L3**-Oligonukleotid und **R-Y-L3**-Oligonukleotid. Für die Untersuchungen im Hinblick auf die Avidität sind die **2xR-L3**-Oligonukleotid und **2xY-L3**-Oligonukleotid Konjugate essenziell. Dahingegen ist die Verknüpfung beider Peptide über den **L3**-Linker an ein Oligonukleotid (**R-Y-L3**-Oligonukleotid) von Interesse, da es die Interaktion mit dem ACE2 sowie dem NRP1 ermöglichen könnte. Die Konjugationsreaktionen wurden für 19 h geschüttelt, bevor die Reagenzien unter Verwendung einer Größenausschluss säule entfernt wurden. Die anschließende Analyse erfolgte mittels analytischer HPLC (Abbildung 13).

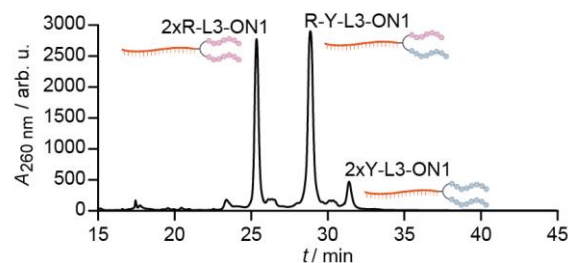


Abbildung 13. Exemplarisches Rohprodukt-HPL-Chromatogramm der Umsetzung des Linker-Oligonukleotid-Konjugats **L3-ON1** mit **R_{Alkin}** und **Y_{Alkin}** (1/1) nach 19 h und Aufarbeitung mittels Größenausschluss säule.

Durch MALDI-TOF-MS konnte das Signal bei einer Retentionszeit von 25,3 min dem **2xR-L3**-Oligonukleotid-Konjugat, das Signal bei 28,8 min dem **R-Y-L3**-Oligonukleotid-Konjugat und das Signal bei 31,3 min dem **2xY-L3**-Oligonukleotid-Konjugat zugeordnet werden. Auffällig ist das im Vergleich deutlich geringere Integral des Signals bei 31,3 min. Eine mögliche Ursache für das geringe Integral des **2xY-L3**-Oligonukleotid-Konjugats könnte eine zu geringe Löslichkeit des **Y_{Alkin}**-Peptids sein, wodurch das **L3**-Oligonukleotid bevorzugt mit dem **R_{Alkin}**-Peptid reagiert. Durch die Aufreinigung der Signale mittels HPLC und anschließender Quantifizierung konnte festgestellt werden, dass mehr von dem **R-Y-L3**-Oligonukleotid-Konjugat (12,5 %) als von dem **2xR-L3**-Oligonukleotid-Konjugat (8,5 %) gebildet wurde. Die Ausbeuten deuten darauf hin, dass es zu keiner bevorzugten Reaktion mit dem **R_{Alkin}**-Peptid kommt, sondern eine unzureichende Löslichkeit des **2xY-L3**-Oligonukleotid-Konjugats während der Aufarbeitung vermutet werden kann. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Konjugationsreaktionen erneut durchgeführt und durch anschließende Zugabe eines Überschusses an Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zur Komplexierung der Kupfer-Kationen gestoppt. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mittels HPLC, wodurch die Konjugate **2xR-L3**-

Oligonukleotid-Konjugat (9,0 %), **R-Y-L3-Oligonukleotid-Konjugat** (21,1 %) und **2xY-L3-Oligonukleotid-Konjugat** (9,5 %) in hoher Reinheit erhalten werden konnten (Abbildung 14).

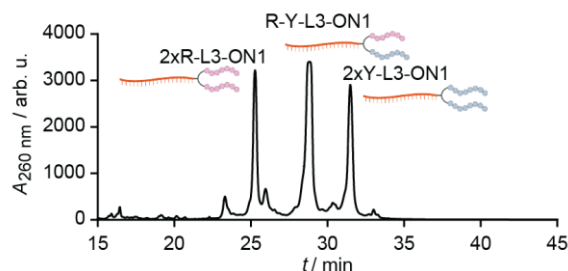


Abbildung 14. Exemplarisches Rohprodukt-HPL-Chromatogramm der Umsetzung des Linker-Oligonukleotid-Konjugats **L3-ON1** mit **R_{Alkin}** und **Y_{Alkin}** (1/1) nach 19 h mit anschließender Zugabe von EDTA.

Durch das signifikant größere Signal bei einer Retentionszeit von 31,3 min im Rohprodukt-HPL-Chromatogramm in Abbildung 14 im Gegensatz zu Abbildung 13 sowie der höheren Ausbeuten der drei verschiedenen Konjugate kann angenommen werden, dass die Verwendung der Größenausschluss säule zur Entfernung der Reagenzien mit der Reduktion der Konjugat-Ausbeuten einhergeht.

Tri-Peptid-Oligonukleotid Konjugate

Die parallel durchgeführten Konjugationen der **L4-Oligonukleotid-Konjugate** erfolgten durch Zugabe von **R_{Alkin}** oder **Y_{Alkin}** (10 Äq.) und zunächst mit anschließender Entfernung der Reagenzien unter Verwendung einer Größenausschluss säule. Die Analyse mittels analytischer HPLC bestätigte die vollständige Umsetzung der **3xR-L4-Oligonukleotid-Konjugate** nach 3,5 h, aber nicht der **3xY-L4-Oligonukleotid-Konjugate** (Abbildung 15). Durch MALDI-TOF-MS konnte das Signal mit einer Retentionszeit von 26 min als das **2xY-L4-Oligonukleotid-Konjugat** charakterisiert werden.

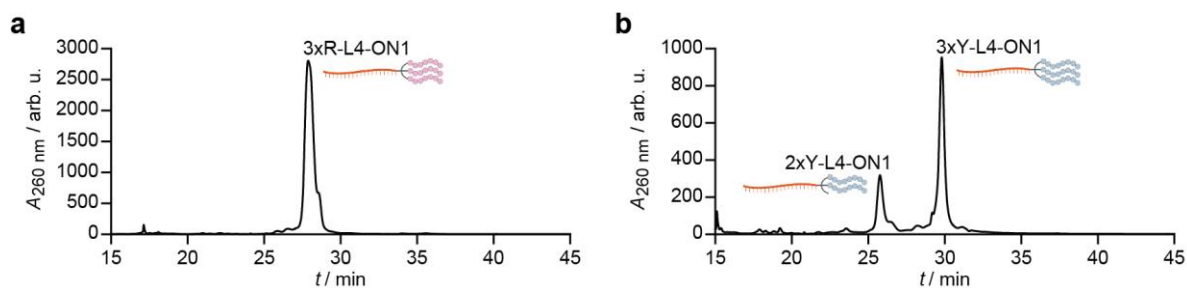


Abbildung 15. Exemplarische Rohprodukt-HPL-Chromatogramme der Umsetzung des Linker-Oligonukleotid-Konjugats **L4-ON1** mit (a) **R_{Alkin}** und (b) **Y_{Alkin}** nach 3,5 h und Aufarbeitung mittels Größenaustausch säule.



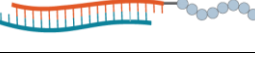
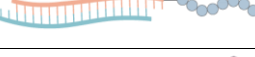
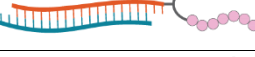
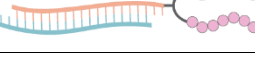
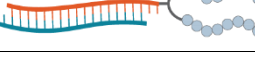
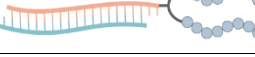
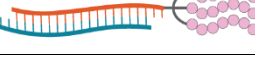





Während der Konjugation des Y_{Alkin} -Peptids konnte eine Trübung der Reaktionslösung beobachtet werden. Es kann daher angenommen werden, dass aufgrund einer schlechteren Löslichkeit des Y_{Alkin} -Peptids unter den Reaktionsbedingungen eine längere Reaktionszeit für die vollständige Umsetzung benötigt wird. Ebenfalls ist auffällig, dass bei gleicher Ansatzgröße und vollständigem Umsatz des **L4**-Oligonukleotides die Intensität und somit das Integral des **3xY-L4**-Oligonukleotid-Konjugats im Gegensatz zum **3xR-L4**-Oligonukleotid-Konjugat im HPL-Chromatogramm deutlich geringer ist (Abbildung 15). Diese Beobachtung könnte auf eine unzureichende Löslichkeit des Konjugats während der Aufarbeitung mittels Größenausschluss säule hindeuten. Zur Überprüfung der Hypothesen wurden die Konjugationsreaktionen mit einer Reaktionszeit von 19 h durchgeführt und anschließend durch Zugabe eines Überschusses an EDTA gestoppt. Die Aufreinigung mittels HPLC und MALDI-TOF-MS Charakterisierung ergaben für das **3xR-L4**-Oligonukleotid-Konjugat eine vollständige Umsetzung sowie eine Steigerung der Ausbeute von 14 % auf 58 %. Trotz der Verlängerung der Reaktionszeit und des Überschusses an Y_{Alkin} -Peptid wurde sowohl das **2xY-L4**-Oligonukleotid-Konjugat als auch das **3xY-L4**-Oligonukleotid-Konjugat erhalten. Allerdings führte die Komplexierung der Kupfer-Kationen durch EDTA anstatt der Verwendung einer Größenausschluss säule zu einer deutlich höheren Ausbeute mit einer Steigerung von ≤ 2 % auf 30 %.

Die anhand der etablierten Click-Reaktionsvorschriften synthetisierten Konjugate wurden mittels HPLC aufgereinigt und MALDI-TOF-MS charakterisiert (Kapitel 6.3). Bei den zuvor aufgeführten Ausbeuten handelt es sich um die mittels HPLC in hoher Reinheit erhaltenen Ausbeuten. Zur weiteren Optimierung der Click-Protokolle könnte zukünftig eine Eichgerade für die verschiedenen Konjugate erstellt werden, um anhand dieser eine bessere Aussage über die tatsächlichen Ausbeuten und Verhältnisse zu Nebenprodukten zu treffen. Im Zusammenhang der Funktionalisierung von Linker-Oligonukleotiden mit dem Y_{Alkin} -Peptid könnten Untersuchungen bezüglich des Reaktionslösungsmittels erfolgen, um eine verbesserte Löslichkeit und somit eine Steigerung der Ausbeute zu erzielen.

Zellkultur-Studien

Für die Zellkultur-Studien in A549-Zellen wurden die Peptid-Oligonukleotid-Konjugate mit ihrem entsprechenden Antisense Strang in äquimolar Menge zusammengegeben und durch Erhitzen auf 95 °C und anschließendem langsamen Abkühlen auf 10 °C hybridisiert (Tabelle 2). Anschließend biologische Experimente wurden von YASMIN GÄRTNER durchgeführt.

Tabelle 2. Zusammenfassung der Peptid-modifizierten siRNA-Konjugate. A_m: 2'-OMe-A, G_m: 2'-OMe-G, C_m: 2'-OMe-C, U_m: 2'-OMe-U, dT: Thymidin, X: 2'-Desoxy-Oktadiinyl-Uridin.

Duplex (Sense/Antisense)	Sequenz	Struktur
R-GAP-siRNA (R-ON1/ON2)	CCAUGA _m GAAGUAUGACA _m ACX (R) dT dTdT GGUAC _m UCUUCAUAC _m UGUUG	
R-SCR-siRNA (R-ON3/ON4)	GCCAUC _m AACGAUAAGUG _m AAX (R) dT dTdT CGGUA _m GUUGCUAUU _m CACUU	
Y-GAP-siRNA (Y-ON1/ON2)	CCAUGA _m GAAGUAUGACA _m ACX (Y) dT dTdT GGUAC _m UCUUCAUAC _m UGUUG	
Y-SCR-siRNA (Y-ON3/ON4)	GCCAUC _m AACGAUAAGUG _m AAX (Y) dT dTdT CGGUA _m GUUGCUAUU _m CACUU	
2xR-GAP-siRNA (2xR-L3-ON1/ON2)	CCAUGA _m GAAGUAUGACA _m ACX (R) ₂ dT dTdTGGUAC _m UCUUCAUAC _m UGUUG	
2xR-SCR-siRNA (2xR-L3-ON3/ON4)	GCCAUC _m AACGAUAAGUG _m AAX (R) ₂ dT dTdTTCGGUA _m GUUGCUAUU _m CACUU	
2xY-GAP-siRNA (2xY-L3-ON1/ON2)	CCAUGA _m GAAGUAUGACA _m ACX (Y) ₂ dT dTdTGGUAC _m UCUUCAUAC _m UGUUG	
2xY-SCR-siRNA (2xY-L3-ON3/ON4)	CCAUGA _m GAAGUAUGACA _m ACX (Y) ₂ dT dTdTGGUAC _m UCUUCAUAC _m UGUUG	
3xR-GAP-siRNA (3xR-L4-ON1/ON2)	CCAUGA _m GAAGUAUGACA _m ACX (R) ₃ dT dTdTGGUAC _m UCUUCAUAC _m UGUUG	
3xR-SCR-siRNA (3xR-L4-ON3/ON4)	GCCAUC _m AACGAUAAGUG _m AAX (R) ₃ dT dTdTTCGGUA _m GUUGCUAUU _m CACUU	
3xY-GAP-siRNA (3xY-L4-ON1/ON2)	CCAUGA _m GAAGUAUGACA _m ACX (Y) ₃ dT dTdTGGUAC _m UCUUCAUAC _m UGUUG	
3xY-SCR-siRNA (3xY-L4-ON3/ON4)	CCAUGA _m GAAGUAUGACA _m ACX (Y) ₃ dT dTdTGGUAC _m UCUUCAUAC _m UGUUG	
R&Y-GAP-siRNA (R-Y-L3-ON1/ON2)	CCAUGA _m GAAGUAUGACA _m ACX (R) (Y) dT dTdTGGUAC _m UCUUCAUAC _m UGUUG	
R&Y-SCR-siRNA (R-Y-L3-ON3/ON4)	GCCAUC _m AACGAUAAGUG _m AAX (R) (Y) dT dTdTTCGGUA _m GUUGCUAUU _m CACUU	

Die biologische Aktivität der in Tabelle 2 angegebenen siRNAs sollte mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt werden. Hierfür wurden als Negativkontrollen die nicht konjugierte siRNA gegen hGAPDH (**GAP-siRNA: ON1/ON2**) und deren *scrambled* Kontroll-siRNA (**SCR-siRNA: ON3/ON4**) verwendet. Als Positivkontrolle wurde **GAP-siRNA** mit dem Transfektionsreagenz RNAiMAX transfiziert.

Aus den erhaltenen biologischen Daten lassen sich aufgrund starker Schwankungen in den Datenpunkten zwischen einzelnen Experimenten, nicht reproduzierbaren *Knockdown*-Raten sowie keinerlei Konzentrationsabhängigkeit keine klaren Schlussfolgerungen ziehen. Des Weiteren zeigten die Negativkontrollen nicht die zu erwartenden Ergebnisse, was auf eine notwendige Optimierung des Zell-Assays und/oder des qPCR-Assays hindeutet. Möglichkeiten

reichen hierbei von der Variation der Inkubationszeit, über verschiedene Methoden (TaqMan vs. SYBR Green) bis hin zur Auswahl des *Targets*. Die Wahl eines *Housekeeper* Gens wie GAPDH könnte aufgrund der hohen Expression sowie dem Auslösen von Kompensationsmechanismen bei einer Unterdrückung problematisch sein. Im Anschluss an die Etablierung eines zuverlässigen Assays zur Quantifizierung der siRNA Effizienz können die Peptid-konjugierten siRNAs erneut getestet und anhand der Daten weiterentwickelt werden. Faktoren wie die Linker-Länge, die Stabilität der siRNAs und deren Optimierung mit Basen, Ribose- und Rückgratmodifikationen (Kapitel 1.2.1) und die Herausforderung der endosomalen Freisetzung (Kapitel 1.2.4) können hierbei von besonderem Interesse sein.

Untersuchungen in Bezug auf die Aufnahme Peptid-modifizierter siRNAs vor allem über den Neuropilin-1 Rezeptor sind nicht nur im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 bedeutend. NRP1 spielt eine entscheidende Rolle als Zelleintrittsfaktor für das humanen T-lymphotrope Virus 1^[301] sowie für das Epstein-Barr-Virus^[302], weist eine Hochregulation in den Lungen von Patienten mit Influenza A Virus (H1N1)^[296] auf und wird in Tumorzellen überexprimiert.^[294] Daher ist der Rezeptor-vermittelte siRNA Transport über NRP1 von hoher Relevanz.

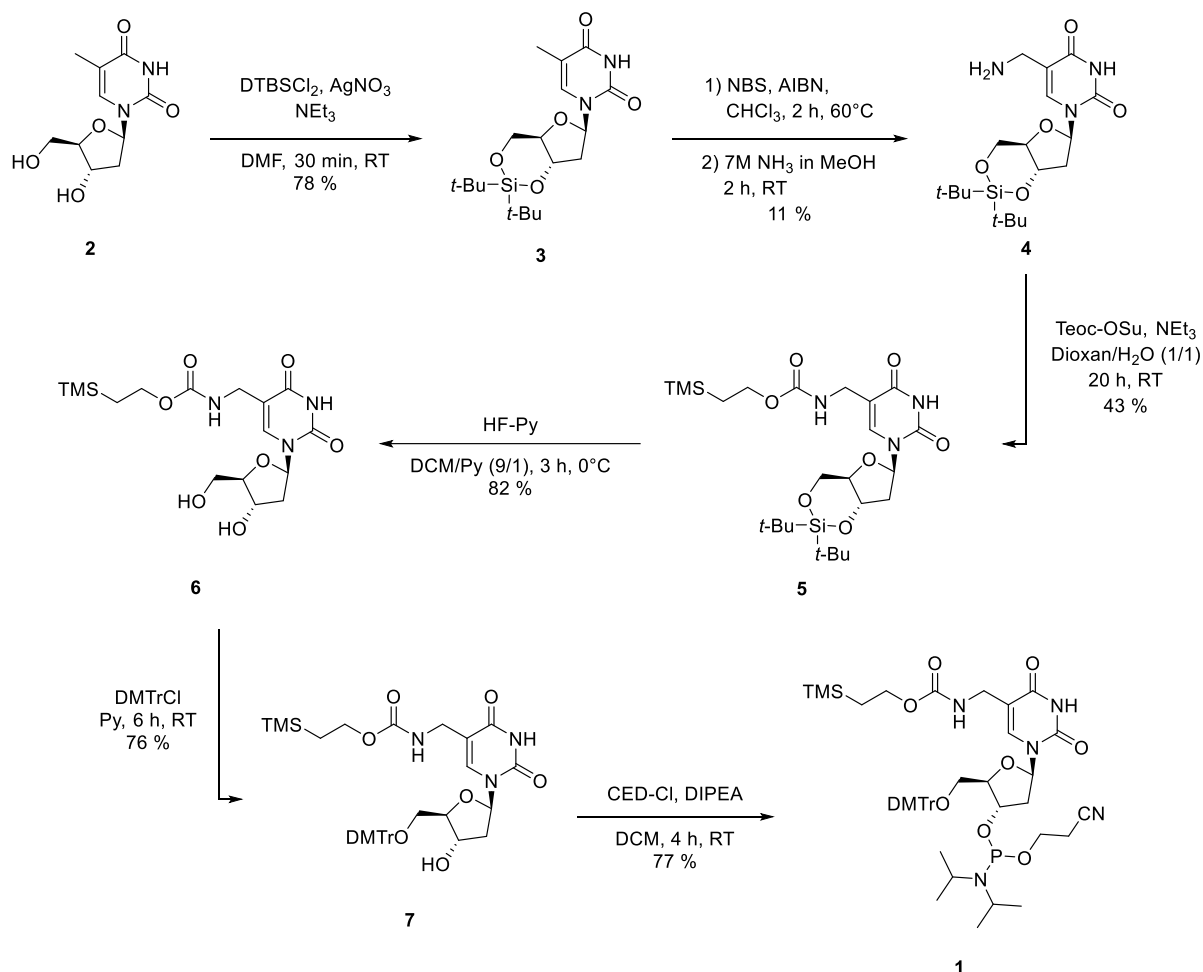
4.2. Ansatz zur Untersuchung der endosomalen Freisetzung

Nachdem das Oligonukleotid die Zielzelle erreicht hat, wird es mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen. Da Oligonukleotide polyanionische Makromoleküle sind, ist es eine große Herausforderung, die endosomale Lipiddoppelschicht zu überwinden. Als Folge daraus bleiben rund 99 % der RNA-Therapeutika in den Endosomen eingeschlossen,^[224-225] wodurch lediglich 1-2 % der GalNAc-konjugierten Gapmere^[222] und 0,3 % der GalNAc-konjugierten siRNAs^[223] aus dem Endosom gelangen und ihre therapeutische Wirkung ausüben können. Die niedrigen Freisetzungsraten aus dem Endosom, der Abbau der Oligonukleotide durch lysosomale Enzyme und Exozytose limitieren die Menge an Oligonukleotid für eine therapeutische Wirkung.^[72-73] Daher ist es von großer Bedeutung die Herausforderung der Freisetzung von Oligonukleotiden aus dem Endosom anzugehen.

Zur Optimierung der Freisetzung von siRNAs aus dem Endosom sollte die Entwicklung einer weiteren Funktionalisierung der siRNA erfolgen, die die drei folgenden Kriterien erfüllt. Erstens sollte unter den vorherrschenden Bedingungen im Endosom (pH 5-6) das endosomale *Escape* induzierende Molekül mit minimaler struktureller Veränderung von der siRNA abspaltbar sein. Zweitens sollte ein Baukastensystem entwickelt werden, das die Möglichkeit der schnellen Variation des endosomalen *Escape* induzierenden Moleküls ohne lange Syntheserouten zulässt. Drittens sollte durch die Veränderung der siRNA kein Verlust in der Transporteffizienz und der Unterdrückung der mRNA erfolgen. Eine gängige Strategie für spaltbare Bindungen ist das Einführen einer säurelabilen Bindung innerhalb des Linker Moleküls.^[242] Ein interessanter Ansatz ist das von KEVIN MAIER und ERNST WAGNER entwickelte pH-gesteuerte Shuttle-System. Der Azidomethyl-Methylmaleinsäureanhydrid (AzMMMan)-Linker ist zum einen mit Click-Chemie kompatibel und zum anderen beinhaltet dieser eine reversible pH-sensitive Bindung, die bei physiologischem pH-Wert stabil, aber bei einem leicht sauren pH-Wert instabil ist, wodurch der Linker spurlos abgespalten wird. Ausgehend von Dimethylmaleinsäureanhydrid kann der Linker durch eine einfache 2-Schritt-Synthese erhalten werden. Die anschließende Biokonjugation kann durch die Reaktion der Maleinsäureanhydrid-Einheit mit einer Amino-Gruppe und der Azid-Einheit mit einem Alkin erfolgen.^[283] Diese Eigenschaften qualifizieren den Linker als Ansatz für die anpassungsfähige Funktionalisierung der siRNA.

Da siRNAs Duplexe sind, die sich aus zwei komplementären Strängen zusammensetzen, besteht theoretisch die Möglichkeit der Modifikation an vier verschiedenen terminalen Stellen (Kapitel 1.3). Das 5'-Ende des Antisense Strangs ist von großer Bedeutung für die Interaktion mit der RNAi Maschinerie und sollte daher nicht chemisch modifiziert werden.^[47-48, 241] Da bereits unser etablierter siRNA Duplex am 3'-Ende des Sense Strangs mit der *Targeting*-Einheit

modifiziert ist, sollte die Modifikation zur Minimierung von *off-target* Effekten sowie zur Erhaltung der Antisense Effizienz am 5'-Ende des Sense Strangs erfolgen. Für eine mögliche Konjugation mit dem AzMMMan-Linker sollte die natürlich vorkommende und Amin-modifizierte Nukleobase 5-Methylaminomethyl-uracil (mnm⁵U) an Stelle des Thymins am 5'-Ende des Sense Strangs inkorporiert werden. Dafür erfolgte zunächst die Synthese des Teoc-geschützten 5-Methylaminomethyl-2'-desoxy-uridin (mnm⁵dU)-Phosphoramidites (**1**) in Anlehnung an MÜLLER *et al.* (Schema 1).^[303]



Schema 1. Syntheseroute ausgehend von Thymidin (**2**) zum Teoc-geschützten 5-Methylaminomethyl-2'-desoxy-uridin-Phosphoramidit (**1**) in Anlehnung an MÜLLER *et al.*^[303]

Ausgehend von kommerziell erhältlichen Thymidin (**2**) kann das Teoc-geschützte mnm⁵dU-Phosphoramidit (**1**) in sechs Schritten erhalten werden. Die Syntheseroute startete mit der Schützung der 5'-OH und 3'-OH Gruppen, wodurch das Silyl-geschützte Nucleosid **3** erhalten wurde. Anschließend erfolgte eine Wohl-Ziegler Reaktion mit direkter Umsetzung durch Zugabe von Ammoniak zum 5-Aminomethyl Derivat **4**. Die Schützung der Aminogruppe erfolgte durch die Zugabe von Teoc-Succinimid, und das entstandene Nucleosid **5** wurde mit HF·Py umgesetzt, um das Silyl-entschützte Nucleosid **6** zu erhalten. Es erfolgte die Schützung der primären 5'-OH Gruppe mit DMTrCl zu **7**, welches im letzten Schritt durch die Zugabe von CEDCl das

Phosphoramidit **1** bildete. Mittels automatisierter Festphasensynthese konnte das Teoc-mnm⁵dU-Phosphoramidit (**1**) am 3'-Ende des Oligonukleotides erfolgreich und mit einer hohen Kopplungsausbeute inkooperiert werden.

Für zukünftige Studien sollte zunächst die Entschützung der Teoc-Schutzgruppe des synthetisierten Oligonukleotids erfolgen. Zur selektiven Abspaltung der Teoc-Gruppe könnte in Anlehnung an MÜLLER *et al.* das noch an die Festphase gekoppelte Oligonukleotid mit einer gesättigten ZnBr₂-Lösung in MeNO₂/IPA (1/1) inkubiert werden. Durch anschließendes Entfernen des Überstands und Waschen des Trägermaterials mit EDTA_(aq.) und Wasser wird das an die Festphase-gekoppelte, voll geschützte Oligonukleotid mit einer freien Amin-Gruppe erhalten. Die Abspaltung von der Festphase und aller Schutzgruppen sowie die Aufreinigung und Charakterisierung könnte nach dem Standardprotokoll in Kapitel 6.1 erfolgen. Nach erfolgreicher Synthese des AzMMMan-Linkers in Anlehnung an MAIER *et al.* könnte im nächsten Schritt die Konjugationsreaktion des Oligonukleotides mit dem Linker durchgeführt werden. Bei der Konjugation ist davon auszugehen, dass aufgrund der höheren Reaktivität des primärenamins im Vergleich zu den sekundären Aminen des Oligonukleotids der Linker selektiv mit diesem reagiert. Eine Überprüfung dieser Hypothese könnte durch einen Verdau des Oligonukleotids mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung erfolgen. Die darauffolgende Click-Reaktion könnte nach dem Standard-Click-Protokoll (Kapitel 6.2) durchgeführt werden, wobei aufgrund des säurelabilen Linkers ein Puffersystem mit einem pH-Wert von 8 verwendet werden sollte. Da für die Anhydrid-Stabilität unter sauren Bedingungen der Substitutionsgrad der Doppelbindung entscheidend ist, sollte eine Untersuchungen zur pH-Stabilität durchgeführt werden. Dabei können potenzielle Optimierungen des säurelabilen Linkers durch die Veränderung der Anzahl, Struktur sowie der Position der Substituenten an der *cis*-Doppelbindung des Maleinsäureanhydrids erfolgen.^[304-305] Dieses Konzept bietet die Möglichkeit der Funktionalisierung von Oligonukleotiden mit diversen Alkin-modifizierten endosomalen *Escape* induzierenden Molekülen (Kapitel 1.2.4).

5. Materialien und Methoden

Chemische Synthese

Alle Reaktionen, in denen luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Reagenzien verwendet wurden, wurden unter Anwendung der SCHLENK-Technik unter inerter Atmosphäre durchgeführt. Die dafür verwendeten Reaktionsgefäße wurden im Hochvakuum bei 550 °C ausgeheizt und nach dem Auskühlen mit Schutzgas geflutet. Bei SCHLENK-Reaktionen wurden Flüssigkeiten unter Verwendung von Septen und mit Schutzgas-gespülten Einwegspritzen zugeführt und Feststoffe unter Schutzgas-Gegenstrom zugegeben. Für Reaktionen, in denen Flusssäure verwendet wurde, wurden Polypropylen Reaktionsgefäße verwendet.

Chemikalien und Lösungsmittel

Die kommerziell erhältlichen Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen *ABCR*, *Acros organics*, *BOC Sciences*, *Carbosynth*, *Fluka*, *Jena Bioscience*, *Merck*, *Sigma-Aldrich* und *TCI* bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für chemische Synthesen wurden über Molsieb getrocknete Lösungsmittel der Firma *Sigma-Aldrich* verwendet, welche unter Schutzgasatmosphäre entnommen wurden. Für Extraktionen und Aufreinigungen mittels Säulenchromatographie wurden technische Lösungsmittel verwendet, die zuvor destilliert wurden.

Rotationsverdampfer

Zur Destillation der Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entweder ein *Laborota 4000-efficient* der Firma *Heidolph Instruments* oder ein *Rotavapor R-300* der Firma *Büchi* verwendet. Lösungsmittel wurden bei 45 °C entfernt, sofern nicht anders angegeben.

Bidestilliertes Wasser

Für HPLC-Aufreinigungen und RNA-Experimente wurde Wasser in Form von Reinstwasser verwendet. Dieses wurde entweder durch das Wasseraufbereitungssystem *Arium® pro H20PRO-DI-D* der Firma *Sartorius* oder *OmniaPure xs^{basic}* der Firma *Stakpure* erhalten.

Lyophilisation

Zum Entfernen der Lösungsmittel mittels Gefriertrocknung wurden die Proben zunächst mit N₂ eingefroren und unter Verwendung des Lyophilisators *ALPHA 2-4 LD plus* der Firma *Christ* getrocknet. Zum Trocknen von synthetisierten Phosphoramiditen und deren Vorstufe wurden die entsprechenden Proben aus Benzol unter Hochvakuum lyophilisiert.

pH-Meter

Ein pH-Meter *MP 220* der Firma *Mettler Toledo* wurde für pH-Messungen verwendet. Vor jeder Messung wurde das pH-Meter mit einer pH 4,0, pH 7,0 und pH 9,2 Standardlösung kalibriert.

Dünnschichtchromatographie

Durch Dünnschichtchromatographie (DC) wurden der Reaktionsverlauf und der Verlauf der Säulenchromatographie überprüft. Dafür wurden mit Kieselgel *60 F₂₅₄* beschichtete Aluminiumplatten der Firma *Merck* verwendet. Die Visualisierung erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 366 nm) oder durch Anfärben mit einer Cer-Ammoniummolybdat-Lösung, Kaliumpermanganat-Lösung, Ninhydrin-Lösung oder *p*-Anisaldehyd-Lösung.

Flash-Säulenchromatographie

Für die säulenchromatographische Aufreinigung der Rohprodukte wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* (Korngröße: 63-200 μm) oder der Firma *Macherey-Nagel* (Korngröße: 40-630 μm) als stationäre Phase verwendet. Als mobile Phase dienten technische Lösungsmittel, die vor der

Verwendung unter verminderten Druck destilliert wurden. Die Aufreinigung erfolgte unter leichtem Stickstoff-Überdruck nach der *Flash*-Methode. Fraktionen wurden je nach Ansatzgröße in 10-250 mL Gefäßen gesammelt, mittels DC oder LC-MS analysiert und entsprechend vereinigt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) erfolgte nach dem Umkehrphasen-Prinzip. Zur semi-präparativen Aufreinigung von Rohprodukten wurde ein *Agilent Technologies 1260 Infinity II Manual Preparative 400 bar* System der Firma *Agilent* mit einem *G7114A* Detektor verwendet. Als stationäre Phase diente eine *VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18ec* Chromatographiesäule der Firma *Macherey-Nagel* bei einer Flussrate von 5,0 mL/min. Für analytische Untersuchungen sowie für die Aufreinigung von Click-Reaktionen wurde ein *Agilent Technologies 1260 Infinity II 800 bar* System der Firma *Agilent* mit einem *G7165A* Detektor verwendet. Als stationäre Phase diente eine *EC 250/4 Nucleodur 100-3 C18ec* Chromatographiesäule der Firma *Macherey-Nagel* bei einer Flussrate von 1,0 mL/min. Für die Aufreinigung und Analyse wurde ein 100 mM NEt_3/HOAc Puffersystem verwendet (Puffer A: 100 mM NEt_3/HOAc , pH 7 in H_2O und Puffer B: 100 mM NEt_3/HOAc pH 7 in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 20/80). Die verwendeten Gradienten sind bei den jeweiligen Vorschriften in Klammern als prozentuale Volumenanteile angegeben.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen wurden eindimensionale ^1H -, ^{13}C -, ^{31}P -NMR-Spektren und zweidimensionale ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren an einem *Bruker Ascend 400*, *Bruker Ascend 500* oder in der zentralen Analytik des Departments Chemie und Pharmazie der LMU-München mit Hilfe eines *Varian Inova 400*, *Bruker ARX 600* oder *Bruker Avance III HD 800* aufgenommen. Als interner Standard wurden deuterierte Lösungsmittel der Firmen *Eurisotop* und *Sigma-Aldrich* verwendet. Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgt nach dem folgenden Schema: Zuerst wurde die chemische Verschiebung δ in ppm angegeben, darauf folgt die Spinmultiplizität, die Kopplungskonstanten J in Hz und zuletzt das Integral. Die Spinmultiplizitäten der Signale werden durch die folgenden Buchstaben s (Singulett), d (Duplett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett) oder deren Kombinationen angegeben. Die Spektren wurden mit der Software *MestReNova* der Firma *Mestrelab Research* ausgewertet.

Massenspektrometrie (LC-MS, HR-ESI, MALDI)

Niederaufgelöste Massenspektren zur Reaktionskontrolle wurden mit einem *MSQ Plus System* der Firma *Thermo Scientific* aufgenommen. Bei Bedarf und zur Bestimmung von Absorptionsmaxima wurde ein *Ultimate 3000 LC-System* der Firma *Thermo Scientific* direkt an das *MSQ Plus System* gekoppelt.

Hochauflösende massenspektrometrische Untersuchungen mittels Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie (HR-ESI-MS) wurden an einem *FT-ICR-System* der Firma *Thermo Fisher Scientific* durch die zentrale Analytik des Departments Chemie und Pharmazie der LMU-München durchgeführt.

Massenspektrometrische Untersuchungen mittels MALDI-TOF-MS wurden an einem *Autoflex II-System* mit einem *Time-of-Flight* Detektor der Firma *Bruker* durchgeführt. Die Proben wurden vor der Messung auf einer *VSWP Millipore Membran* (0,025 μM) entsalzt und anschließend mit einer HPA-Matrix kokristallisiert.

- HPA-Matrix: Di-Ammoniumhydrogencitrat (10 mg), 3-Hydroxypicolinsäure (50 mg), ddH₂O (500 μL) und MeCN (500 μL)

Infrarotspektrometrie (IR)

Die Infrarotspektren wurden auf einem *Perkin-Elmer BX II FT-IR System* mit einem *Smiths DuraSamplIR II Diamond-ATR Sensor* oder einem *Shimadzu IRSpirit* Spektrometer mit einem *QATR-S Sensor* aufgenommen. Feststoffe wurden direkt auf die ATR-Einheit gegeben und mit einem Stempel auf der ATR-Einheit verdichtet. Öle und flüssige Verbindungen wurden als Filme aufgetragen. Die Wellenzahlen wurden in cm^{-1} angegeben und die Intensität der gemessenen Signale wurde mit s (stark), m (mittel), w (schwach) beschrieben.

6. Oligonukleotid-Konjugat Synthese

Oligonukleotid Synthese

Die Phosphoramidite der kanonischen Nukleoside (Bz-A-CE, Dmf-G-CE, Ac-C-CE, U-CE, dT-CE) wurden von *Sigma-Aldrich* und *LinkTech* und das modifizierte Phosphoramidit C8-Alkyne-dU-CEP von *Baseclick* bezogen. Die Oligonukleotid Synthese erfolgte im 1-2 μmol Maßstab unter Verwendung von *RNA SynBase™ CPG 1000/110* oder *High Load Glen UnySupport™* als Festphase an einem *ABI 394 DNA/RNA Synthesizer* der Firma *Applied Biosystems*. Die Oligonukleotide wurden im DMT-OFF-Modus synthetisiert unter der Verwendung von DCA in DCM als Entschützungsreagenz, *Aktivator 42®* in MeCN als Aktivator, Ac_2O in Pyridin/THF sowie *N*-Methylimidazol in MeCN als Capping-Reagenzien und I_2 in Pyridin/ H_2O als Oxidationsmittel. Für die Entschätzung der Oligonukleotide wurde die Festphase in einer wässrigen Mischung (1/1, 1 mL) aus 30 % NH_4OH und 40 % NH_2Me suspendiert und bei 65 °C erhitzt (5 min für *RNA SynBase™ CPG 1000/110* und 60 min für *High Load Glen UnySupport™*). Anschließend wurde der Überstand transferiert und die Festphase mit Wasser (3 x 200 μL) gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden unter verminderten Druck mittels einer *SpeedVac Plus* von *Thermo Life Sciences* eingengt und durch Lyophilisation getrocknet. Der Rückstand wurde in DMSO (100 μL) gelöst, Triethylamintrihydrofluorid (125 μL) hinzugegeben und bei 65 °C für 1,5 h bei 750 rpm geschüttelt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und das Oligonukleotid durch Zugabe von NaOAc (3 M in dd H_2O , 25 μL) und *n*-Butanol (1 mL) ausgefällt. Das Oligonukleotid wurde bei -80 °C für 2 h gekühlt und anschließend bei 4 °C für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC und Charakterisierung durch MALDI-TOF-MS wurde die Absorption der synthetisierten Oligonukleotide in wässriger Lösung mit einem *IMPLEN Nanophotometer® N60* bei 260 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient der Oligonukleotide wurde mit Hilfe des *OligoAnalyzer Version 3.0* von *Integrated DNA Technologies* bestimmt. Für Oligonukleotide, die nicht-kanonische Basen enthalten, wurde angenommen, dass die Extinktionskoeffizienten identisch zu den kanonischen Basen sind.

Allgemeine Click-Reaktionsvorschriften

Click-Reaktionsvorschrift für Monomere

Zu einem Alkin-modifizierten Oligonukleotid (4,0 mM in ddH₂O, 5,0 µL, 1,0 Äq.) wurden Azid-modifiziertes Peptid (20 mM in DMSO, 5,0 µL, 5,0 Äq.), Triethylammoniumacetat Puffer (1,0 M in ddH₂O, pH 7, 20 µL), Aminoguanidin Hydrochlorid (50 mM in ddH₂O, 4,0 µL), CuSO₄ (50 mM in 100 mM THPTA-Lösung in ddH₂O, 5,0 µL) und Natriumascorbat (50 mM in ddH₂O, 10 µL) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit Argon entgast und bei RT für 30 min bei 500 rpm geschüttelt. Die Reaktion wurde mittels MALDI-TOF-MS überwacht und durch Zugabe von EDTA (50 mM in ddH₂O, 20 µL) gequencht. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC und das finale Produkt wurde mittels analytischer Umkehrphasen-HPLC und MALDI-TOF-MS analysiert.

Click-Reaktionsvorschrift für Dimere

In einem *Cryogenic Vial* wurden zu einem Alkin-modifizierten Oligonukleotid (4,0 mM in ddH₂O, 15 µL, 1,0 Äq.) L3-Linker-Lösung (50 mM in DMSO, 3,0 µL, 2,5 Äq.), CuSO₄ (50 mM in 100 mM THPTA-Lösung in ddH₂O, 15 µL) und Natriumascorbat (50 mM in ddH₂O, 30 µL) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit Argon entgast und bei RT für 1 h bei 500 rpm geschüttelt. Anschließend wurden ein Gemisch aus zwei Alkin-modifizierten Peptiden (1/1, 20 mM in DMSO, 24 µL, 8,0 Äq.), Triethylammoniumacetat Puffer (1,0 M in ddH₂O, pH 7, 60 µL), Aminoguanidin Hydrochlorid (50 mM in ddH₂O, 12 µL), CuSO₄ (50 mM in 100 mM THPTA-Lösung in ddH₂O, 15 µL) und Natriumascorbat (50 mM in ddH₂O, 30 µL) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit Argon entgast und bei RT für 19 h bei 500 rpm geschüttelt. Die Reaktion wurde mittels MALDI-TOF-MS überwacht und durch Zugabe von EDTA (50 mM in ddH₂O, 60 µL) gequencht. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC und die finalen Produkte wurde mittels analytischer Umkehrphasen-HPLC und MALDI-TOF-MS analysiert.

Click-Reaktionsvorschrift für Trimere

In einem *Cryogenic Vial* wurden zu einem Alkin-modifizierten Oligonukleotid (4,0 mM in ddH₂O, 10 µL, 1,0 Äq.) L4-Linker-Lösung (50 mM in DMSO, 2,0 µL, 2,5 Äq.), CuSO₄ (50 mM in 100 mM THPTA-Lösung in ddH₂O, 10 µL) und Natriumascorbat (50 mM in ddH₂O, 20 µL) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit Argon entgast und bei RT für 1 h bei 500 rpm geschüttelt. Anschließend wurden Alkin-modifiziertes Peptid (20 mM in DMSO, 20 µL, 10 Äq.), Triethylammoniumacetat Puffer (1,0 M in ddH₂O, pH 7, 40 µL), Aminoguanidin Hydrochlorid (50 mM in ddH₂O, 8,0 µL), CuSO₄ (50 mM in 100 mM THPTA-Lösung in ddH₂O, 10 µL) und Natriumascorbat (50 mM in ddH₂O, 20 µL) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit Argon entgast und bei RT für 19 h bei 500 rpm geschüttelt. Die Reaktion wurde mittels MALDI-TOF-MS überwacht und durch Zugabe von EDTA (50 mM in ddH₂O, 40 µL) gequencht. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC und das finale Produkt wurde mittels analytischer Umkehrphasen-HPLC und MALDI-TOF-MS analysiert.

Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide und deren Konjugate

Tabelle 3. Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide **ON1**, **ON2**, **ON3** und **ON4**. A_m: 2'-OMe-A, G_m: 2'-OMe-G, C_m: 2'-OMe-C, U_m: 2'-OMe-U, dT: Thymidin, X: 2'-Desoxy-Oktadiinyl-Uridin.

Strang	Sequenz (5' → 3')	berechnet	gefunden
		[M-H] ⁻	[M-H] ⁻
ON1	CCA UGA _m GAA GUA UGA CA _m A CXdT	6814	6812
ON2	GUU GUC _m AUA CUU CUC _m AUG GdTdT	6609	6608
ON3	GCC AUC _m AAC GAU AAG UG _m A AXdT	6814	6812
ON4	UUC ACU _m UAU CGU UGA _m UGG CdTdT	6609	6607

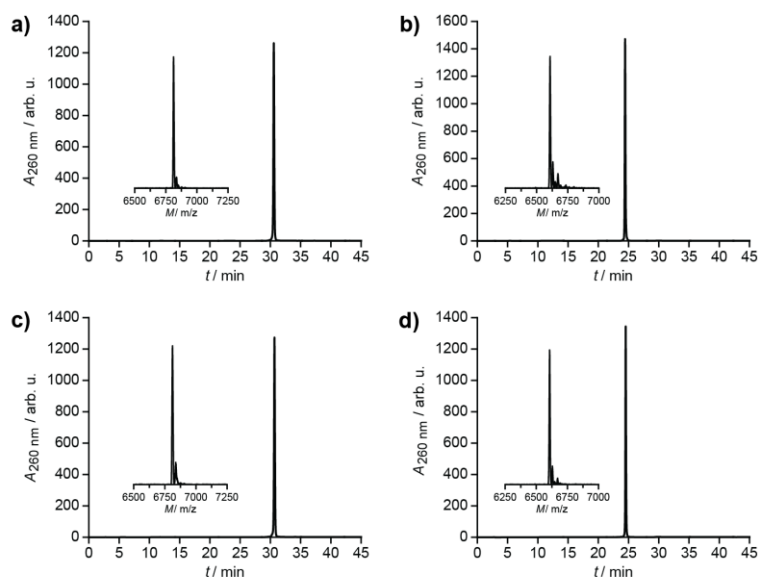


Abbildung 16. HPL-Chromatogramme (0-30% Puffer B, 45 min, 30 °C) und MALDI-TOF-MS-Analysen der aufgereinigten Oligonukleotide (a) ON1, (b) ON2, (c) ON3 und (d) ON4.

Tabelle 4. Charakterisierung der synthetisierten Peptid-Oligonukleotid-Konjugate. Am: 2'-OMe-A, Gm: 2'-OMe-G, Cm: 2'-OMe-C, dT: Thymidin, X: 2'-Desoxy-Oktadiinyl-Uridin.

Strang	Sequenz (5' → 3')	berechnet	gefunden
		[M-H] ⁻	[M-H] ⁻
R-ON1	CCA UGA _m GAA GUA UGA CA _m A CX (R) dT	7900	7897
R-ON3	GCC AUC _m AAC GAU AAG UG _m A AX (R) dT	7900	7898
Y-ON1	CCA UGA _m GAA GUA UGA CA _m A CX (Y) dT	8216	8225
Y-ON3	GCC AUC _m AAC GAU AAG UG _m A AX (Y) dT	8216	8223
2xR-L3-ON1	CCA UGA _m GAA GUA UGA CA _m A CX (R) ₂ dT	9702	9705
2xR-L3-ON3	GCC AUC _m AAC GAU AAG UG _m A AX (R) ₂ dT	9702	9703
2xY-L3-ON1	CCA UGA _m GAA GUA UGA CA _m A CX (Y) ₂ dT	10420	10420
2xY-L3-ON3	GCC AUC _m AAC GAU AAG UG _m A AX (Y) ₂ dT	10420	10419
3xR-L4-ON1	CCA UGA _m GAA GUA UGA CA _m A CX (R) ₃ dT	10939	10937
3xR-L4-ON3	GCC AUC _m AAC GAU AAG UG _m A AX (R) ₃ dT	10939	10939
3xY-L4-ON1	CCA UGA _m GAA GUA UGA CA _m A CX (Y) ₃ dT	12017	12014
3xY-L4-ON3	GCC AUC _m AAC GAU AAG UG _m A AX (Y) ₃ dT	12017	12016
R-Y-L3-ON1	CCA UGA _m GAA GUA UGA CA _m A CX (R) (Y) dT	10061	10065
R-Y-L3-ON3	GCC AUC _m AAC GAU AAG UG _m A AX (R) (Y) dT	10061	10059

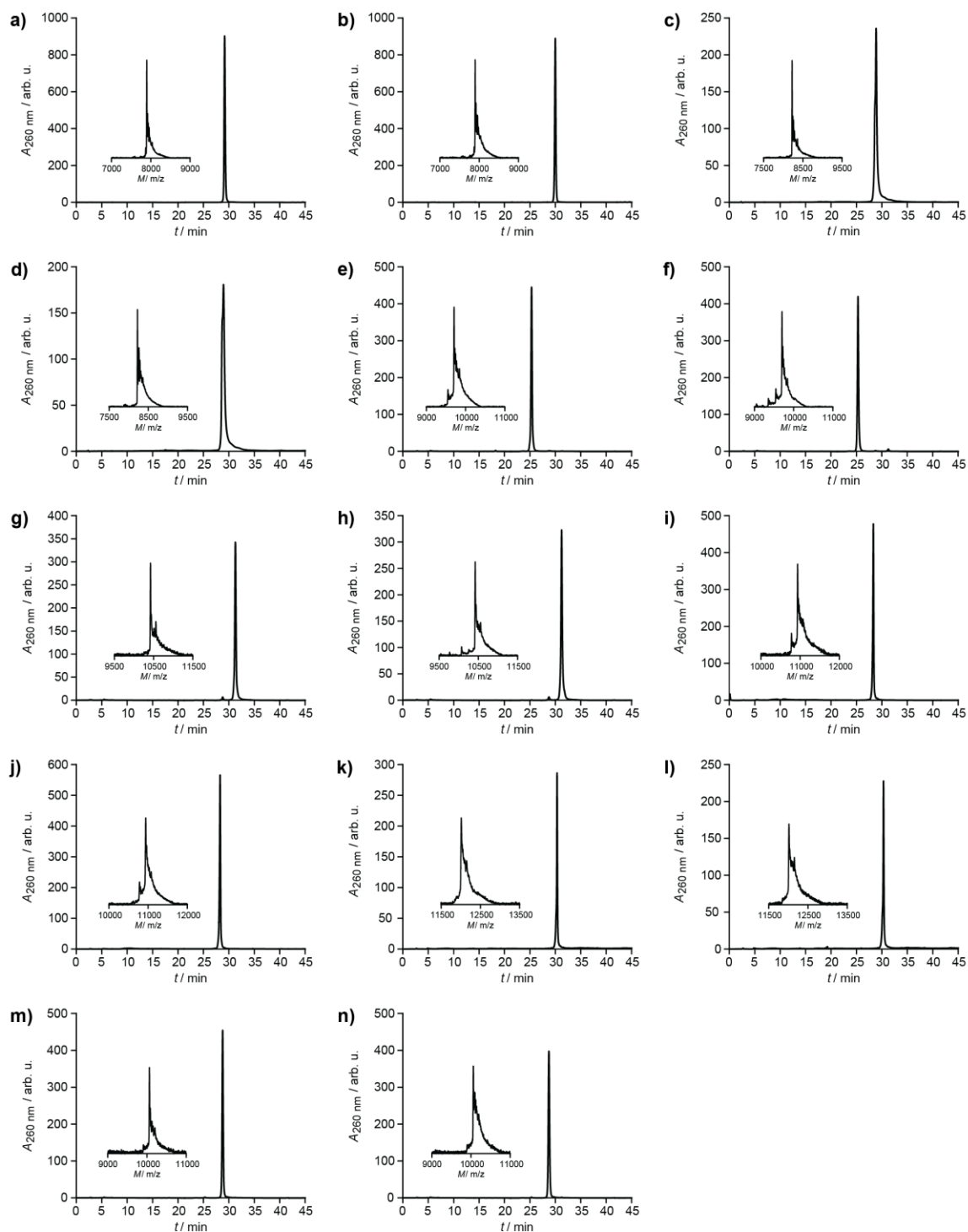


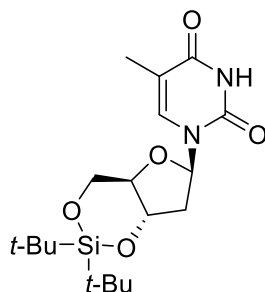
Abbildung 17. HPL-Chromatogramme und MALDI-TOF-MS-Analysen der aufgereinigten Oligonukleotid-Konjugate (a) **R-ON1** (0-30% Puffer B, 45 min, 30 °C), (b) **R-ON3** (0-30% Puffer B, 45 min, 30 °C), (c) **Y-ON1** (0-40% Puffer B, 45 min, 30 °C), (d) **Y-ON3** (0-40% Puffer B, 45 min, 30 °C), (e) **2xR-L3-ON1** (0-50% Puffer B, 45 min, 60 °C), (f) **2xR-L3-ON3** (0-50% Puffer B, 45 min, 60 °C), (g) **2xY-L3-ON1** (0-50% Puffer B, 45 min, 60 °C), (h) **2xY-L3-ON3** (0-50% Puffer B, 45 min, 60 °C), (i) **3xR-L4-ON1** (0-45% Puffer B, 45 min, 60 °C), (j) **3xR-L4-ON3** (0-45% Puffer B, 45 min, 60 °C), (k) **3xY-L4-ON1** (0-55% Puffer B, 45 min, 60 °C), (l) **3xY-L4-ON3** (0-55% Puffer B, 45 min, 60 °C), (m) **R-Y-L3-ON1** (0-50% Puffer B, 45 min, 60 °C) und (n) **R-Y-L3-ON3** (0-50% Puffer B, 45 min, 60 °C).

Hybridisierung

Die Hybridisierung der Doppelstränge erfolgte bei einer Konzentration von 10 μM oder 100 μM in einem 5X Hybridisierungspuffer (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) durch Erhitzen auf 95 °C für 2 min und Abkühlen auf 10 °C innerhalb von 85 min (Gradient -1 °C/min) mit einem *TAdvanced Twin Thermocycler* von *Biometra*.

7. Chemische Synthese

3',5'-O-(Di-*tert*-butylsilanediyl)-thymidin (**3**)



Thymidin (**2**) (9,69 g, 40,0 mmol, 1,00 Äq.) wurde in trockenem DMF (45 mL) gelöst und das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Di-*tert*-butyldichlorosilan (10,1 mL, 48,0 mmol, 1,20 Äq.) wurde für 5 min gerührt und anschließend Silbernitrat (16,3 g, 96,0 mmol, 2,40 Äq.) zugegeben. Triethylamin (13,3 mL, 96,0 mmol, 2,40 Äq.) wurde hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 min bei RT gerührt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach Aufreinigung mittels FSC (Silica, Hex/EtOAc, 2/1 → 1/1) wurde **3** (15,8 g, quant.) als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

$R_f = 0,21$ (*i*Hex/EtOAc, 2/1).

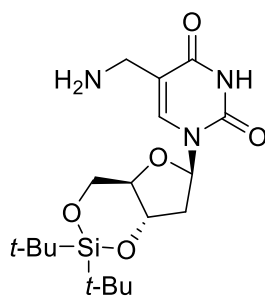
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,64$ (s, 1H); 7,03 (q, $J = 1,3$ Hz, 1H); 6,20 (dd, $J = 6,9, 4,2$ Hz, 1H); 4,44 (dd, $J = 9,4, 5,0$ Hz, 1H); 4,22 (q, $J = 8,9$ Hz, 1H); 4,01 (dd, $J = 10,5, 9,4$ Hz, 1H); 3,68 (ddd, $J = 10,5, 8,9, 5,0$ Hz, 1H); 2,38 – 2,34 (m, 2H); 1,95 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H); 1,08 (s, 9H); 1,01 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): $\delta = 163,5; 150,1; 135,2; 111,7; 83,9; 78,1; 75,0; 67,4; 38,6; 27,6; 27,3; 22,8; 20,2; 12,9$ ppm.

HR-ESI-LC-MS von C ₁₈ H ₃₁ N ₂ O ₅ Si ⁺ [(M+H) ⁺]:	berechnet	383,19968
	gefunden	383,19952.

IR (ATR): $\nu = 415$ (m); 421 (m); 433 (m); 443 (s); 473 (m); 486 (m); 553 (m); 652 (s); 711 (m); 749 (s); 809 (s); 826 (s); 856 (m); 940 (m); 1000 (m); 1013 (m); 1056 (s); 1111 (s); 1140 (m); 1174 (w); 1273 (m); 1321 (w); 1365 (m); 1387 (m); 1472 (m); 1686 (s); 2860 (m); 2889 (w); 2936 (m); 2960 (w); 3049 (w); 3183 (w) cm⁻¹.

5-(Aminomethyl)-3',5'-O-(di-*tert*-butylsilanediyl)-2'-deoxyuridin (**4**)



3 (3,83 g, 10,0 mmol, 1,00 Äq.) wurde in trockenem Chloroform (60 mL) gelöst, auf 60 °C erhitzt und *N*-Bromsuccinimid (2,14 mg, 12,0 mmol, 1,20 Äq.) und AIBN (197 mg, 1,20 mmol, 0,12 Äq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h 15 min bei 60 °C gerührt, anschließend auf 0 °C gekühlt und NH₃ (7 M in MeOH, 7,1 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 2 h bei RT gerührt, mit NaHCO_{3(aq.)} (ges.) verdünnt und mit DCM (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach Aufreinigung mittels FSC (Silica, DCM/MeOH, 98/2 + 1 % NEt₃ → 95/5 + 1 % NEt₃) wurde **4** (450 mg, 1,13 mmol, 11 %) als gelber Feststoff erhalten.

$R_f = 0,14$ (DCM/MeOH, 95/5 + 1 % NEt₃).

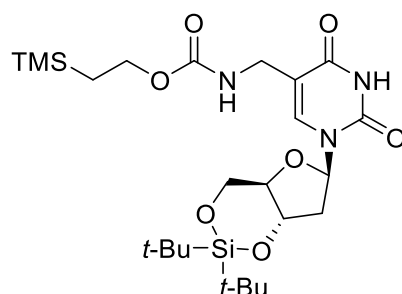
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,29$ (s, 1H); 6,20 (dd, $J = 6,4, 4,6$ Hz, 1H); 4,43 (dd, $J = 9,4, 5,0$ Hz, 1H); 4,24 (q, $J = 9,0$ Hz, 1H); 4,05 – 3,98 (m, 1H); 3,68 (ddd, $J = 10,5, 8,9, 5,0$ Hz, 1H); 3,60 (d, $J = 3,3$ Hz, 2H); 2,40 – 2,34 (m, 2H); 1,07 (s, 9H); 1,00 (s, 9H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): $\delta = 163,1; 150,0; 136,1; 116,1; 84,2; 78,2; 74,9; 67,4; 39,3; 38,6; 27,6; 27,2; 22,8; 20,2$ ppm.

HR-ESI-LC-MS von C ₁₈ H ₃₂ N ₃ O ₅ Si ⁺ [(M+H) ⁺]:	berechnet	398,21057
	gefunden	398,21060.

IR (ATR): $\nu = 410$ (m); 431 (s); 444 (s); 470 (m); 500 (m); 526 (m); 555 (m); 579 (m); 652 (s); 704 (m); 750 (s); 809 (s); 826 (s); 856 (m); 938 (m); 1009 (m); 1052 (s); 1109 (s); 1174 (m); 1279 (m); 1364 (m); 1387 (m); 1472 (s); 1683 (s); 2672 (w); 2860 (m); 2890 (m); 2936 (m); 2960 (m); 3185 (w) cm⁻¹.

5-((((2-(Trimethylsilyl)ethoxy)carbonyl)amino)methyl)-3',5'-O-(di-*tert*-butylsilanediyl)-2'-deoxyuridin (5)



4 (449 mg, 1,13 mmol, 1,00 Äq.) wurde in 1,4-Dioxan/H₂O (1:1, 20,3 mL) gelöst. Nach Zugabe von Triethylamin (235 µL, 1,70 mmol, 1,50 Äq.) und Teoc-OSu (322 mg, 1,24 mmol, 1,10 Äq.) wurde die Suspension für 20 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit H₂O verdünnt und anschließend mit Diethylether (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach Aufreinigung mittels FSC (Silica, Hex/EtOAc, 2/1) wurde **5** (261 mg, 481 µmol, 43 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$R_f = 0,18$ (*i*Hex/EtOAc, 2/1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,14$ (s, 1H); 7,47 (s, 1H); 6,13 (dd, $J = 7,8, 2,7$ Hz, 1H); 5,27 (t, $J = 6,2$ Hz, 1H); 4,44 (dd, $J = 9,4, 5,0$ Hz, 1H); 4,26 (q, $J = 9,3$ Hz, 1H); 4,17 – 4,04 (m, 3H); 4,00 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H); 3,70 (ddd, $J = 10,5, 8,9, 5,0$ Hz, 1H); 2,44 – 2,33 (m, 2H); 1,08 (s, 9H); 1,01 (s, 9H); 0,96 (dd, $J = 9,3, 7,9$ Hz, 2H); 0,03 (s, 9Hz) ppm.

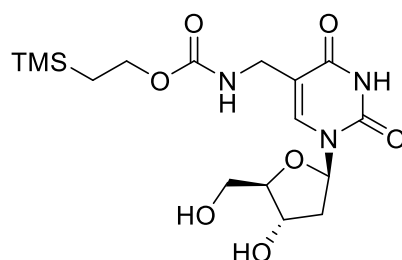
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): $\delta = 163,2; 157,0; 149,8; 138,5; 111,9; 84,6; 78,5; 74,6; 67,4; 63,4; 38,8; 37,7; 27,6; 27,3; 22,8; 20,2; 17,9; -1,3$ ppm.

HR-ESI-LC-MS von C₂₄H₄₂N₃O₇Si₂⁻ [(M-H)⁻]:

berechnet	540,25668
gefunden	540,25663.

IR (ATR): $\nu = 423$ (m); 428 (m); 444 (s); 470 (m); 502 (m); 520 (m); 555 (m); 579 (m); 651 (s); 706 (m); 752 (s); 788 (m); 826 (s); 854 (s); 938 (m); 1003 (m); 1030 (m); 1055 (s); 1068 (s); 1085 (m); 1107 (s); 1176 (m); 1239 (s); 1262 (m); 1276 (m); 1364 (w); 1380 (w); 1474 (m); 1509 (m); 1686 (s); 1703 (s); 1717 (s); 2861 (w); 2893 (w); 2937 (w); 2949 (w); 3061 (w); 3177 (w); 3364 (w) cm⁻¹.

5-((((2-(Trimethylsilyl)ethoxy)carbonyl)amino)methyl)-2'-deoxyuridin (**6**)



In einem Plastikgefäß wurde **6** (255 mg, 470 μmol , 1,00 Äq.) in DCM/Pyridin (9:1, 4,7 mL) gelöst und das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt. Nach langsamer Zugabe von HF ($\omega = 70\%$ in Pyridin, 61 μL , 2,35 mmol, 5,00 Äq.) wurde das Reaktionsgemisch für 3 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Methoxytrimethylsilan gequench, mit $\text{NaHCO}_3(\text{aq.})$ (ges.) verdünnt und mit DCM (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach Aufreinigung mittels FSC (Silica, DCM/MeOH, 95/5) wurde **6** (154 mg, 384 μmol , 82 %) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0,41$ (DCM/MeOH, 9/1).

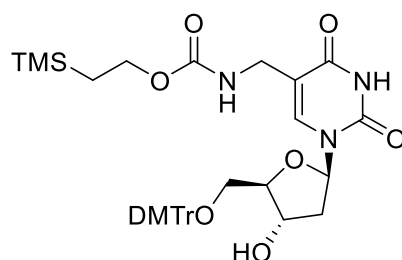
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,11$ (s, 1H); 8,00 (s, 1H); 6,29 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H); 5,33 (s, 1H); 4,67 – 4,63 (m, 1H); 4,13 – 4,06 (m, 3H); 4,00 – 3,94 (m, 3H); 3,84 – 3,77 (m, 1H); 3,63 (s, 1H); 2,46 (ddd, $J = 13,9, 6,4, 2,9$ Hz, 1H); 2,38 (dt, $J = 13,6, 6,5$ Hz, 1H); 0,97 – 0,92 (m, 2H); 0,02 (s, 9H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 163,9; 157,6; 150,6; 140,2; 111,3; 88,1; 86,6; 72,0; 63,6; 62,3; 41,0; 37,6; 17,8; -1,3$ ppm.

HR-ESI-LC-MS von $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7\text{ClSi}^-$ [(M+Cl) $^-$]:	berechnet	436,13123
	gefunden	436,13102.

IR (ATR): $\nu = 408$ (s); 424 (s); 435 (s); 441 (s); 450 (m); 454 (m); 466 (m); 473 (m); 479 (m); 486 (m); 517 (s); 660 (m); 694 (m); 762 (s); 834 (s); 856 (s); 941 (m); 963 (m); 997 (m); 1049 (s); 1092 (m); 1177 (m); 1247 (s); 1388 (m); 1405 (m); 1418 (m); 1437 (m); 1459 (m); 1473 (m); 1507 (m); 1522 (m); 1533 (m); 1541 (m); 1656 (s); 1670 (s); 1684 (s); 2824 (w); 2901 (w); 2953 (w); 3057 (w); 3186 (w); 3337 (w) cm^{-1} .

5-((((2-(Trimethylsilyl)ethoxy)carbonyl)amino)methyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxyuridin (**7**)



6 (149 mg, 370 μmol , 1,00 Äq.) wurde in trockenem Pyridin (3,7 mL) gelöst und vorgetrocknetes DMTrCl (188 mg, 555 μmol , 1,50 Äq.) wurde zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 6 h bei RT gerührt und anschließend mit MeOH gequenchet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Nach Aufreinigung mittels FSC (Silica, DCM/MeOH, 98/2 + 0,1 % Pyridin \rightarrow 95/5 + 0,1 % Pyridin) und Lyophilisation aus Benzol (2x) wurde **7** (198 mg, 281 μmol , 76 %) als farbloser Schaum erhalten.

$R_f = 0,24$ (DCM/MeOH, 95/5).

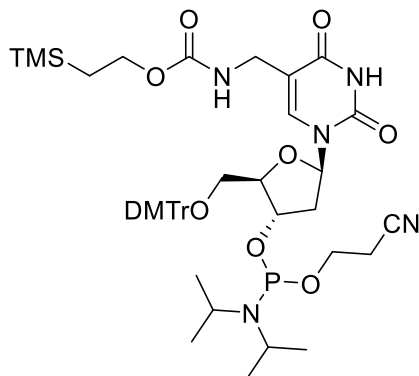
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): $\delta = 10,07$ (br s, 1H); 7,73 (s, 1H); 7,52 – 7,48 (m, 2H); 7,38 (dd, $J = 8,8, 1,4$ Hz, 4H); 7,33 (dd, $J = 8,5, 7,0$ Hz, 2H); 7,25 – 7,21 (m, 1H); 6,93 – 6,88 (m, 4H); 6,30 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H); 6,01 (s, 1H); 4,56 – 4,40 (m, 2H); 4,05 (t, $J = 8,3$ Hz, 3H); 3,79 (s, 6H); 3,69 (d, $J = 6,2$ Hz, 2H); 3,42 – 3,33 (m, 2H); 3,42 – 3,33 (m, 2H); 0,92 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H); 0,02 (s, 9H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): $\delta = 163,7; 159,8; 157,2; 151,1; 146,2; 139,0; 137,0; 136,8; 131,2; 131,1; 129,2; 128,8; 127,7; 114,1; 112,2; 87,4; 87,2; 85,8; 72,3; 64,9; 62,9; 55,6; 41,2; 38,6; 18,5; -1,3$ ppm.

HR-ESI-LC-MS von $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_9\text{NaSi}^+ [(M+\text{Na})^+]$:
 berechnet 726,28173
 gefunden 726,28098.

IR (ATR): $\nu = 417$ (m); 431 (m); 438 (m); 456 (m); 467 (m); 474 (m); 484 (m); 520 (m); 549 (m); 583 (s); 634 (m); 701 (m); 727 (m); 756 (m); 792 (m); 831 (s); 858 (m); 937 (m); 969 (m); 1033 (s); 1056 (m); 1091 (m); 1176 (s); 1247 (s); 1447 (m); 1459 (m); 1466 (m); 1490 (m); 1507 (s); 1608 (m); 1671 (s); 1684 (s); 1696 (s); 2837 (w); 2914 (w); 2953 (w); 3065 (w); 3179 (w); 3377 (w) cm^{-1} .

5-((((2-(Trimethylsilyl)ethoxy)carbonyl)amino)methyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-deoxyuridin-3'-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit (1**)**



7 (106 mg, 150 μmol , 1,00 Äq.) wurde in trockenem DCM (1,5 mL) gelöst und DIPEA (105 μL , 600 μmol , 4,00 Äq.) wurde zugegeben. Anschließend wurde auf 0 °C gekühlt und CED-Cl (84 μL , 375 μmol , 2,50 Äq.) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h bei RT gerührt, anschließend mit NaHCO_3 (aq.) (ges.) verdünnt und mit DCM (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach Aufreinigung mittels FSC (Silica, Hex/EtOAc, 1/1 + 0,1 % Pyridin) und Lyophilisation aus Benzol (2x) wurde **1** (105 mg, 116 μmol , 77 %) als farbloser Schaum erhalten.

$R_f = 0,18$ und $0,32$ (Hex/EtOAc, 1/1).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): $\delta = 148,3, 148,2$ ppm.

HR-ESI-LC-MS von $\text{C}_{46}\text{H}_{62}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{NaPSi}^+$ [(M+Na) $^+$]:	berechnet	926,38958
	gefunden	926,38968.

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin (Nukleosid) / Adenin (Nukleobase)
$A_{260\text{ nm}}$	spektrale Absorption bei $\lambda = 260\text{ nm}$
Ac	Acetyl
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
AGO2	Argonaut-2
AHP	Akute Hepatische Porphyrie
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
anti-miRs	Antagomire
Apo E	Apolipoprotein E
aq	<i>aqueous</i> (in wässriger Lösung)
arb. u.	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
ASCVD	Atherosklerotische Herz-Kreislauf-Erkrankung
ASGPR	Asialoglykoprotein-Rezeptor
ASO	Antisense Oligonukleotid
Äq	Äquivalent(e)
AzMMMan	Azidomethyl-Methylmaleinsäureanhydrid
BCN	Bicyclo[6.1.0]nonin
BNA	<i>Bridged</i> Nukleinsäure
Bz	Benzoyl
C	Cytidin (Nukleosid) / Cytosin (Nukleobase)
CD206	Mannose Rezeptor C-Typ 1
CE	Cyanoethyl
CED	2-Cyanethyl- <i>N,N</i> -diisopropylphosphoramidit
CendR	<i>C-end Rule</i>
cEt	<i>constrained</i> Ethyl
CMV	Cytomegalovirus
CPP	Zellpenetrierendes Peptid
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin Motiv
CPG	<i>controlled-pore-glass</i> (kontrolliertes poröses Glass)
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019
CuAAC	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition

d	Duplett (Signale bei NMR-Spektroskopie)
DBCO	Dibenzoazacyclooctin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCA	Dichloressigsäure
DCM	Dichlormethan
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DIBO	Dibenzocyclooctin
DIFO	Difluorocyclooctin
DMD	Duchenne-Muskeldystrophie
Dmf	Dimethylformamidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESC	<i>Enhanced Stabilization Chemistry</i>
ESI	<i>electrospray ionization</i> (Elektrosprayionisation)
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat
FCS	Familiäres Chylomikronämie Syndrom
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSC	<i>Flash-Säulenchromatographie</i>
G	Guanosin (Nukleosid) / Guanin (Nukleobase)
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ges.	gesättigt
GNA	Glycol Nukleinsäure
hATTR	Hereditäre Transthyretin-Amyloidose
hClp1	<i>human Cleavage factor polyribonucleotide kinase subunit 1</i>
HeFH	Heterozygote Familiäre Hypercholesterinämie
Hex	Hexan

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HR	<i>high resolution</i> (Hochauflösung)
invAb	invertierte abasische Modifikation
IPA	Isopropanol
IR	Infrarotspektroskopie
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigkeitschromatographie)
LDL	<i>low-density</i> Lipoprotein
LNA	<i>Locked</i> Nukleinsäuren
LNP	Lipid-basierte Nanopartikel
M	Molekül
m	medium (Signale bei IR-Spektroskopie)
m	Multiplett (Signale bei NMR-Spektroskopie)
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
miRNA	MicroRNA
miR-Mimic	Agomire
MOE	Methoxyethyl
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
NRP1	Neuropilin-1
OMe	Methoxy
ON	Oligonukleotid
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PEG	Polyethylenglycol
PH	Primäre Hyperoxalurie
PMO	Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligonukleotid
PO	Phosphat

ppm	<i>parts per million</i>
PS	Phosphorothioat
PS2	Phosphorodithioat
Py	Pyridin
q	Quartett (Signale bei NMR-Spektroskopie)
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
quant.	quantitativ
R_f	Retentionsfaktor (Dünnschichtchromatographie)
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RITA	RNA-induzierten Transkriptionsaktivierungskomplex
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAa	RNA-Aktivierung
RNAi	RNA-Interferenz
RNase H1	Ribonuklease H1
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	stark (Signale bei IR-Spektroskopie)
s	Singulett (Signale bei NMR-Spektroskopie)
sa-mRNA	Selbst-amplifizierende mRNA
saRNA	<i>small-activating RNA</i>
SARS-CoV-2	Schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus Typ 2
SATE	<i>S-Acyl-2-thioethyl</i>
scr	<i>scrambled</i>
siRNN	<i>short interfering RiboNucleic Neutrals</i>
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMN2	<i>Survival-Motorneuron 2</i>
SNA	Sphärische Nukleinsäure
SPAAC	<i>Strain-Promoted Azid-Alkin Cycloaddition</i>
SpiDo	Spirodiorthoester
SSO	<i>Splice-switching Oligonukleotide</i>
STC	<i>Standard Template Chemistry</i>

(d)T	(Desoxy) Thymidin (Nukleosid) / Thymin (Nukleobase)
t	Triplett (Signale bei NMR-Spektroskopie)
tcDNA	tricyclo-DNA
Teoc	2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl
TfR	Transferrin Rezeptor
THF	Tetrahydrofuran
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TOF	<i>Time-of-Flight</i>
U	Uridin (Nukleosid) / Uracil (Nukleobase)
UNA	<i>Unlocked</i> Nukleinsäure
UV	Ultraviolett
VP	Vinylphosphat
w	<i>weak</i> (schwach) (Signale bei IR-Spektroskopie)

9. Literaturverzeichnis

- [1] L. Moumné, A. C. Marie, N. Crouvezier, *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 260.
- [2] E. S. Lander, *Nature* **2011**, *470*, 187-197.
- [3] I. Ezkurdia, D. Juan, J. M. Rodriguez, A. Frankish, M. Diekhans, J. Harrow, J. Vazquez, A. Valencia, M. L. Tress, *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 5866-5878.
- [4] J. C. Kaczmarek, P. S. Kowalski, D. G. Anderson, *Genome Med.* **2017**, *9*, 60.
- [5] A. Hopkins, C. Groom, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727-730.
- [6] C. Finan, A. Gaulton, F. A. Kruger, R. T. Lumbers, T. Shah, J. Engmann, L. Galver, R. Kelley, A. Karlsson, R. Santos, J. P. Overington, A. D. Hingorani, J. P. Casas, *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*.
- [7] K. Dhuri, C. Bechtold, E. Quijano, H. Pham, A. Gupta, A. Vikram, R. Bahal, *J. Clin. Med.* **2020**, *9*.
- [8] J. A. Gredell, A. K. Berger, S. P. Walton, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100*, 744-755.
- [9] S. Thakur, A. Sinhari, P. Jain, H. R. Jadhav, *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1006304.
- [10] B. Hu, L. Zhong, Y. Weng, L. Peng, Y. Huang, Y. Zhao, X. J. Liang, *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 101.
- [11] S. Anwar, F. Mir, T. Yokota, *Pharmaceutics* **2023**, *15*.
- [12] C. F. Bennett, E. E. Swayze, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 259-293.
- [13] A. Levin Arthur, *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 57-70.
- [14] S. T. Croke, S. Wang, T. A. Vickers, W. Shen, X. H. Liang, *N. Engl. J. Med.* **2017**, *35*, 230-237.
- [15] S. M. Hammond, A. Aartsma-Rus, S. Alves, S. E. Borgos, R. A. M. Buijsen, R. W. J. Collin, G. Covello, M. A. Denti, L. R. Desviat, L. Echevarria, C. Foged, G. Gaina, A. Garanto, A. T. Goyenvalle, M. Guzowska, I. Holodnuka, D. R. Jones, S. Krause, T. Lehto, M. Montolio, W. Van Roon-Mom, V. Arechavala-Gomez, *EMBO Mol. Med.* **2021**, *13*, e13243.
- [16] R. Kole, A. R. Krainer, S. Altman, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 125-140.
- [17] M. A. Havens, D. M. Duelli, M. L. Hastings, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2013**, *4*, 247-266.
- [18] C. Mitrpant, A. M. Adams, P. L. Meloni, F. Muntoni, S. Fletcher, S. D. Wilton, *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 1418-1426.
- [19] K. Dzierlega, T. Yokota, *Gene Ther.* **2020**, *27*, 407-416.
- [20] J. Bauman, N. Jearawiriyapaisarn, R. Kole, *Oligonucleotides* **2009**, *19*, 1-13.
- [21] N. K. Singh, N. N. Singh, E. J. Androphy, R. N. Singh, *Mol. Cell Biol.* **2006**, *26*, 1333-1346.
- [22] H. Stein, P. Hausen, *Science* **1969**, *166*, 393-395.
- [23] M. Hyjek, M. Figiel, M. Nowotny, *DNA Repair* **2019**, *84*, 102672.
- [24] S. M. Cerritelli, R. J. Crouch, *FEBS J.* **2009**, *276*, 1494-1505.
- [25] H. Wu, W. F. Lima, H. Zhang, A. Fan, H. Sun, S. T. Croke, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17181-17189.
- [26] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, *75*, 280-284.
- [27] C. Wahlestedt, P. Salmi, L. Good, J. Kela, T. Johnsson, T. Hökfelt, C. Broberger, F. Porreca, J. Lai, K. Ren, M. Ossipov, A. Koshkin, N. Jakobsen, J. Skouv, H. Oerum, M. H. Jacobsen, J. Wengel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 5633-5638.
- [28] M. Egli, M. Manoharan, *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, 2529-2573.
- [29] Y. Shi, X. Zhen, Y. Zhang, Y. Li, S. Koo, Q. Saiding, N. Kong, G. Liu, W. Chen, W. Tao, *Chem. Rev.* **2024**, *124*, 929-1033.
- [30] X. H. Liang, H. Sun, J. G. Nichols, S. T. Croke, *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 2075-2092.
- [31] S. J. Keam, *Drugs* **2018**, *78*, 1371-1376.
- [32] J. Paik, S. Duggan, *Drugs* **2019**, *79*, 1349-1354.
- [33] H. A. Blair, *Drugs* **2023**, *83*, 1039-1043.
- [34] A. Fire, *Trends Genet.* **1999**, *15*, 358-363.
- [35] P. A. Sharp, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 485-490.
- [36] S. M. Hammond, A. A. Caudy, G. J. Hannon, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 110-119.
- [37] T. Tuschl, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 239-245.

- [38] N. Agrawal, P. V. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, S. K. Mukherjee, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 657-685.
- [39] D. J. Obbard, K. H. Gordon, A. H. Buck, F. M. Jiggins, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2009**, *364*, 99-115.
- [40] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
- [41] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*.
- [42] N. J. Caplen, S. Parrish, F. Imani, A. Fire, R. A. Morgan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 9742-9747.
- [43] R. L. Setten, J. J. Rossi, S. P. Han, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 421-446.
- [44] Y. Dorsett, T. Tuschl, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 318-329.
- [45] S. M. Elbashir, J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, T. Tuschl, *EMBO J.* **2001**, *20*, 6877-6888.
- [46] D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Koteliansky, D. W. Sah, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 711-719.
- [47] D. S. Schwarz, G. Hutvágner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P. D. Zamore, *Cell* **2003**, *115*, 199-208.
- [48] A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena, *Cell* **2003**, *115*, 209-216.
- [49] J. Liu, M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J.-J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor, G. J. Hannon, *Science* **2004**, *305*, 1437-1441.
- [50] G. Meister, M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, T. Tuschl, *Mol. Cell* **2004**, *15*, 185-197.
- [51] T. Kawamata, Y. Tomari, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 368-376.
- [52] S. M. Hoy, *Drugs* **2018**, *78*, 1625-1631.
- [53] Y. Y. Syed, *Drugs* **2021**, *81*, 841-848.
- [54] L. J. Scott, S. J. Keam, *Drugs* **2021**, *81*, 277-282.
- [55] Y. N. Lamb, *Drugs* **2021**, *81*, 389-395.
- [56] S. J. Keam, *Drugs* **2022**, *82*, 1419-1425.
- [57] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281-297.
- [58] J. Krutzfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, *438*, 685-689.
- [59] Z. Wang, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *676*, 211-223.
- [60] M. P. Czech, *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 1194-1195.
- [61] R. Rupaimoole, F. J. Slack, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 203-222.
- [62] L.-C. Li, S. T. Okino, H. Zhao, D. Pookot, R. F. Place, S. Urakami, H. Enokida, R. Dahiya, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 17337-17342.
- [63] V. Portnoy, S. H. Lin, K. H. Li, A. Burlingame, Z. H. Hu, H. Li, L. C. Li, *Cell Res.* **2016**, *26*, 320-335.
- [64] R. L. Setten, H. L. Lightfoot, N. A. Habib, J. J. Rossi, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2018**, *19*, 611-621.
- [65] D. Sarker, R. Plummer, T. Meyer, M. H. Sodergren, B. Basu, C. E. Chee, K. W. Huang, D. H. Palmer, Y. T. Ma, T. R. J. Evans, D. R. C. Spalding, M. Pai, R. Sharma, D. J. Pinato, J. Spicer, S. Hunter, V. Kwatra, J. P. Nicholls, D. Collin, R. Nutbrown, H. Glenny, S. Fairbairn, V. Reebye, J. Voutilainen, S. Dorman, P. Andrikakou, P. Lloyd, S. Felstead, J. Vasara, R. Habib, C. Wood, P. Saetrom, H. E. Huber, D. C. Blakey, J. J. Rossi, N. Habib, *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 3936-3946.
- [66] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505-510.
- [67] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818-822.
- [68] D. Papukashvili, N. Rcheulishvili, C. Liu, Y. Ji, Y. He, P. G. Wang, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12884.
- [69] K. Bloom, F. van den Berg, P. Arbuthnot, *Gene Ther.* **2021**, *28*, 117-129.
- [70] C. Sheridan, *Nat. Biotechnol.* **2024**, *42*, 4.
- [71] K. Klabenkova, A. Fokina, D. Stetsenko, *Molecules* **2021**, *26*, 5420.
- [72] T. C. Roberts, R. Langer, M. J. A. Wood, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 673-694.
- [73] S. F. Dowdy, *RNA* **2023**, *29*, 396-401.
- [74] A. Judge, I. MacLachlan, *Hum. Gene Ther.* **2008**, *19*, 111-124.

- [75] T. R. Damase, R. Sukhovshin, C. Boada, F. Taraballi, R. I. Pettigrew, J. P. Cooke, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 628137.
- [76] P. Mangla, Q. Vicentini, A. Biscans, *Cells* **2023**, *12*.
- [77] C. M. Perry, J. A. B. Balfour, *Drugs* **1999**, *57*, 375-380.
- [78] P. Hair, F. Cameron, K. McKeage, *Drugs* **2013**, *73*, 487-493.
- [79] Y. Y. Syed, *Drugs* **2016**, *76*, 1699-1704.
- [80] S. M. Hoy, *Drugs* **2017**, *77*, 473-479.
- [81] Y. A. Heo, *Drugs* **2020**, *80*, 329-333.
- [82] S. Dhillon, *Drugs* **2020**, *80*, 1027-1031.
- [83] M. Shirley, *Drugs* **2021**, *81*, 875-879.
- [84] F. Eckstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 4292-4294.
- [85] F. Eckstein, *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *24*, 374-387.
- [86] A. Khvorova, J. K. Watts, *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 238-248.
- [87] C. A. Stein, C. Subasinghe, K. Shinozuka, J. S. Cohen, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3209-3221.
- [88] S. T. Crooke, T. A. Vickers, X. H. Liang, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 5235-5253.
- [89] H. J. Gaus, R. Gupta, A. E. Chappell, M. E. Ostergaard, E. E. Swayze, P. P. Seth, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 1110-1122.
- [90] M. K. Bijsterbosch, M. Manoharan, E. T. Rump, R. L. De Vruueh, R. van Veghel, K. L. Tivel, E. A. Biessen, C. F. Bennett, P. D. Cook, T. J. van Berkel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3290-3296.
- [91] C. M. Miller, A. J. Donner, E. E. Blank, A. W. Egger, B. M. Kellar, M. E. Ostergaard, P. P. Seth, E. N. Harris, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 2782-2794.
- [92] M. Koziolkiewicz, E. Gendaszewska, M. Maszewska, C. A. Stein, W. J. Stec, *Blood* **2001**, *98*, 995-1002.
- [93] M. T. Migawa, W. Shen, W. B. Wan, G. Vasquez, M. E. Oestergaard, A. Low, C. L. De Hoyos, R. Gupta, S. Murray, M. Tanowitz, M. Bell, J. G. Nichols, H. Gaus, X. H. Liang, E. E. Swayze, S. T. Crooke, P. P. Seth, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 5465-5479.
- [94] W. Shen, C. L. De Hoyos, M. T. Migawa, T. A. Vickers, H. Sun, A. Low, T. A. Bell, 3rd, M. Rahdar, S. Mukhopadhyay, C. E. Hart, M. Bell, S. Riney, S. F. Murray, S. Greenlee, R. M. Crooke, X. H. Liang, P. P. Seth, S. T. Crooke, *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 640-650.
- [95] D. A. Braasch, S. Jensen, Y. Liu, K. Kaur, K. Arar, M. A. White, D. R. Corey, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7967-7975.
- [96] A. Khvorova, *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 4-7.
- [97] W. J. Stec, A. Grajkowski, M. Koziolkiewicz, B. Uznanski, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5883-5888.
- [98] M. Guo, D. Yu, R. P. Iyer, S. Agrawal, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2539-2544.
- [99] Y. Nukaga, K. Yamada, T. Ogata, N. Oka, T. Wada, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7913-7922.
- [100] N. Iwamoto, D. C. D. Butler, N. Svrzikapa, S. Mohapatra, I. Zlatev, D. W. Y. Sah, Meena, S. M. Standley, G. Lu, L. H. Apponi, M. Frank-Kamenetsky, J. J. Zhang, C. Vargeese, G. L. Verdine, *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 845-851.
- [101] S. Sakamuri, L. Eltepu, D. Liu, S. Lam, B. R. Meade, B. Liu, G. Dello Iacono, A. Kabakibi, L. Luukkonen, T. Leedom, M. Foster, C. W. Bradshaw, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1304-1308.
- [102] X. Yang, M. Sierant, M. Janicka, L. Peczek, C. Martinez, T. Hassell, N. Li, X. Li, T. Wang, B. Nawrot, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1214-1220.
- [103] S. Schöllkopf, S. Rathjen, M. Graglia, N. Was, E. Morrison, A. Weingärtner, L. Bethge, J. Hauptmann, M. Wikström Lindholm, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2024**, *35*, 102336.
- [104] S. Y. Wu, X. Yang, K. M. Gharpure, H. Hatakeyama, M. Egli, M. H. McGuire, A. S. Nagaraja, T. M. Miyake, R. Rupaimoole, C. V. Pecot, M. Taylor, S. Pradeep, M. Sierant, C. Rodriguez-Aguayo, H. J. Choi, R. A. Previs, G. N. Armaiz-Pena, L. Huang, C. Martinez, T. Hassell, C. Ivan, V. Sehgal, R. Singhanian, H. D. Han, C. Su, J. H. Kim, H. J. Dalton, C. Kovvali, K. Keyomarsi, N. A. McMillan, W. W. Overwijk, J. Liu, J. S. Lee, K. A. Baggerly, G. Lopez-Berestein, P. T. Ram, B. Nawrot, A. K. Sood, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3459.
- [105] M. S. Kupryushkin, D. V. Pysnyi, D. A. Stetsenko, *Acta Naturae* **2014**, *6*, 116-118.

- [106] Y. V. Skvortsova, E. G. Salina, E. A. Burakova, O. S. Bychenko, D. A. Stetsenko, T. L. Azhikina, *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1049.
- [107] M. Tillinger, S. Lake, L. Servais, C. Campbell, X. Xu, A. Hart, J. Haegele, K. Singh, J. Rheinhardt, A. Ghosh, D. Xu, M. Panzara, A. Li-Kwai-Cheung, *Neuromuscul. Disord.* **2023**, *33*, S102.
- [108] N. T. Schirle, I. J. MacRae, *Science* **2012**, *336*, 1037-1040.
- [109] F. V. Rivas, N. H. Tolia, J. J. Song, J. P. Aragon, J. Liu, G. J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 340-349.
- [110] F. Frank, N. Sonenberg, B. Nagar, *Nature* **2010**, *465*, 818-822.
- [111] A. Boland, F. Tritschler, S. Heimstadt, E. Izaurralde, O. Weichenrieder, *EMBO Rep.* **2010**, *11*, 522-527.
- [112] S. Weitzer, J. Martinez, *Nature* **2007**, *447*, 222-226.
- [113] D. M. Kenski, A. J. Cooper, J. J. Li, A. T. Willingham, H. J. Haringsma, T. A. Young, N. A. Kuklin, J. J. Jones, M. T. Cancilla, D. R. McMasters, M. Mathur, A. B. Sachs, W. M. Flanagan, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 660-671.
- [114] R. A. Haraszi, L. Roux, A. H. Coles, A. A. Turanov, J. F. Alterman, D. Echeverria, B. Godinho, N. Aronin, A. Khvorova, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 7581-7592.
- [115] R. Parmar, J. L. Willoughby, J. Liu, D. J. Foster, B. Brigham, C. S. Theile, K. Charisse, A. Akinc, E. Guidry, Y. Pei, W. Strapps, M. Cancilla, M. G. Stanton, K. G. Rajeev, L. Sepp-Lorenzino, M. Manoharan, R. Meyers, M. A. Maier, V. Jadhav, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 985-989.
- [116] E. Elkayam, R. Parmar, C. R. Brown, J. L. Willoughby, C. S. Theile, M. Manoharan, L. Joshua-Tor, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 3528-3536.
- [117] L. L. Cummins, S. R. Owens, L. M. Risen, E. A. Lesnik, S. M. Freier, D. McGee, C. J. Guinasso, P. D. Cook, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 2019-2024.
- [118] M. Manoharan, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 117-130.
- [119] T. P. Prakash, *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 1616-1641.
- [120] K. A. Whitehead, J. E. Dahlman, R. S. Langer, D. G. Anderson, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, *2*, 77-96.
- [121] M. Robbins, A. Judge, I. MacLachlan, *Oligonucleotides* **2009**, *19*, 89-102.
- [122] M. Robbins, A. Judge, L. Liang, K. McClintock, E. Yaworski, I. MacLachlan, *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 1663-1669.
- [123] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K.-i. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8735-8738.
- [124] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607-3630.
- [125] R. N. Veedu, J. Wengel, *RNA Biol.* **2009**, *6*, 321-323.
- [126] B. Vester, J. Wengel, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13233-13241.
- [127] P. P. Seth, G. Vasquez, C. A. Allerson, A. Berdeja, H. Gaus, G. A. Kinberger, T. P. Prakash, M. T. Migawa, B. Bhat, E. E. Swayze, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1569-1581.
- [128] D. Renneberg, E. Bouliong, U. Reber, D. Schümperli, C. J. Leumann, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 2751-2757.
- [129] R. Steffens, C. J. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3249-3255.
- [130] U. Christensen, N. Jacobsen, V. K. Rajwanshi, J. Wengel, T. Koch, *Biochem. J.* **2001**, *354*, 481-484.
- [131] D. Renneberg, C. J. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5993-6002.
- [132] N. M. Snead, J. R. Escamilla-Powers, J. J. Rossi, A. P. McCaffrey, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2013**, *2*.
- [133] M. M. Janas, M. K. Schlegel, C. E. Harbison, V. O. Yilmaz, Y. Jiang, R. Parmar, I. Zlatev, A. Castoreno, H. Xu, S. Shulga-Morskaya, K. G. Rajeev, M. Manoharan, N. D. Keirstead, M. A. Maier, V. Jadhav, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 723.
- [134] J. B. Bramsen, M. M. Pakula, T. B. Hansen, C. Bus, N. Langkjaer, D. Odadzic, R. Smicius, S. L. Wengel, J. Chattopadhyaya, J. W. Engels, P. Herdewijn, J. Wengel, J. Kjems, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 5761-5773.
- [135] H. Kim, S. Kim, D. Lee, D. Lee, J. Yoon, H. Lee, *J. Pharm. Investig.* **2024**, *54*, 415-433.

- [136] J. Summerton, D. Weller, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 187-195.
- [137] J. D. Moulton, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2017**, *68*, 4.30.31-34.30.29.
- [138] P. L. Iversen, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2001**, *3*, 235-238.
- [139] S. T. Crooke, J. L. Witztum, C. F. Bennett, B. F. Baker, *Cell Metab.* **2018**, *27*, 714-739.
- [140] B. R. Meade, K. Gogoi, A. S. Hamil, C. Palm-Apergi, A. van den Berg, J. C. Hagopian, A. D. Springer, A. Eguchi, A. D. Kacsinta, C. F. Dowdy, A. Presente, P. Lonn, M. Kaulich, N. Yoshioka, E. Gros, X. S. Cui, S. F. Dowdy, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1256-1261.
- [141] A. S. Hamil, S. F. Dowdy, *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1364*, 1-9.
- [142] K. Kariko, M. Buckstein, H. Ni, D. Weissman, *Immunity* **2005**, *23*, 165-175.
- [143] W. B. Wan, P. P. Seth, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9645-9667.
- [144] S. Murray, D. Ittig, E. Koller, A. Berdeja, A. Chappell, T. P. Prakash, M. Norrbom, E. E. Swayze, C. J. Leumann, P. P. Seth, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6135-6143.
- [145] G. Hung, X. Xiao, R. Peralta, G. Bhattacharjee, S. Murray, D. Norris, S. Guo, B. P. Monia, *Nucleic Acid Ther.* **2013**, *23*, 369-378.
- [146] S. Kuespert, R. Heydn, S. Peters, E. Wirkert, A. L. Meyer, M. Sieborger, S. Johannesen, L. Aigner, U. Bogdahn, T. H. Bruun, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*.
- [147] S. M. Elbashir, J. Harborth, K. Weber, T. Tuschl, *Methods* **2002**, *26*, 199-213.
- [148] Y. Ding, C. E. Lawrence, in *RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development* (Ed.: K. Appasani), Cambridge University Press, Cambridge, **2005**, pp. 129-138.
- [149] E. A. Bohula, A. J. Salisbury, M. Sohail, M. P. Playford, J. Riedemann, E. M. Southern, V. M. Macaulay, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15991-15997.
- [150] M. Friedrich, A. Aigner, *BioDrugs* **2022**, *36*, 549-571.
- [151] J. T. Marques, B. R. Williams, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1399-1405.
- [152] S. N. Lester, K. Li, *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 1246-1264.
- [153] Y. J. Kim, in *RNA Interference: From Biology to Clinical Applications* (Eds.: W.-P. Min, T. Ichim), Humana Press, Totowa, **2010**, pp. 81-92.
- [154] K. Ui-Tei, Y. Naito, K. Nishi, A. Juni, K. Saigo, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 7100-7109.
- [155] H. Tafer, in *RNA Sequence, Structure, and Function: Computational and Bioinformatic Methods* (Eds.: J. Gorodkin, W. L. Ruzzo), Humana Press, Totowa, **2014**, pp. 477-490.
- [156] F. Safari, S. Rahmani Barouji, A. M. Tamaddon, *Adv. Pharm. Bull.* **2017**, *7*, 603-609.
- [157] A. Reynolds, D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall, A. Khvorova, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 326-330.
- [158] B. Jagla, N. Aulner, P. D. Kelly, D. Song, A. Volchuk, A. Zatorski, D. Shum, T. Mayer, D. A. De Angelis, O. Ouerfelli, U. Rutishauser, J. E. Rothman, *RNA* **2005**, *11*, 864-872.
- [159] A. Birmingham, E. Anderson, K. Sullivan, A. Reynolds, Q. Boese, D. Leake, J. Karpilow, A. Khvorova, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2068-2078.
- [160] M. Amarzguioui, H. Prydz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *316*, 1050-1058.
- [161] E. Fakhr, F. Zare, L. Teimoori-Toolabi, *Cancer Gene Ther.* **2016**, *23*, 73-82.
- [162] C. R. Allerson, N. Sioufi, R. Jarres, T. P. Prakash, N. Naik, A. Berdeja, L. Wanders, R. H. Griffey, E. E. Swayze, B. Bhat, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 901-904.
- [163] M. R. Hassler, A. A. Turanov, J. F. Alterman, R. A. Haraszti, A. H. Coles, M. F. Osborn, D. Echeverria, M. Nikan, W. E. Salomon, L. Roux, B. Godinho, S. M. Davis, D. V. Morrissey, P. D. Zamore, S. A. Karumanchi, M. J. Moore, N. Aronin, A. Khvorova, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 2185-2196.
- [164] J. Maraganore, *Nat. Biotechnol.* **2022**, *40*, 641-650.
- [165] K. Garber, *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 1213-1214.
- [166] M. M. Janas, I. Zlatev, J. Liu, Y. Jiang, S. A. Barros, J. E. Sutherland, W. P. Davis, J. Liu, C. R. Brown, X. Liu, M. K. Schlegel, L. Blair, X. Zhang, B. Das, C. Tran, K. Aluri, J. Li, S. Agarwal, R. Indrakanti, K. Charisse, J. Nair, S. Matsuda, K. G. Rajeev, T. Zimmermann, L. Sepp-Lorenzino, Y. Xu, A. Akinc, K. Fitzgerald, A. K. Vaishnav, P. F. Smith, M. Manoharan, V. Jadhav, J. T. Wu, M. A. Maier, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 3306-3320.
- [167] J. K. Nair, H. Attarwala, A. Sehgal, Q. Wang, K. Aluri, X. Zhang, M. Gao, J. Liu, R. Indrakanti, S. Schofield, P. Kretschmer, C. R. Brown, S. Gupta, J. L. S. Willoughby, J. A. Boshar, V. Jadhav, K.

- Charisse, T. Zimmermann, K. Fitzgerald, M. Manoharan, K. G. Rajeev, A. Akinc, R. Hutabarat, M. A. Maier, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 10969-10977.
- [168] D. J. Foster, C. R. Brown, S. Shaikh, C. Trapp, M. K. Schlegel, K. Qian, A. Sehgal, K. G. Rajeev, V. Jadhav, M. Manoharan, S. Kuchimanchi, M. A. Maier, S. Milstein, *Mol. Ther.* **2018**, *26*, 708-717.
- [169] A. M. Turner, J. Stolk, R. Bals, J. D. Lickliter, J. Hamilton, D. R. Christianson, B. D. Given, J. G. Burdon, R. Loomba, J. K. Stoller, J. H. Teckman, *J. Hepatol.* **2018**, *69*, 378-384.
- [170] B. D. Brown, H. T. Dudek (Dicerna Pharmaceuticals, Inc.), EP3077511A1, **2019**.
- [171] C. Frauendorf, M. Cameron (Silence Therapeutics GmbH), WO2017174657A1, **2019**.
- [172] R. S. Geary, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, *5*, 381-391.
- [173] M. M. Zhang, R. Bahal, T. P. Rasmussen, J. E. Manautou, X. B. Zhong, *Biochem. Pharmacol.* **2021**, *189*, 114432.
- [174] S. F. Dowdy, *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 222-229.
- [175] S. E. Andaloussi, T. Lehto, I. Mager, K. Rosenthal-Aizman, Oprea, II, O. E. Simonson, H. Sork, K. Ezzat, D. M. Copolovici, K. Kurrikoff, J. R. Viola, E. M. Zaghoul, R. Sillard, H. J. Johansson, F. Said Hassane, P. Guterstam, J. Suhorutsenko, P. M. Moreno, N. Oskolkov, J. Halldin, U. Tedebark, A. Metspalu, B. Lebleu, J. Lehtio, C. I. Smith, U. Langel, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 3972-3987.
- [176] J. Chen, A. Ellert-Miklaszewska, S. Garofalo, A. K. Dey, J. Tang, Y. Jiang, F. Clement, P. N. Marche, X. Liu, B. Kaminska, A. Santoni, C. Limatola, J. J. Rossi, J. Zhou, L. Peng, *Nat. Protoc.* **2021**, *16*, 327-351.
- [177] Y. Zhang, Q. Liu, X. Zhang, H. Huang, S. Tang, Y. Chai, Z. Xu, M. Li, X. Chen, J. Liu, C. Yang, *J. Nanobiotechnol.* **2022**, *20*, 279.
- [178] H. H. Fakhri, A. Katolik, E. Malek-Adamian, J. J. Fakhoury, S. Kaviani, M. J. Damha, H. F. Sleiman, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 2993-3003.
- [179] J. Yang, Q. Jiang, L. He, P. Zhan, Q. Liu, S. Liu, M. Fu, J. Liu, C. Li, B. Ding, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 23693-23699.
- [180] X. Zhang, V. Goel, G. J. Robbie, *J. Clin. Pharmacol.* **2020**, *60*, 573-585.
- [181] X. Xu, T. Xia, *ACS nanosci. Au* **2023**, *3*, 192-203.
- [182] S. J. Tsai, N. A. Atai, M. Cacciottolo, J. Nice, A. Salehi, C. Guo, A. Sedgwick, S. Kanagavelu, S. J. Gould, *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 101266.
- [183] R. Munagala, F. Aqil, J. Jeyabalan, R. Kandimalla, M. Wallen, N. Tyagi, S. Wilcher, J. Yan, D. J. Schultz, W. Spencer, R. C. Gupta, *Cancer Lett.* **2021**, *505*, 58-72.
- [184] Y. L. Boersma, A. Plückthun, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 849-857.
- [185] W. Cao, R. Li, X. Pei, M. Chai, L. Sun, Y. Huang, J. Wang, S. Barth, F. Yu, H. He, *Med. Drug Discovery* **2022**, *15*, 100128.
- [186] T. Sela, M. Mansø, M. Siegel, C. Marban-Doran, A. Ducret, J. Niewöhner, J. Ravn, R. E. Martin, A. Sommer, S. Lohmann, B.-F. Krippendorff, M. Ladefoged, A. Indlekofer, T. Quaiser, F. Bueddefeld, E. Koller, M. Y. Mohamed, T. Oelschlaegel, K. V. Gothelf, K. Hofer, F. F. Schumacher, *Bioconjugate Chem.* **2023**, *34*, 2096-2111.
- [187] T. Sugo, M. Terada, T. Oikawa, K. Miyata, S. Nishimura, E. Kenjo, M. Ogasawara-Shimizu, Y. Makita, S. Imaichi, S. Murata, K. Otake, K. Kikuchi, M. Teratani, Y. Masuda, T. Kamei, S. Takagahara, S. Ikeda, T. Ohtaki, H. Matsumoto, *J. Control. Release* **2016**, *237*, 1-13.
- [188] S. J. Barker, M. B. Thayer, C. Kim, D. Tatarakis, M. J. Simon, R. Dial, L. Nilewski, R. C. Wells, Y. Zhou, M. Afetian, P. Akkapeddi, A. Chappell, K. S. Chew, J. Chow, A. Clemens, C. B. Discenza, J. C. Dugas, C. Dwyer, T. Earr, C. Ha, Y. S. Ho, D. Huynh, E. I. Lozano, S. Jayaraman, W. Kwan, C. Mahon, M. Pizzo, Y. Robles-Colmenares, E. Roche, L. Sanders, A. Stergioulis, R. Tong, H. Tran, Y. Zuchero, A. A. Estrada, K. Gadkar, C. M. M. Koth, P. E. Sanchez, R. G. Thorne, R. J. Watts, T. Sandmann, L. A. Kane, F. Rigo, M. S. Dennis, J. W. Lewcock, S. L. DeVos, *Sci. Transl. Med.*, *16*, eadi2245.
- [189] A. F. Klein, M. A. Varela, L. Arandel, A. Holland, N. Naouar, A. Arzumanov, D. Seoane, L. Revillod, G. Bassez, A. Ferry, D. Jauvin, G. Gourdon, J. Puymirat, M. J. Gait, D. Furling, M. J. A. Wood, *J. Clin. Invest.* **2019**, *129*, 4739-4744.

- [190] C. Betts, A. F. Saleh, A. A. Arzumanov, S. M. Hammond, C. Godfrey, T. Coursindel, M. J. Gait, M. J. A. Wood, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2012**, *1*, e38.
- [191] J. J. Turner, A. A. Arzumanov, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 27-42.
- [192] P. Järver, T. Coursindel, S. E. Andaloussi, C. Godfrey, M. J. Wood, M. J. Gait, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2012**, *1*, e27.
- [193] C. L. Waite, C. M. Roth, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1908-1916.
- [194] G. Cesarone, O. P. Edupuganti, C.-P. Chen, E. Wickstrom, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1831-1840.
- [195] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Röhl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan, H.-P. Vornlocher, *Nature* **2004**, *432*, 173-178.
- [196] C. Wolfrum, S. Shi, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, T. Nakayama, K. Charrise, E. M. Ndungo, T. Zimmermann, V. Koteliansky, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1149-1157.
- [197] A. Biscans, A. Coles, R. Haraszti, D. Echeverria, M. Hassler, M. Osborn, A. Khvorova, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 1082-1096.
- [198] A. Akinc, A. Zumbuehl, M. Goldberg, E. S. Leshchiner, V. Busini, N. Hossain, S. A. Bacallado, D. N. Nguyen, J. Fuller, R. Alvarez, A. Borodovsky, T. Borland, R. Constien, A. de Fougères, J. R. Dorkin, K. Narayanannair Jayaprakash, M. Jayaraman, M. John, V. Koteliansky, M. Manoharan, L. Nechev, J. Qin, T. Racie, D. Raitcheva, K. G. Rajeev, D. W. Y. Sah, J. Soutschek, I. Toudjarska, H.-P. Vornlocher, T. S. Zimmermann, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 561-569.
- [199] J. Willibald, J. Harder, K. Sparrer, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12330-12333.
- [200] O. Khorev, D. Stokmaier, O. Schwardt, B. Cutting, B. Ernst, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5216-5231.
- [201] K. Uehara, T. Harumoto, A. Makino, Y. Koda, J. Iwano, Y. Suzuki, M. Tanigawa, H. Iwai, K. Asano, K. Kurihara, A. Hamaguchi, H. Kodaira, T. Atsumi, Y. Yamada, K. Tomizuka, *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, 4840-4859.
- [202] K. Nishina, T. Unno, Y. Uno, T. Kubodera, T. Kanouchi, H. Mizusawa, T. Yokota, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 734-740.
- [203] P. S. Low, W. A. Henne, D. D. Doorneweerd, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 120-129.
- [204] M. Spiess, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10009-10018.
- [205] Y. C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lönngren, J. Arnarp, M. Haraldsson, H. Lönn, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 199-202.
- [206] P. C. N. Rensen, S. H. van Leeuwen, L. A. J. M. Sliedregt, T. J. C. van Berkel, E. A. L. Biessen, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5798-5808.
- [207] T. P. Prakash, J. Yu, M. T. Migawa, G. A. Kinberger, W. B. Wan, M. E. Østergaard, R. L. Carty, G. Vasquez, A. Low, A. Chappell, K. Schmidt, M. Aghajan, J. Crosby, H. M. Murray, S. L. Booten, J. Hsiao, A. Soriano, T. Machermer, P. Cauntay, S. A. Burel, S. F. Murray, H. Gaus, M. J. Graham, E. E. Swayze, P. P. Seth, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2718-2733.
- [208] A. L. Schwartz, S. E. Fridovich, H. F. Lodish, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4230-4237.
- [209] J. K. Nair, J. L. S. Willoughby, A. Chan, K. Charisse, M. R. Alam, Q. Wang, M. Hoekstra, P. Kandasamy, A. V. Kel'in, S. Milstein, N. Taneja, J. O'Shea, S. Shaikh, L. Zhang, R. J. van der Sluis, M. E. Jung, A. Akinc, R. Hutabarat, S. Kuchimanchi, K. Fitzgerald, T. Zimmermann, T. J. C. van Berkel, M. A. Maier, K. G. Rajeev, M. Manoharan, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16958-16961.
- [210] S. Matsuda, K. Keiser, J. K. Nair, K. Charisse, R. M. Manoharan, P. Kretschmer, C. G. Peng, A. V. Kel'in, P. Kandasamy, J. L. S. Willoughby, A. Liebow, W. Querbes, K. Yucius, T. Nguyen, S. Milstein, M. A. Maier, K. G. Rajeev, M. Manoharan, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1181-1187.

- [211] K. G. Rajeev, J. K. Nair, M. Jayaraman, K. Charisse, N. Taneja, J. O'Shea, J. L. S. Willoughby, K. Yucius, T. Nguyen, S. Shulga-Morskaya, S. Milstein, A. Liebow, W. Querbes, A. Borodovsky, K. Fitzgerald, M. A. Maier, M. Manoharan, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 903-908.
- [212] J. L. S. Willoughby, A. Chan, A. Sehgal, J. S. Butler, J. K. Nair, T. Racie, S. Shulga-Morskaya, T. Nguyen, K. Qian, K. Yucius, K. Charisse, T. J. C. van Berkel, M. Manoharan, K. G. Rajeev, M. A. Maier, V. Jadhav, T. S. Zimmermann, *Mol. Ther.* **2018**, *26*, 105-114.
- [213] W. A. Jefferies, M. R. Brandon, S. V. Hunt, A. F. Williams, K. C. Gatter, D. Y. Mason, *Nature* **1984**, *312*, 162-163.
- [214] K. B. Johnsen, A. Burkhart, L. B. Thomsen, T. L. Andresen, T. Moos, *Prog. Neurobiol.* **2019**, *181*, 101665.
- [215] H. Li, Z. M. Qian, *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 225-250.
- [216] K. Brunner, J. Harder, T. Halbach, J. Willibald, F. Spada, F. Gnerlich, K. Sparrer, A. Beil, L. Möckl, C. Bräuchle, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1946-1949.
- [217] X. Ming, M. R. Alam, M. Fisher, Y. Yan, X. Chen, R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 6567-6576.
- [218] B. Broc, K. Varini, R. Sonnette, B. Pecqueux, F. Benoist, M. Masse, Y. Mechioukhi, G. Ferracci, J. Temsamani, M. Khrestchatisky, G. Jacquot, P. Lécorché, *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 548.
- [219] G. J. Doherty, H. T. McMahon, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 857-902.
- [220] R. L. Juliano, *Nucleic Acid Ther.* **2018**, *28*, 166-177.
- [221] C. C. Scott, F. Vacca, J. Gruenberg, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *31*, 2-10.
- [222] C. He, M. T. Migawa, K. Chen, T. A. Weston, M. Tanowitz, W. Song, P. Guagliardo, K. S. Iyer, C. F. Bennett, L. G. Fong, P. P. Seth, S. G. Young, H. Jiang, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 1-14.
- [223] C. R. Brown, S. Gupta, J. Qin, T. Racie, G. He, S. Lentini, R. Malone, M. Yu, S. Matsuda, S. Shulga-Morskaya, A. V. Nair, C. S. Theile, K. Schmidt, A. Shahraz, V. Goel, R. G. Parmar, I. Zlatev, M. K. Schlegel, J. K. Nair, M. Jayaraman, M. Manoharan, D. Brown, M. A. Maier, V. Jadhav, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 11827-11844.
- [224] R. L. Juliano, *Biomedicines* **2021**, *9*.
- [225] S. F. Dowdy, R. L. Setten, X. S. Cui, S. G. Jadhav, *Nucleic Acid Ther.* **2022**, *32*, 361-368.
- [226] J. R. Casey, S. Grinstein, J. Orłowski, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 50-61.
- [227] A. Klipp, M. Burger, J.-C. Leroux, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2023**, *200*, 115047.
- [228] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *J. Control. Release* **2011**, *151*, 220-228.
- [229] H. Du Rietz, H. Hedlund, S. Wilhelmson, P. Nordenfelt, A. Wittrup, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1809.
- [230] J. P. Bost, M. Ojansivu, M. J. Munson, E. Wesén, A. Gallud, D. Gupta, O. Gustafsson, O. Saher, J. Rädler, S. G. Higgins, T. Lehto, M. N. Holme, A. Dahlén, O. Engkvist, P.-E. Strömstedt, S. Andersson, C. I. Edvard Smith, M. M. Stevens, E. K. Esbjörner, A. Collén, S. El Andaloussi, *Commun. Biol.* **2022**, *5*, 185.
- [231] H. Yu, Y. Zou, Y. Wang, X. Huang, G. Huang, B. D. Sumer, D. A. Boothman, J. Gao, *ACS Nano*. **2011**, *5*, 9246-9255.
- [232] C. Garcia-Chaumont, O. Seksek, B. Jolles, J. Bolard, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, *10*, 177-184.
- [233] A. Ahmad, J. M. Khan, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *76*, 103786.
- [234] G. McClorey, S. Banerjee, *Biomedicines* **2018**, *6*, 51.
- [235] E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010-16017.
- [236] F. A. Rogers, M. Manoharan, P. Rabinovitch, D. C. Ward, P. M. Glazer, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 6595-6604.
- [237] S. A. Moschos, S. W. Jones, M. M. Perry, A. E. Williams, J. S. Erjefalt, J. J. Turner, P. J. Barnes, B. S. Sproat, M. J. Gait, M. A. Lindsay, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1450-1459.
- [238] W. Li, F. Nicol, F. C. Szoka, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 967-985.
- [239] S. Santiwarangkool, H. Akita, I. A. Khalil, M. M. Abd Elwakil, Y. Sato, K. Kusumoto, H. Harashima, *J. Control. Release* **2019**, *307*, 55-63.
- [240] S. Benizri, A. Gissot, A. Martin, B. Vialet, M. W. Grinstaff, P. Barthélémy, *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 366-383.

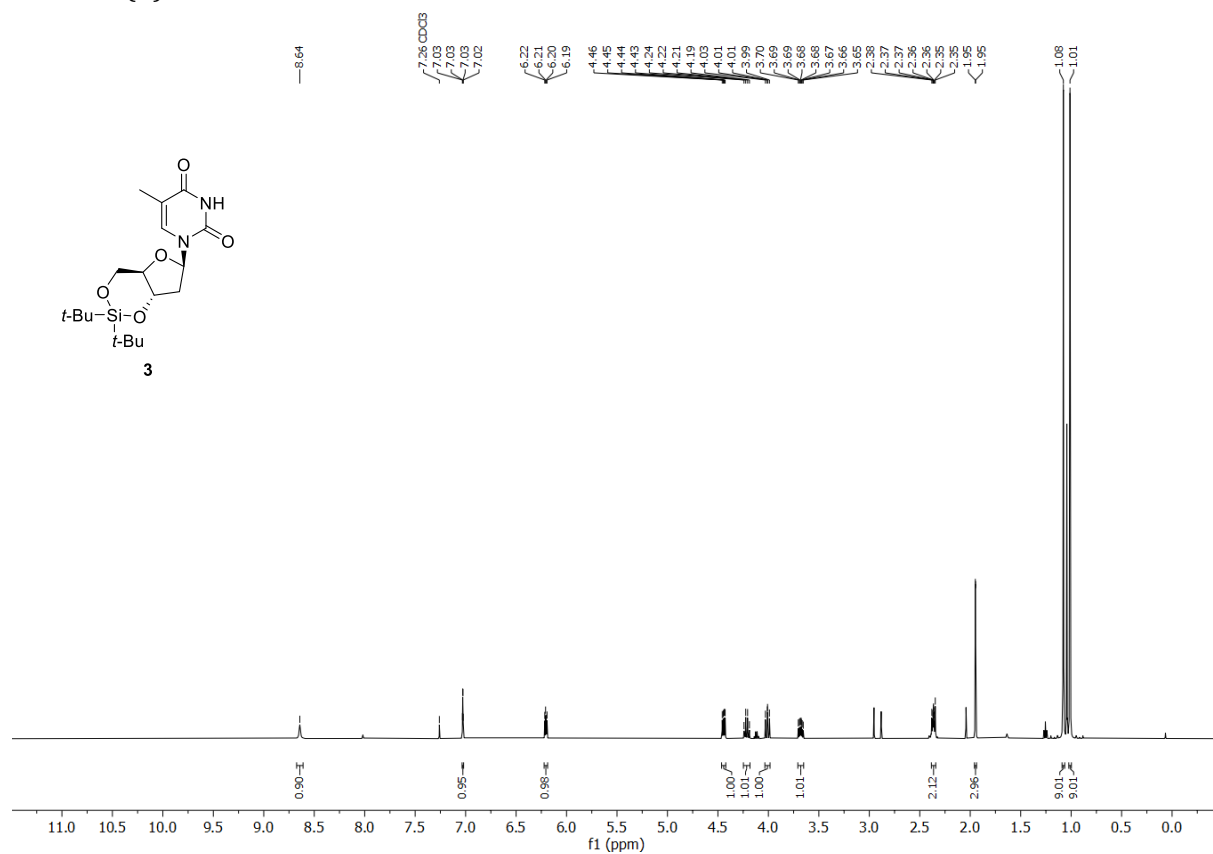
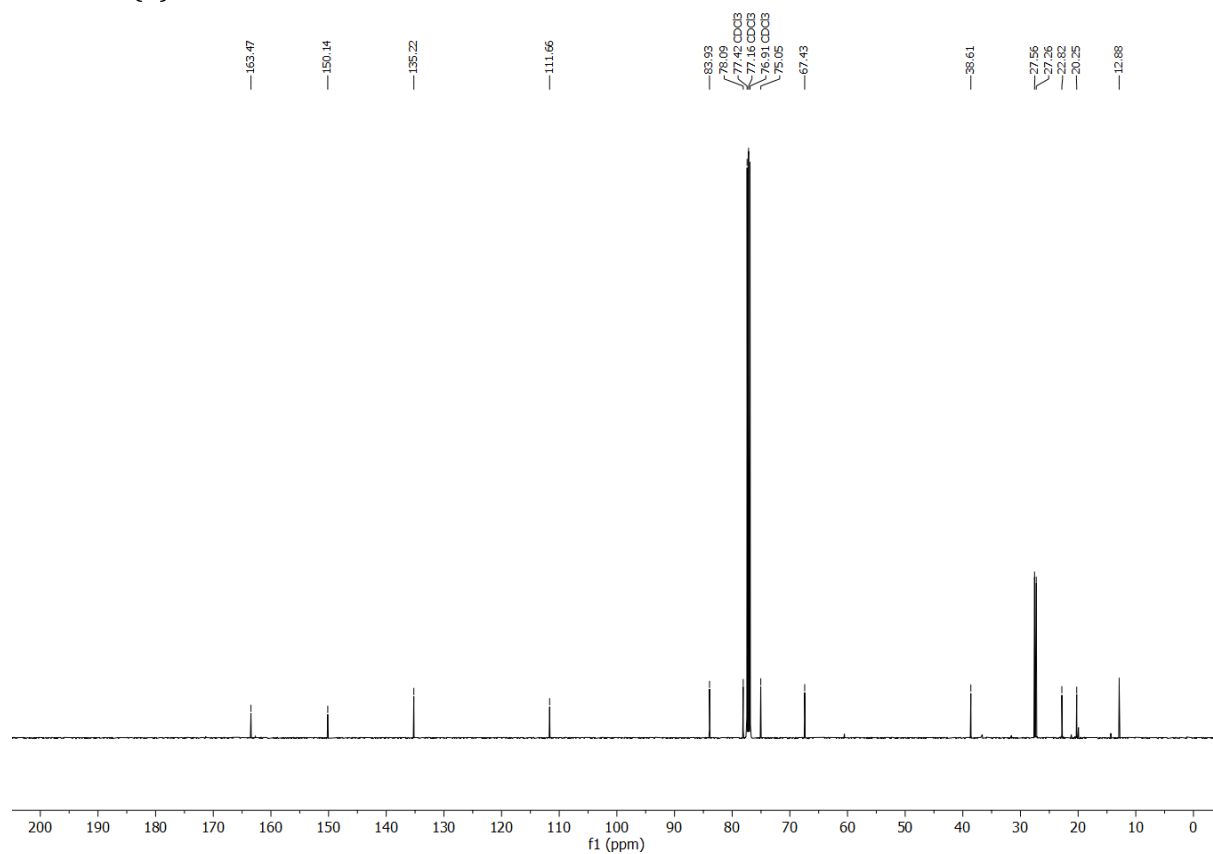
- [241] Y. L. Chiu, T. M. Rana, *RNA* **2003**, *9*, 1034-1048.
- [242] W. Tai, *Molecules* **2019**, *24*, 2211-2235.
- [243] Z. Su, D. Xiao, F. Xie, L. Liu, Y. Wang, S. Fan, X. Zhou, S. Li, *Acta Pharm. Sin. B.* **2021**, *11*, 3889-3907.
- [244] V. Kostova, P. Désos, J. B. Starck, A. Kotschy, *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 442.
- [245] U. Iyer, V. J. Kadambi, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2011**, *64*, 207-212.
- [246] T. P. Prakash, A. E. Mullick, R. G. Lee, J. Yu, S. T. Yeh, A. Low, A. E. Chappell, M. E. Østergaard, S. Murray, H. J. Gaus, E. E. Swayze, P. P. Seth, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 6029-6044.
- [247] C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H.-P. Vornlocher, C. Unverzagt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4975-4977.
- [248] A. Biscans, J. Caiazza, N. McHugh, V. Hariharan, M. Muhuri, A. Khvorova, *Mol. Ther.* **2021**, *29*, 1382-1394.
- [249] G. Li, R. E. Moellering, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1599-1605.
- [250] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [251] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.
- [252] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [253] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [254] N. Z. Fantoni, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 7122-7154.
- [255] L. M. Gaetke, C. K. Chow, *Toxicology* **2003**, *189*, 147-163.
- [256] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272-1279.
- [257] C. R. Becer, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4900-4908.
- [258] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [259] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [260] H. Meier, H. Petersen, H. Kolshorn, *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 2398-2409.
- [261] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [262] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253-2255.
- [263] M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. Rutjes, J. C. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97-99.
- [264] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. Hendriks, F. P. Rutjes, J. C. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422-9425.
- [265] N. Satake, C. Duong, S. Yoshida, M. Oestergaard, C. Chen, R. Peralta, S. Guo, P. P. Seth, Y. Li, L. Beckett, J. Chung, J. Nolte, N. Nitin, J. M. Tuscano, *Mol. Med.* **2016**, *22*, 632-642.
- [266] A. E. Arnold, E. Malek-Adamian, P. U. Le, A. Meng, S. Martínez-Montero, K. Petrecca, M. J. Damha, M. S. Shoichet, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2018**, *11*, 518-527.
- [267] C. Kuo, M. Nikan, S. T. Yeh, A. E. Chappell, M. Tanowitz, P. P. Seth, T. P. Prakash, A. E. Mullick, *Nucleic Acid Ther.* **2022**, *32*, 300-311.
- [268] K. W. Hill, J. Taunton-Rigby, J. D. Carter, E. Kropp, K. Vagle, W. Pieken, D. P. C. McGee, G. M. Husar, M. Leuck, D. J. Anziano, D. P. Sebesta, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5352-5358.
- [269] M. Dastpeyman, R. Sharifi, A. Amin, J. A. Karas, B. Cuic, Y. Pan, J. A. Nicolazzo, B. J. Turner, F. Shabanpoor, *Int. J. Pharm.* **2021**, *599*, 120398.
- [270] Y. Singh, P. Murat, E. Defrancq, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2054-2070.
- [271] G. Saito, J. A. Swanson, K.-D. Lee, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 199-215.
- [272] H. J. Forman, H. Zhang, A. Rinna, *Mol. Asp. Med.* **2009**, *30*, 1-12.
- [273] A. Meister, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 17205-17208.
- [274] L. Hakuna, B. Doughan, J. O. Escobedo, R. M. Strongin, *Analyst* **2015**, *140*, 3339-3342.
- [275] N. A. Patil, *Aust. J. Chem.* **2022**, *75*, 24-33.
- [276] T. L. Cuellar, D. Barnes, C. Nelson, J. Tanguay, S.-F. Yu, X. Wen, S. J. Scales, J. Gesch, D. Davis, A. van Brabant Smith, D. Leake, R. Vandlen, C. W. Siebel, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 1189-1203.
- [277] F. M. Uckun, S. Qazi, I. Dibirdik, D. E. Myers, *Integr. Biol.* **2013**, *5*, 122-132.

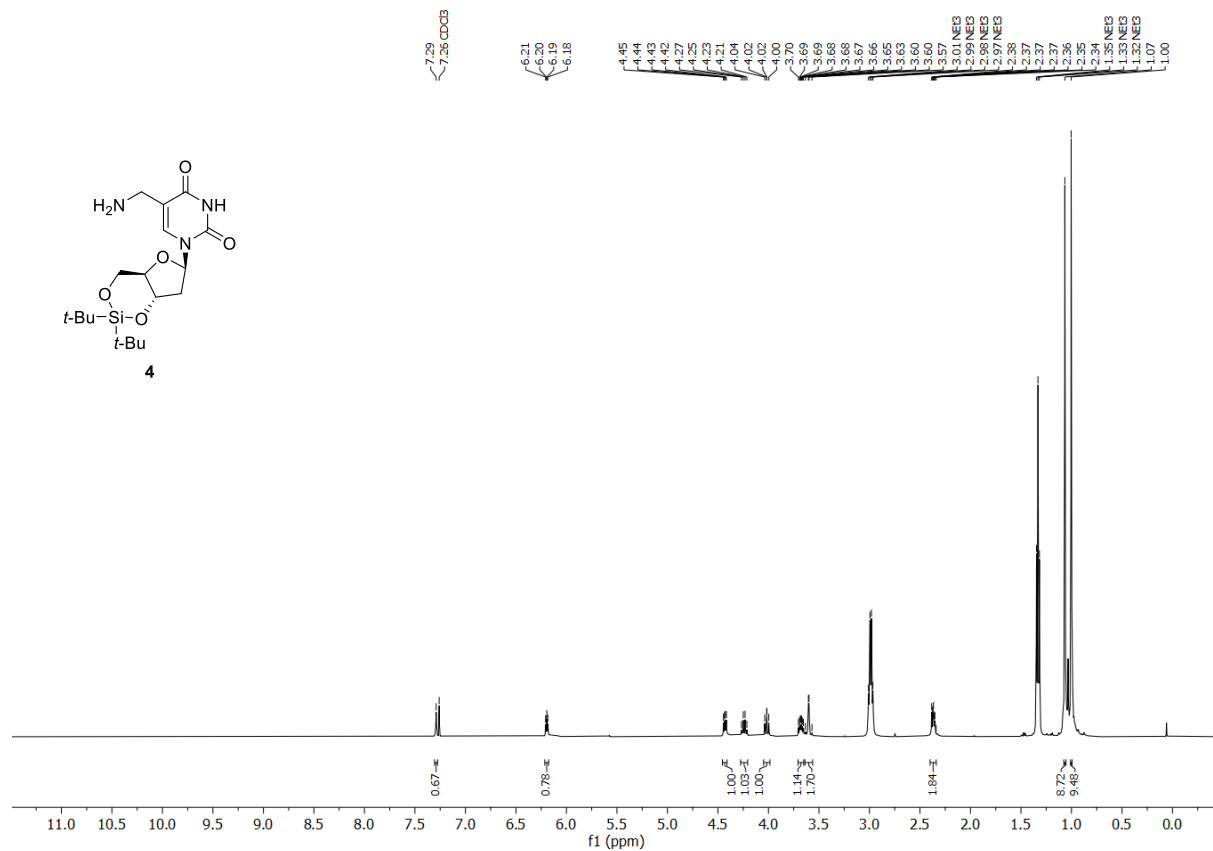
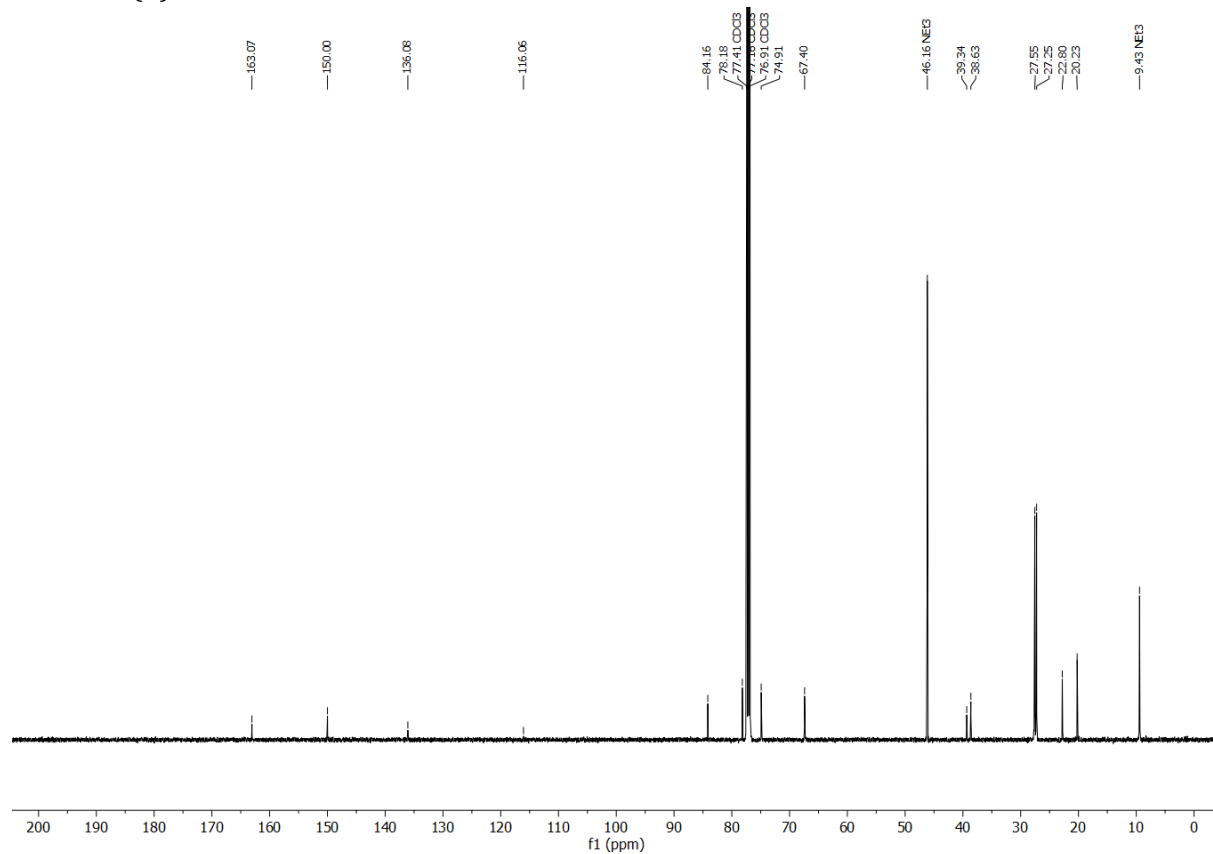
- [278] A. Pontarelli, J. T. Liu, H. Movasat, S. Ménard, J. K. Oh, C. J. Wilds, *Org. Lett.* **2022**, *24*, 5579-5583.
- [279] M. I. Meschaninova, N. S. Entelis, E. L. Chernolovskaya, A. G. Venyaminova, *Molecules* **2021**, *26*, 2119.
- [280] H. B. F. Dixon, R. N. Perham, *Biochem. J.* **1968**, *109*, 312-314.
- [281] P. J. G. Butler, J. I. Harris, B. S. Hartley, R. Leberman, *Biochem. J.* **1969**, *112*, 679-689.
- [282] J. K. Shetty, J. E. Kinsella, *Biochem. J.* **1980**, *191*, 269-272.
- [283] K. Maier, E. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10169-10173.
- [284] P. R. Hamann, L. M. Hinman, I. Hollander, C. F. Beyer, D. Lindh, R. Holcomb, W. Hallett, H.-R. Tsou, J. Upešlacis, D. Shochat, A. Mountain, D. A. Flowers, I. Bernstein, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 47-58.
- [285] S.-J. Moon, S. V. Govindan, T. M. Cardillo, C. A. D'Souza, H. J. Hansen, D. M. Goldenberg, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6916-6926.
- [286] S. V. Govindan, T. M. Cardillo, R. M. Sharkey, F. Tat, D. V. Gold, D. M. Goldenberg, *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 968-978.
- [287] D. V. Santi, L. Cabel, F.-C. Bidard, *Ann. Transl. Med.* **2021**, *9*, 1113.
- [288] Y. Wang, S. Fan, D. Xiao, F. Xie, W. Li, W. Zhong, X. Zhou, *Cancers* **2019**, *11*, 957.
- [289] S. A. Jacques, G. Leriche, M. Mosser, M. Nothisen, C. D. Muller, J.-S. Remy, A. Wagner, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 4794-4803.
- [290] G. Leriche, M. Nothisen, N. Baumlin, C. D. Muller, D. Bagnard, J. S. Remy, S. A. Jacques, A. Wagner, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1461-1465.
- [291] E. Tobaldi, I. Dovgan, M. Mosser, J.-M. Becht, A. Wagner, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 9305-9310.
- [292] L. Cantuti-Castelvetri, R. Ojha, L. D. Pedro, M. Djannatian, J. Franz, S. Kuivanen, F. van der Meer, K. Kallio, T. Kaya, M. Anastasina, T. Smura, L. Levanov, L. Szivoczka, A. Tobi, H. Kallio-Kokko, P. Österlund, M. Joensuu, F. A. Meunier, S. J. Butcher, M. S. Winkler, B. Mollenhauer, A. Helenius, O. Gokce, T. Teesalu, J. Hepojoki, O. Vapalahti, C. Stadelmann, G. Balistreri, M. Simons, *Science* **2020**, *370*, 856-860.
- [293] J. L. Daly, B. Simonetti, K. Klein, K.-E. Chen, M. Kavanagh Williamson, C. Antón-Plágaro, D. K. Shoemark, L. Simón-Gracia, M. Bauer, R. Hollandi, U. F. Greber, P. Horvath, R. B. Sessions, A. Helenius, J. A. Hiscox, T. Teesalu, D. A. Matthews, A. D. Davidson, B. M. Collins, P. J. Cullen, Y. Yamauchi, *Science* **2020**, *370*, 861-865.
- [294] T. Teesalu, K. N. Sugahara, V. R. Kotamraju, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 16157-16162.
- [295] F. Hikmet, L. Mear, A. Edvinsson, P. Micke, M. Uhlen, C. Lindskog, *Mol. Syst. Biol.* **2020**, *16*, e9610.
- [296] M. Ackermann, S. E. Verleden, M. Kuehnel, A. Haverich, T. Welte, F. Laenger, A. Vanstapel, C. Werlein, H. Stark, A. Tzankov, W. W. Li, V. W. Li, S. J. Mentzer, D. Jonigk, *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 120-128.
- [297] T. Hamasaki, H. Suzuki, H. Shirohzu, T. Matsumoto, C. N. D'Alessandro-Gabazza, P. Gil-Bernabe, D. Boveda-Ruiz, M. Naito, T. Kobayashi, M. Toda, T. Mizutani, O. Taguchi, J. Morser, Y. Eguchi, M. Kuroda, T. Ochiya, H. Hayashi, E. C. Gabazza, T. Ohgi, *PLoS One* **2012**, *7*, e42655.
- [298] A. W. Struck, M. Axmann, S. Pfefferle, C. Drosten, B. Meyer, *Antiviral Res.* **2012**, *94*, 288-296.
- [299] H. Jiang, T. Zheng, A. Lopez-Aguilar, L. Feng, F. Kopp, F. L. Marlow, P. Wu, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 698-706.
- [300] C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5852-5856.
- [301] D. Ghez, Y. Lepelletier, S. Lambert, J.-M. Fournau, V. Blot, S. Janvier, B. Arnulf, M. van Endert Peter, N. Heveker, C. Pique, O. Hermine, *J. Virol.* **2006**, *80*, 6844-6854.
- [302] H.-B. Wang, H. Zhang, J.-P. Zhang, Y. Li, B. Zhao, G.-K. Feng, Y. Du, D. Xiong, Q. Zhong, W.-L. Liu, H. Du, M.-Z. Li, W.-L. Huang, S. W. Tsao, L. Hutt-Fletcher, Y.-X. Zeng, E. Kieff, M.-S. Zeng, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6240.

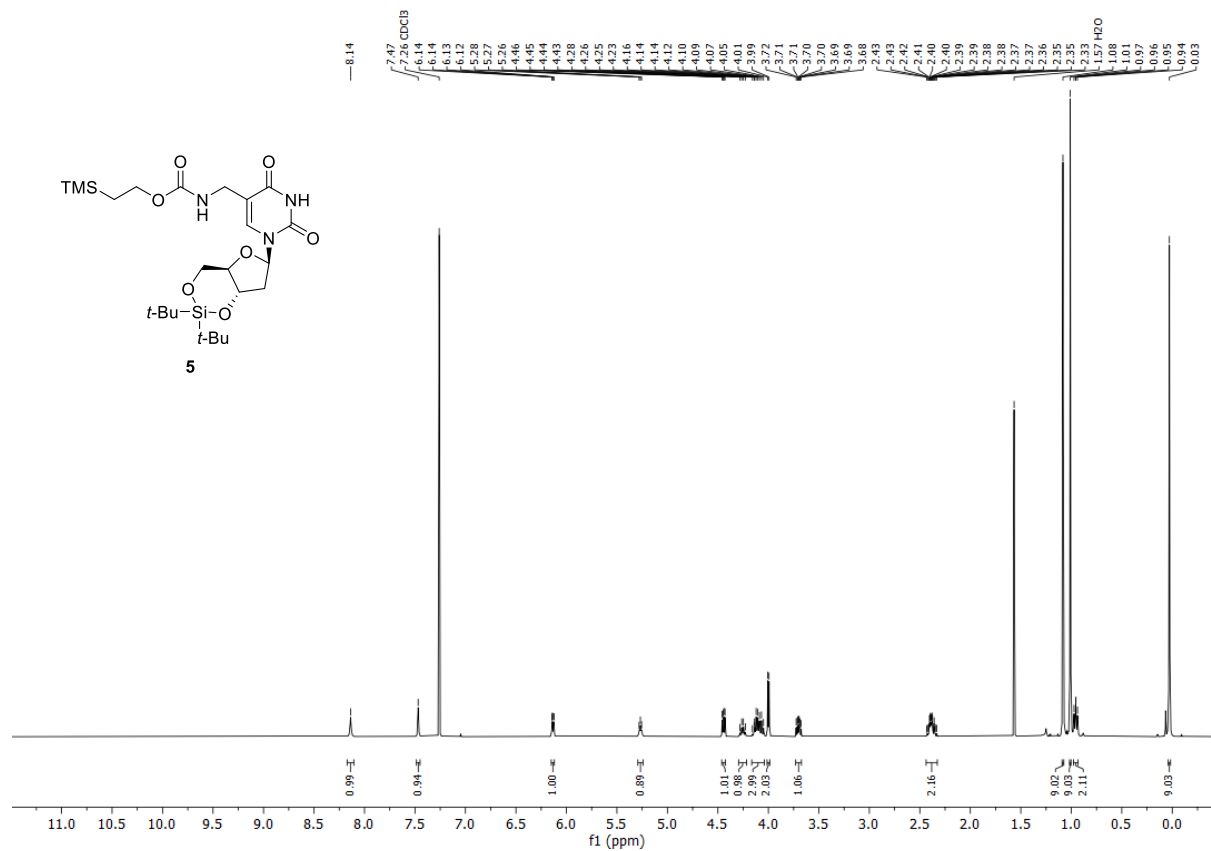
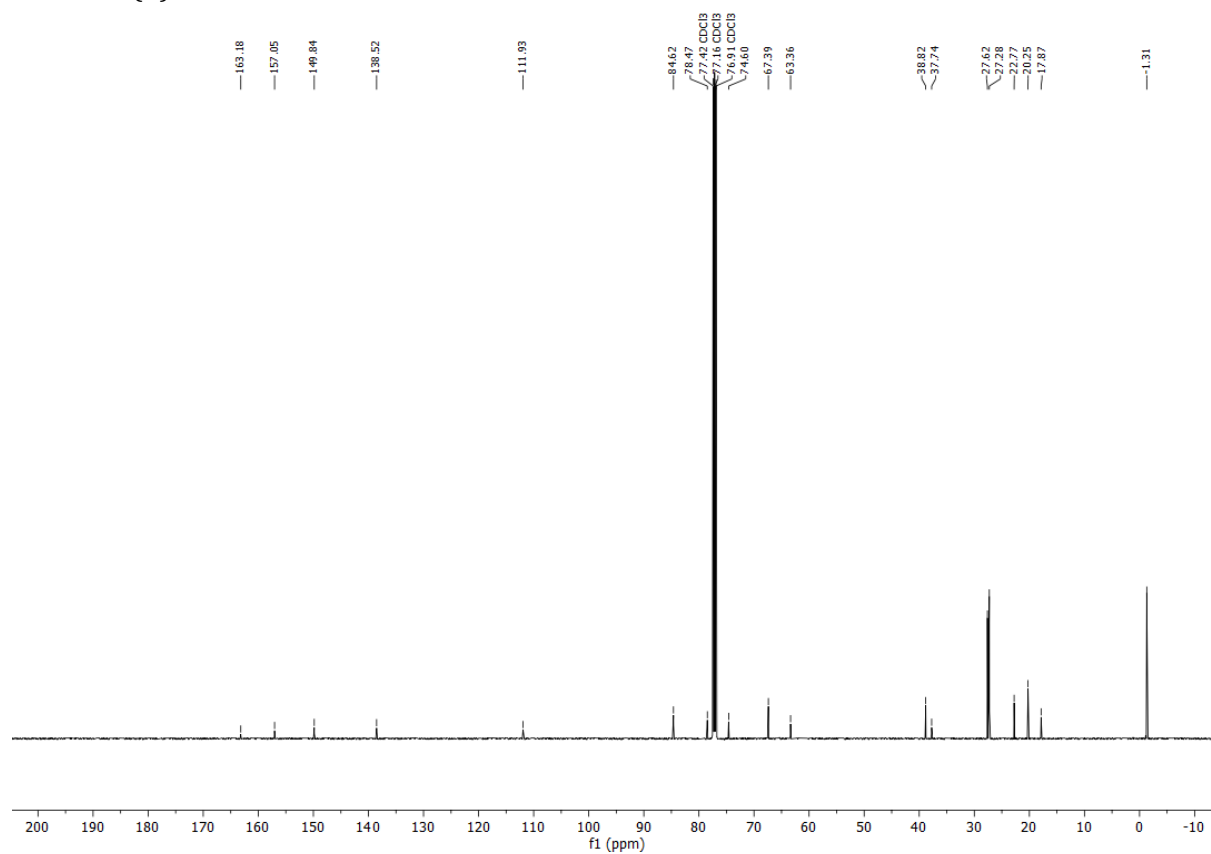
- [303] F. Muller, L. Escobar, F. Xu, E. Wegrzyn, M. Nainyte, T. Amatov, C. Y. Chan, A. Pichler, T. Carell, *Nature* **2022**, *605*, 279-284.
- [304] A. J. Kirby, P. W. Lancaster, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1972**, 1206-1214.
- [305] S. Su, F.-S. Du, Z.-C. Li, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8384-8392.

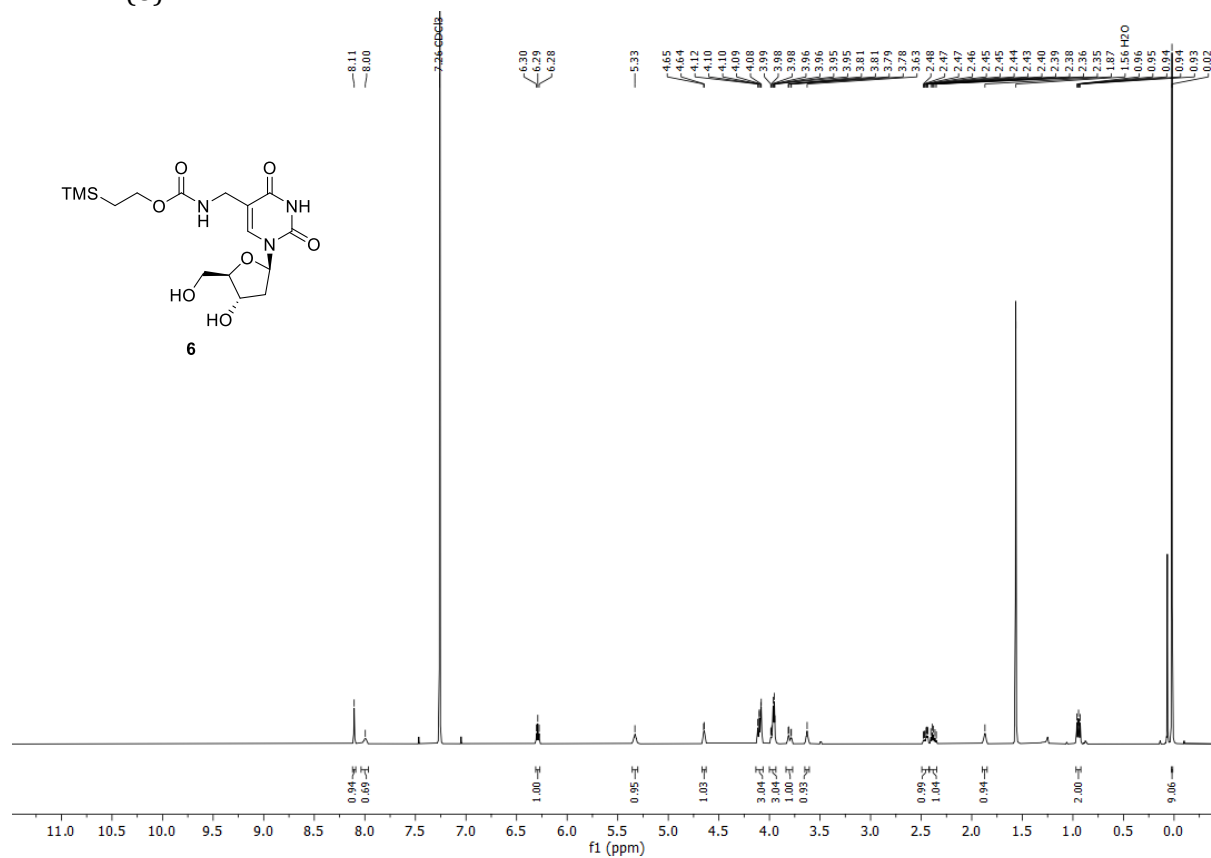
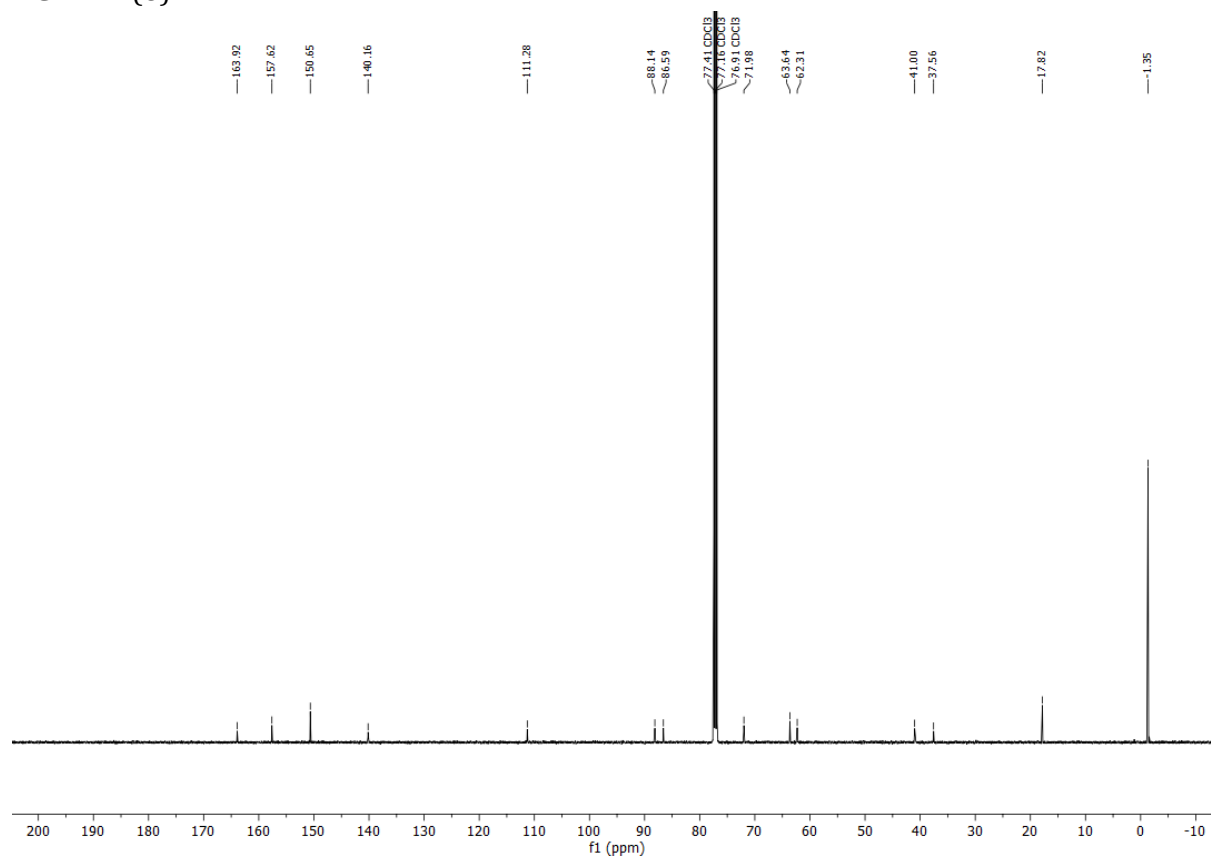
Anhang

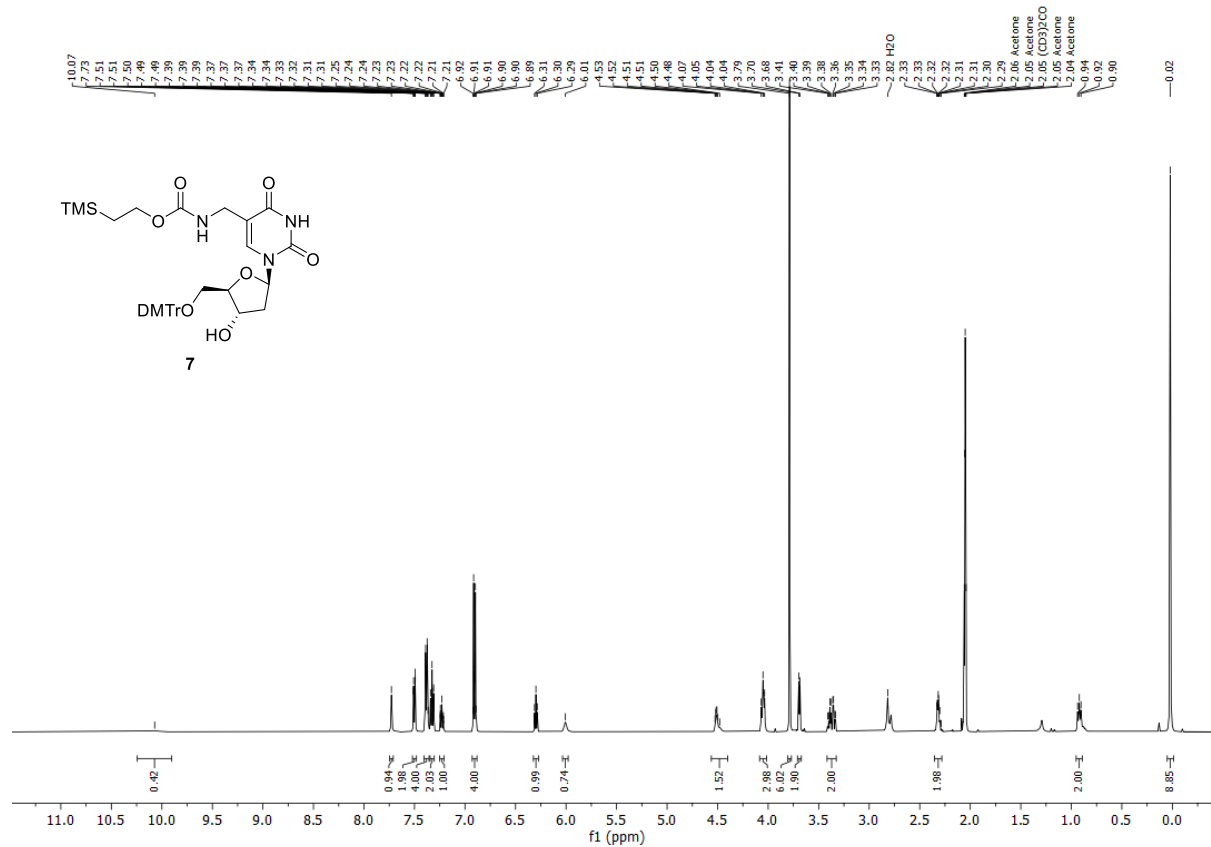
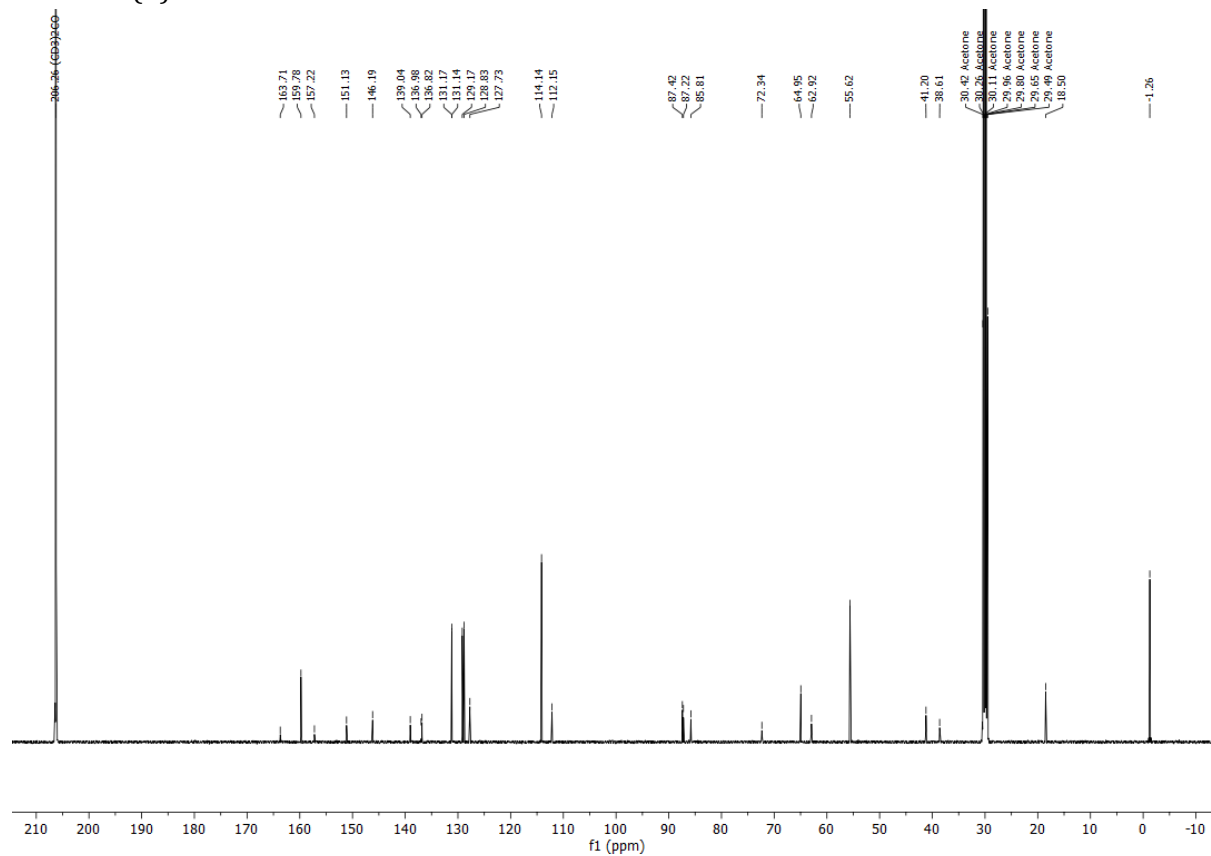
Anhang I

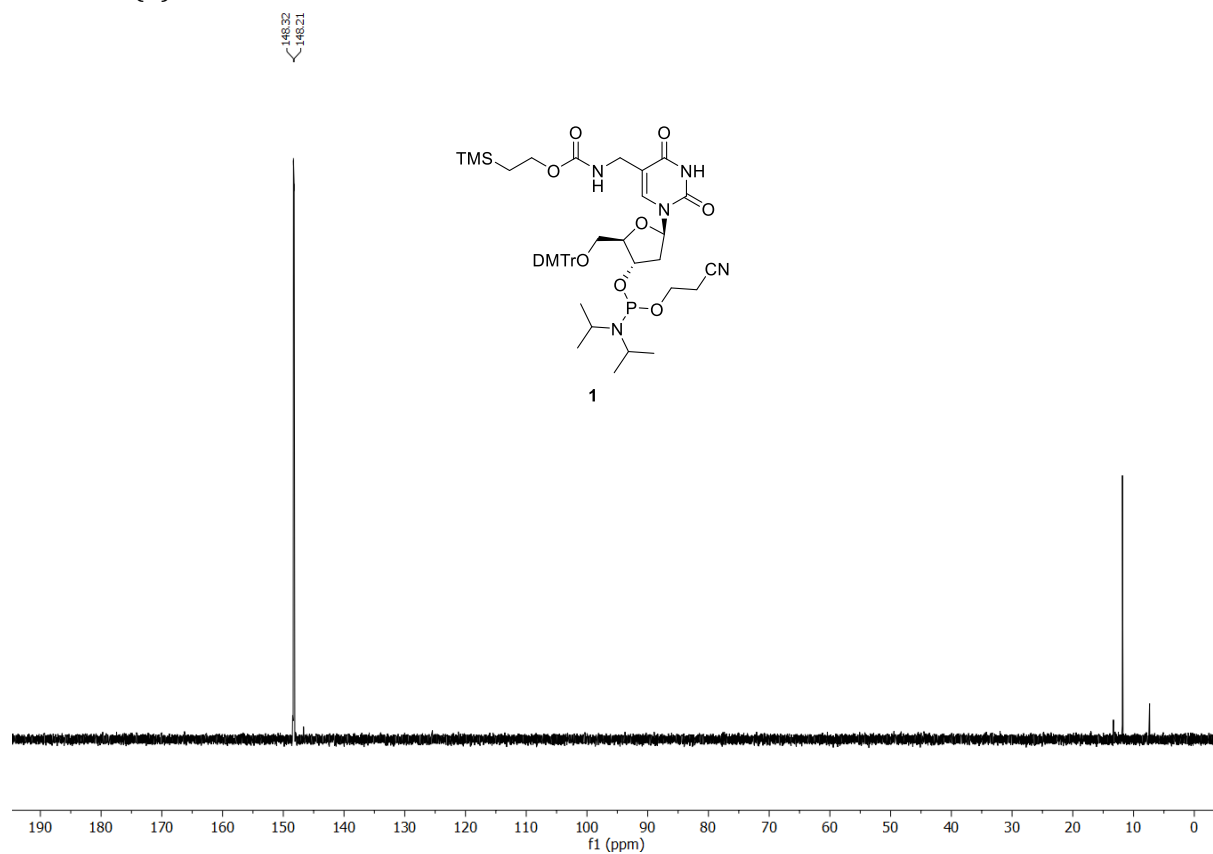
¹H-NMR (3)**¹³C-NMR (3)**

¹H-NMR (4)**¹³C-NMR (4)**

¹H-NMR (5)**¹³C-NMR (5)**

¹H-NMR (6)**¹³C-NMR (6)**

¹H-NMR (7)**¹³C-NMR (7)**

^{31}P -NMR (1)

Anhang II

Supporting Information

Suppression of SARS-CoV-2 Replication with Stabilized and Click-Chemistry Modified siRNAs

F. R. Traube, M. Stern, A. J. Tölke, M. Rudelius, E. Mejías-Pérez, N. Raddaoui, B. M. Kümmerer, C. Douat, F. Streshnev, M. Albanese, P. R. Wratil, Y. V. Gärtner, M. Nainytė, G. Giorgio, S. Michalakis, S. Schneider, H. Streeck, M. Müller, O. T. Keppler, T. Carell**

Methods

Design of siRNA sequences

siRNA sequences against the SARS-CoV-2 RNA genome and transcripts were designed based on the Wuhan reference genome (NC_045512) and https://cov-lineages.org/global_report_B.1.617.2.html using web-based tools, such as the siRNA-design tool from Eurofins (<http://eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/sirna-design/>) and the RNAs webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAs/RNAs.cgi>).

Cloning of the luciferase reporter system

Synthetic target sequences (obtained from either *Eurofins*, *Genewiz* or *Thermo Scientific*), which are listed in Table S2, were cloned into psiCheck2 (*Promega* C8021) using the NEB HiFi Assembly Kit (*New England Biolabs*). Two approaches were tested: either reporter plasmid constructs into which the siRNA target sequences were directly placed next to each other (no viral sequence context) or reporter plasmid constructs in which the siRNA target sequences were kept in the original sequence context to reflect local RNA structure variations that might occur in the viral genome and impact on siRNA binding.

Synthesis and purification of RNA oligonucleotides

Unmodified RNA oligonucleotides (Table S1) were purchased from *Ella Biotech*. Modified RNA oligonucleotides (Table S5, Figure S5) were synthesized on a 1 μ mol scale using an RNA automated synthesizer (*Applied Biosystems 394 DNA/RNA Synthesizer*) with standard phosphoramidite chemistry. Oligonucleotides were synthesized in DMT-OFF mode using DCA as a deblocking agent in CH_2Cl_2 , BTT or Activator 42[®] as activator in MeCN, Ac₂O as capping reagent in pyridine/THF and I₂ as oxidizer in pyridine/H₂O. All canonical and modified phosphoramidites were obtained from *Linktech*, *Sigma-Aldrich* and *Baseclick*. The cleavage and deprotection of the CPG bound RNA oligonucleotides were performed with $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq})}/\text{NH}_2\text{Me}_{(\text{aq})}$ (1/1, 1 mL) at 65 °C for 5 min. The supernatant was transferred and the solution was evaporated at 35 °C under reduced pressure. The residue was subsequently heated with a solution of trimethylamine trihydrofluoride (98% in triethylamine, 125 μ L) in DMSO (100 μ L) at 65 °C for 1.5 h. Upon cooling in an ice bath, NaOAc (3.0 M, 25 μ L) and *n*-BuOH (1 mL) were added. The resulting suspension was vortexed and cooled in a freezer (-80 °C) for 30 min. After the centrifugation, the supernatant was removed and the remaining oligonucleotide pellet was dried under vacuum. The oligonucleotides were further purified by semi-preparative reverse-phase HPLC using an *Agilent Technologies 1260 Infinity II* System with a *G7114A* detector equipped with the column *Nucleosil VP 250/10 C18* from *Macherey Nagel*. A gradient of 0-30% of buffer B in 45 min was applied (0-40% for highly modified strands). The buffer system: buffer A: 100 mM NEt_3/HOAc , pH 7.0 in H₂O and buffer B: 100 mM NEt_3/HOAc in 80% (v/v) acetonitrile. A flow rate of 5 mL/min was applied for the semi-preparative purifications. Analytical RP-HPLC was performed on an *Agilent Technologies 1260 Infinity II* System with a *G7114A* detector equipped with the column *Nucleosil 250/4 C18* from *Macherey Nagel* using a flow rate of 1 mL/min. The extinction coefficients were calculated using the software *OligoAnalyzer* (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) from *Integrated DNA-Technologies*. The structural integrity of the synthesized oligonucleotides was analysed by MALDI-TOF mass measurement using a 3-hydroxypicolinic acid matrix.

Synthesis and purification of peptide P

Commercially available reagents were used throughout without purification. Wang resin was purchased from *Sigma Aldrich*. *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) was purchased from *Sigma-Aldrich*. *N*-Fmoc amino acids and (benzotriazol-1-yloxy)trypyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) were purchased from *IRIS Biotech GMBH*. Solid phase synthesis (SPS) grade organic solvents (DMF, DCM) were used for solid peptide phase synthesis (SPPS) and were purchased from *Carlo Erba*. MilliQ water was used for RP-HPLC analyses and semi-preparative purifications. SPPS was performed automatically on a *Liberty Blue* peptide synthesizer (*vide infra*) (*CEM mWaves S.A.S., Germany*). RP-HPLC and ESI-HRMS analyses were carried out on a *LCMS Bruker MicroTOF II* equipped with a *Thermo Ultimate 3000* HPLC line using a *Phenomenex Kinetex EVO C18* column (50 mm \times 2.1, 2.6 μ m) at a flow rate of 0.5 mL/min. The mobile phase was composed of 0.1% (v/v) HCOOH-H₂O (Solvent A) and 0.1% HCOOH-CH₃CN (Solvent B). Detection was performed at three different wavelengths (200, 214 and 254 nm) and the column temperature in the oven was maintained at 50 °C. Semi-preparative purifications of peptides were performed on a *Thermo Ultimate 3000* using a *Macherey Nagel Nucleodur C18ec* column (250 \times 10 mm, 5 μ m) at a flow rate of 5 mL/min. The mobile phase was composed of 0.1% (v/v) TFA-H₂O (Solvent A) and 0.1% TFA-CH₃CN (Solvent B). Column eluent was monitored by UV detection at 214 and 254 nm. The purity of the compounds after purification was determined to be \geq 95%.

P was prepared on a 100 μ mol scale. Polystyrene Wang resin (loading 0.37 mmol/g) was placed in the reaction vessel, and pre-swollen with DMF for 1 h. Loading of *N*-Fmoc-Leu-OH (10 equiv. relative to the resin loading) on the resin was carried out manually by using the symmetrical anhydride pre-activation procedure in the presence of DIC (5 equiv.) in anhydrous DCM for 20 min and subsequent addition of the symmetrical anhydride to the resin in

the presence of DMAP (0.1 equiv.) in DMF at room temperature for 2 h. The resin was then filtered off and washed with DMF (3 × 3 mL). The vessel was then placed inside the microwave reactor of the *Liberty Blue*. Microwave irradiation was next applied during coupling and deprotection steps. The temperature was maintained by modulation of power and controlled with a fiber optic sensor. Fmoc removal was carried out with 20% of piperidine in DMF (2 × 3 mL) under microwave irradiation (75 °C, 100 W, 30 sec then 75 °C, 100 W, 180 sec). The resin was then filtered off and washed with DMF (3 × 3 mL). *N*-Fmoc-Xaa-OH (5 equiv. relative to the resin loading), PyBOP (5 equiv.) and DIEA (10 equiv.), were dissolved in DMF. The vessel was then irradiated (75 °C, 30 W, 300 sec). The resin was then filtered off and washed with DMF (3 × 3 mL). Each coupling step was repeated once. To note, Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2 × 5 equiv.) was coupled by conventional method without microwave irradiation by using the same number of equivalents of coupling reagents for 1500 sec. The azido-Deg₃-acetic acid was at last introduced following the same coupling conditions to those applied for the Arg coupling. Finally, the resin was swollen in a mixture TFA/TIS/H₂O/ (95:2.5:2.5, v/v/v) and left to react for 4 h under slight shaking. The resin was filtered off, washed with TFA (2 × 2 mL) and the filtrate was precipitated in cold Et₂O. The crude oligomer was lyophilized then analysed by RP-HPLC before to be purified by preparative RP-HPLC using the appropriate gradient to a final purity ≥ 95%.

The desired peptide **P** (N₃-Deg₃-CO-Tyr-Lys-Tyr-Arg-Tyr-Leu-OH) was purified by preparative RP-HPLC (Figure S6A) with a gradient 20-44% of buffer B in 15 min at a flow rate of 5 mL/min.

ESI-MS (ESI+): m/z calculated for C₅₃H₇₇N₁₃O₁₄: 1120.5786 [M+H]⁺ found 1120.5337 [M+H]⁺ (Figure S6B).

Click procedure

The fluorophore dye azides were purchased from *Jena Bioscience* and *Baseclick*. To a solution of the oligonucleotide (4.0 mM in H₂O, 5.0 μL) an azide solution (20 mM in DMSO, 4.0 μL), CuSO₄ (50 mM in 100 mM THPTA solution in H₂O, 5.0 μL) and ascorbate (50 mM in H₂O, 10 μL) were added. The reaction mixture was degassed with argon and thoroughly shaken at 25 °C for 1 h. The crude mixtures were first purified by a *Bio-Gel P-6* column and subsequently by reversed-phase HPLC (Table S6). The click products were analysed by analytical reversed-phase HPLC and MALDI-TOF (Figure S7). For the peptide click triethylammonium acetate buffer (1.0 M in H₂O, 20 μL) and aminoguanidine hydrochloride (50 mM in H₂O, 4.0 μL) were additionally added.

siRNA hybridization

The annealing of the double strands was performed in the hybridization buffer (10 mM Tris-HCl (pH = 8), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) by heating to 95 °C for 2 min and cooling to 10 °C within 85 min (gradient -1 °C/min) using a *TAdvanced Twin* Thermocycler from *Biometra*.

Serum stability assay

Human serum (human male AB plasma, USA origin) was purchased from *Sigma Aldrich* and pre-heated at 37 °C before the RNA duplex (9/1, Serum/RNA) was added. At certain time points, samples (100 μL) were taken and extracted with phenol (300 μL) and ddH₂O (200 μL). After centrifugation for 3 min at 4 °C and 21000 × *g* the supernatant was collected in a separate Eppendorf tube. The step was repeated twice. The combined aqueous phases were washed three times with chloroform and centrifuged for 1 min at 4 °C. After filtration (0.2 μm) the volume was reduced to 150 μL under reduced pressure. The samples (75 μL) were analysed by analytical reversed-phase HPLC (Figure S8). Analytical reversed-phase HPLC was performed with a gradient of 0-20% (**S-6**), 0-25% (**S-6^m**) and 0-35% (**S-6^{fm}**) of buffer B in 60 min. The column oven was heated to 50 °C for the **S-6** strand.

Cell culture

Vero-E6 cells (American Type Culture Collection, ATCC, Virginia, USA), A549 cells (human lung carcinoma cell line; American Type Culture Collection, ATCC, Virginia, USA), Caco-2 cells (human colorectal adenocarcinoma cell line, ATCC, Virginia, USA) and MDA-MB-231 cells (triple-negative human breast adenocarcinoma; DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Germany) were cultivated at 37 °C in a humidified incubator with atmospheric oxygen concentrations (21%) and 5% CO₂. The cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin-streptomycin and NEAA (culture medium). Cells were routinely passaged when reaching a confluence of 80 - 90%.

Dual-luciferase assay

All quantities refer to the amounts required for one well. The activity of the prepared siRNAs was tested against different reporter plasmids (**A1** - **A3**) that either contained just the sequence of the leader sequence (**A1**) or a 350 bp long insert, which included multiple target sites in the respective sequence context of the viral genome (**A2**), or a concatenated sequence of multiple viral 21mer target sites (**A3**) (Figure S1b). For the dual-luciferase assay (Dual-

Glo Luciferase assay, *Promega*), 9500 A549 cells were plated in a 96 well microplate (*Greiner*) in 100 μ L of culture medium. 24 h after seeding, the cells were transfected with 0.5 ng reporter plasmid using 0.25 μ L of transfection reagent jetPRIME (*Polyplus Transfection VWR*) as described by the manufacturer. 2–3 h after plasmid transfection, the medium was exchanged, and siRNA transfection was performed using 2 pmol of siRNA (20 nM final concentration) and 0.25 μ L of Lipofectamine RNAiMAX (*Thermo Fisher Scientific*) as described by the manufacturer. 24 h after siRNA transfection, the medium was exchanged to 70 μ L of DMEM low glucose without phenol red containing 10% FBS and the assay was performed according to the manufacturer's manual on a Tecan Plate Reader (*Tecan GENios Pro*, luminescence mode). The assay was performed in technical quadruplicates. For the analysis, the *Renilla* luciferase signal was divided by the firefly luciferase signal of the same well. Afterwards, the mean of the *Renilla*/firefly luciferase ratios of the technical replicates was calculated and knockdown efficiencies were determined as described in the statistical analysis section.

siRNA delivery into Caco-2 cells

Caco-2 cells (3×10^4 per well) were plated in a μ -slide 8 well chamber (*ibidi*) in 200 μ L RPMI-1640 containing 10% FBS. 30 h after seeding, 180 pmol of siRNA per well (900 nM final concentration) were added. 18 h post transfection, the cells were washed twice with HBSS (*Sigma Aldrich*). 16% FA (*Thermo Fisher Scientific*) was diluted in DPBS to reach a 4% working solution and cells were fixed for 10 min. Afterwards, cells were washed three times with DPBS, stained with Hoechst 33342 (5 μ g/mL working solution) for 10 min. Then, cells were washed with DPBS and mounted using Fluoroshield histology mounting medium (*Sigma Aldrich*) prior to microscopy. Confocal microscopy was performed using a Leica SP8 confocal laser scanning microscope (*Leica*) with the associated LAS X software and Z-series spanning the full cell volume with a step size of 0.43 μ m and a total size of 2.99 μ m were acquired. Using *ImageJ*, final images that represent maximum intensity projections were calculated.

Isolation and expansion of SARS-CoV-2 clinical isolates

Replication-competent SARS-CoV-2 was expanded using waste material from PCR-positive nasopharyngeal swabs as reported^[1] (PMID: 34379308; PMID: 34713795; PMID: 35090165). High-titer virus stocks were characterized by RT-qPCR, as reported previously^[2], and the infectious titer was determined on human A549 cells and MDA-MB-231 cells, overexpressing the human angiotensin-converting enzyme 2 receptor, hACE2, referred to as A549-hACE2 cells and MDA-MB-231-hACE2 cells, respectively (see also "infection-induced cytotoxicity assay"). In parallel, for expanded stocks of SARS-CoV-2 near full-length genome sequences were generated following the ARTIC network nCoV-2019 sequencing protocol v2^[3] as described previously^[4].

RNA interference with SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells

For siRNA transfection, 2 pmol siRNA and 0.25 μ L Lipofectamine RNAiMAX were each mixed with 10 μ L Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific*) per reaction. The two mixtures were combined and after an incubation of 20 min at room temperature, 100 μ L of DMEM/10% FBS were added. For pre-infection treatment experiments, the resulting mixture was added to cells of a 96 well plate seeded the day before with 2×10^4 cells/well and incubated for 1 h at 37 °C. Thereafter, the siRNA mixture was removed, and cells were infected with SARS-CoV-2 (pangolin lineage B.3) at an MOI of 0.01 for 1 h at 37 °C. After removing the virus inoculum, cells were washed once with medium and incubated again with 120 μ L DMEM/10% FBS. For post-infection treatment experiments, cells were infected first with SARS-CoV-2 at an MOI of 0.01. After infection for 1 h at 37 °C, cells were washed once with medium before the siRNA transfection was performed as described above. At 24 h post-infection, virus released into the supernatant was titered on Vero E6 cells by plaque assay using a methylcellulose overlay as described previously^[5]. Additional details about the analysis are given in the statistical analysis section.

Infection-induced cytotoxicity assay

A549-hACE2 cells (1.5×10^4 cells per well) or MDA-MB-231-hACE2 cells (2.0×10^4 cells per well) were plated in a 96-well white well half area plate with clear bottom (*Corning*) in culture medium. At the indicated time points, target cells were treated with either siRNAs at indicated concentrations or RDV (1 μ M) two hours before infection. Subsequently, cells were challenged with a serial dilution of a stock of the indicated SARS-CoV-2 clinical isolate. In all cases, infection was performed in "virus infection medium" (DMEM, 2% FBS, 100 U/mL penicillin-streptomycin, NEAA). 48 h (MDA-MB-231-hACE2 cells) or 72 h (A549-hACE2 cells) after infection, analysis of virus-induced killing of target cells was performed by measurement of viability of target cells using the CellTiter-Glo 2.0 reagent (*Promega*). Cells were treated according to the manufacturer's instructions. In brief, 15 μ L CellTiter-Glo 2.0 reagent was added to each well, incubated for 10 min in the dark at room temperature and luminescence was recorded using the Infinite F200 microplate reader (*Tecan*). Viability of cells was calculated by normalization of readings for infected cells relative to those for untreated control cells.

RT-qPCR analysis of infection of A549-hACE2 cells with SARS-CoV-2

A549-hACE2 (3.0×10^4 cells per well) were plated in a 96-well plate (*Sarstedt*) in culture medium. Next, target cells were treated either 24 h before infection with siRNAs or 2 h before infection with RDV ($1 \mu\text{M}$). For infection, cells were challenged with a serial dilution of a SARS-CoV-2 B.1.177 (EU1) stock. In all cases, infection was performed in infection medium. 3 h post-infection, infection medium was removed, cells were washed once with PBS and fresh culture medium was added. A post wash sample was taken. 48 h post-infection, supernatants and cells were lysed using the MagnaPure lysis buffer (MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Lysis/Binding Buffer Refill; *Roche*) and heat inactivated (65°C for 15 min). Samples were analysed by RT-qPCR.

Virus-supernatant transfer assay

A549-hACE2 cells (1.25×10^5 cells per well) were plated in a 12-well plate (*Sarstedt*) in culture medium. Next, target cells were transfected with siRNAs (24 h before infection) using Lipofectamine RNAiMAX. The next day, transfection medium was replaced with virus infection medium. Treatment with RDV ($1 \mu\text{M}$) served as infection control. Subsequently, cells were challenged with the indicated volume of a SARS-CoV-2 B.1.177 (EU1) stock. 72 h after infection, supernatants were harvested, cleaned from cellular debris by centrifugation ($600 \times g$, 10 min, room temperature), and either lysed using the MagnaPure lysis buffer (MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Lysis/Binding Buffer Refill; *Roche*) followed by heat-inactivation (65°C for 15 min), or used to infect new target cells. Samples were analysed by real-time RT-PCR. In parallel, MDA-MB-231-hACE2 cells (2.0×10^4 cells per well) were plated in a 96-well white well half area plate with clear bottom (*Corning*) in virus infection medium. Subsequently, cells were challenged with a serial dilution of the previously generated supernatants. 48 h after infection, analysis of virus-mediated killing of target cells was performed by measurement of viability of target cells using the CellTiter-Glo 2.0 reagent (*Promega*) as described in the viability assay section.

Infection of 3D lung microtissue with SARS-CoV-2

EpiAirway™ 3D tracheobronchial microtissues (*MatTek Life Sciences*) were cultivated according to the manufacturer's instructions. Culture medium was supplied by the manufacturer. In brief, upon arrival, tissues were placed in 12-well hangtop plates with 5 mL of pre-warmed medium. Medium was replaced the next day for better equilibration of tissues. 24 h later, tissues were transferred into 6-well plates and treated with the indicated concentrations of siRNAs. The next day, siRNA-containing medium was removed and replaced with fresh medium. Treatment with RDV ($10 \mu\text{M}$) served as infection control. Subsequently, tissues were challenged with SARS-CoV-2 (B.1.177 8EU1). 3 h after infection, virus infection medium was removed, and tissues were washed twice with PBS from both the basal and apical side. An apical post-wash sample was taken for further analysis. Next, fresh medium was added. 72 h after infection, an apical wash was performed and stored, and both apical wash and tissues were lysed using the MagnaPure lysis buffer (MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit - Lysis/Binding Buffer Refill; *Roche*) followed by heat inactivation (65°C for 15 min). Samples were analysed by RT-qPCR.

Viral RNA isolation and cDNA synthesis

Viral nucleic acid extraction of inactivated cell culture supernatants was done using the Beckmann Biomek NX robotics platform (*Beckmann Coulter*) and the RNAdvance Viral (*Beckmann Coulter*) according to manufacturer's instructions. Subsequently, cDNA synthesis was performed using the High-Capacity RNA-to-cDNA (*Thermo Fisher Scientific*) according to manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed for 60 min at 37°C , 5 min at 95°C on a PCR cycler (*Eppendorf*).

RT-qPCR (N, RdRp and E gene)

Allplex™ 2019-nCoV Assay (*Seegene Germany*) was used to detect SARS-CoV-2 RNA according to the manufacturer's instructions. In brief, $17 \mu\text{L}$ of reaction mix were added to $8 \mu\text{L}$ of nucleic acid eluate. Samples were measured in 96-well plates using the *Bio-Rad* CFX96 Dx System (C1000 Thermal Cycler). Data was analysed using the Seegene 2019-nCoV Viewer (ver 3.18.005.003).

RT-qPCR (S gene)

$2 \mu\text{L}$ of cDNA product was amplified using iTaq Universal SYBR Green Supermix (*Bio-Rad*) on a qTOWER³/G cycler (*Jena Biosciences*). qPCR primers (Spike-total) are reported in Table S7.

RT-qPCR (SARS-CoV-2 sgmRNAs)

RT-qPCR was performed using either SARS-CoV-2 forward primer leader universal (600 nM) in combination with a gene-specific sgmRNA reverse primer (600 nM), or GAPDH forward and reverse primers (600 nM each), see Table S7. Quantification of sgmRNAs and GAPDH was done in a standard PowerUp SYBR Green PCR on a QuantStudio 3 Real-Time PCR System (*Thermo Fisher Scientific*).

RNA FISH and quantification of apoptosis in SARS-CoV-2 infected EpiAirway™

1.5 µm slides of formalin-fixed and paraffin embedded (FFPE) organoids were stained with hematoxylin and eosin (H&E). All slides were evaluated by an experienced pathologist (MR) and apoptosis was quantified in 10 high-power fields (HPFs) per organoid.

For *in situ* hybridization SARS-CoV-2-spike probe (RNAscope CoV2019-S-antisense; ACD Bio-Techne) was validated on FFPE SARS-CoV-2 infected and uninfected Caco-2 cells. 1.5 µm sections of FFPE organoids were processed according to the manufacturer's protocol. Detection was carried out with OPAL 570 (Akoya Bioscience). Slides were scanned using a Vectra Polaris™ imaging system (Akoya Bioscience) and 10 region of interest (ROIs) were chosen for quantification using HALO software.

Statistical analysis and reproducibility

Statistical analysis for all experiments was performed using Graphpad Prism (8.0.0 or newer).

Figure 1b Data from two (S-7) to three (L-1, R-2 to R-5, S-6, S-8, S-9) biologically independent experiments are displayed. Reduction of *Renilla* luciferase was calculated using equation (I). Targeting_{siRNA} is one of the siRNAs L-2, R-2 to R-5 or S-6 to S-9.

$$Renilla\ reduction\ (\%) = 100 - 100 \cdot \frac{\frac{Ratio_{Renilla}(Targeting_{siRNA})}{Firefly}}{\frac{Ratio_{Renilla}(Ctrl.-10)}{Firefly}} \quad (I)$$

Figure 1c, d Data from three to five replicates from in total two independent experiments are displayed. Reduction of PFU/mL was calculated for each replicate using equation (II). Targeting_{siRNA} is one of the siRNAs L-2, R-2 to R-5 or S-6 to S-9.

$$Reduction\ \frac{PFU}{mL}\ (\%) = 100 - 100 \cdot \frac{Targeting_{siRNA}}{Ctrl.-10} \quad (II)$$

Figure 1f – h Representative data from one out of two independent experiments are displayed. Graphs show mean of two technical replicates from one independent experiment.

Figure 1i Data from one independent experiment are displayed. Graphs show mean of two technical replicates from this experiment.

Figure 1f – i CV50 was calculated using [Inhibitor] vs normalized response – Variable slope [2] with the equation (III). Details about the CV50 are listed in Table S3.

$$Y = \frac{100}{1 + \frac{X^{HillSlope}}{CV50^{HillSlope}}} \quad (III)$$

Figure 2b Data from four to five independent experiments are displayed. Ordinary one-way ANOVA (p-value < 0.0001) combined with Dunnett's multiple comparisons test (Alpha 0.05) was performed with S-6 as the control column. Adjusted p-values for Dunnett's multiple comparisons test: S-6 vs. S-6^{hm} <0.0001, S-6 vs S-6^m 0.9974.

Figure 2c, d Representative data from one out of two independent experiments are displayed.

Figure 2e – f Representative data from one out of three independent experiments are displayed. Graphs show mean of two technical replicates. CV50 was calculated using [Inhibitor] vs normalized response – Variable slope [2] with the equation (III). Details about the CV50 are listed in Table S4. The values for IC50 (= mean), Std. Error IC50 (= SEM) and Degrees of Freedom +1 (= n) were grouped (columns: treatment, rows: siRNA concentration) and multiple unpaired t-tests (one per row, individual variance for each row, multiple comparisons adjustment using FDR (Q 1%) two-stage set-up method by Benjamini, Krieger and Yetkutieli) q value for t-tests: 20 nM S-6^m vs. S-6 0.032105, 2 nM S-6^m vs. S-6 0.000707, 0.2 nM S-6^m vs. S-6 < 0.000001, 0.02 nM S-6^m vs. S-6 0.010881.

Figure 3b Representative images of one out of three independent experiments are displayed.

Figure 3c Graphs represent data of two independent tissue batches and each batch included one to three independent wells. Data of all independent wells were considered for the analysis. C_i values for untreated, 10 μM RDV and 300 nM **S-6^m-P** were grouped (columns: treatment, rows: fraction) and ordinary two-way ANOVA (p-value interaction 0.0214, p-value treatment 0.0008, p-value fraction <0.0001) combined with Dunnett's multiple comparisons test (Alpha 0.05) was performed to compare within each fraction (row) the different treatments (column) compared to the untreated control. Adjusted p-values for Dunnett's multiple comparisons test: untreated vs. **S-6^m-P** 0.4923 (post-wash), 0.0070 (apical wash harvest), 0.0040 (tissue harvest); untreated vs. RDV 0.8760 (post-wash), 0.0088 (apical wash harvest), 0.0006 (tissue harvest).

Figure 3d Graphs represent data of two independent tissue batches and each batch included one to three independent wells. Data of all independent wells were considered for the analysis. C_i values for untreated, 10 μM RDV and 300 nM **S-6^m-P** were grouped (columns: treatment, rows: gene) and ordinary two-way ANOVA (p-value interaction 0.2116, p-value treatment <0.0001, p-value gene <0.0001) combined with Dunnett's multiple comparisons test (Alpha 0.05) was performed to compare within each gene (row) the different treatments (column) compared to the untreated control. Adjusted p-values for Dunnett's multiple comparisons test: untreated vs. **S-6^m-P** 0.0062 (N), 0.0154 (S), 0.0167 (M), 0.0278 (E), 0.9780 (GAPDH); untreated vs. RDV 0.0024 (N), 0.0006 (S), 0.003 (M), 0.0015 (E), 0.9517 (GAPDH).

Figure 3e Representative images of one out of three independent experiments are displayed.

Figure 3f Quantification was performed for each condition in three independent tissue batches, one independent well per condition per batch. Quantification was done for ten independent HPFs per well. Data were entered in a nested table with three main columns (untreated, 300 nM **S-6^m-P**, 10 μM RDV) and each main column had three sub-columns (one sub-column per independent tissue). Nested one-way ANOVA (p-value <0.0001) combined with Dunnett's multiple comparisons test (Alpha 0.05) was performed to compare results of **S-6^m-P** and RDV treated tissues to untreated tissues. Adjusted p-value untreated vs. **S-6^m-P** <0.0001, untreated vs. RDV < 0.0001.

Figure 3g Representative images of one out of three independent experiments are displayed. Graph shows data from three independent tissue batches. Quantification of apoptosis in untreated, **S-6^m-P** and RDV treated tissues was analysed using ordinary one-way ANOVA (p-value 0.0002) combined with Dunnett's multiple comparisons test (Alpha 0.05) to compare apoptosis between untreated and **S-6^m-P** or RDV-treated tissues. Adjusted p-values for Dunnett's multiple comparisons test: untreated vs. **S-6^m-P** 0.0004, untreated vs. RDV 0.0002.

Figure 4a – c, e Representative data of one out of two independent experiments are shown.

Figure S4d Graphs represent data of one independent tissue batch, which included two to three independent wells. Data of all independent wells were considered for the analysis. C_i values for uninfected, untreated, 10 μM RDV, 300 nM **S-6^m-P** and 300 nM **Ctrl.-10^m-P** were grouped (columns: treatment, rows: gene) and ordinary two-way ANOVA excluding the uninfected samples (p-value interaction 0.0096, p-value treatment 0.0002, p-value fraction <0.0001) combined with Tukey's multiple comparisons test (Alpha 0.05) was performed to compare within fraction (row) the different treatments (column) among each other. Adjusted p-values for Tukey's multiple comparisons test for untreated vs. **S-6^m-P** 0.8425 (Post-Wash), 0.0010 (Apical Wash), 0.0032 (Tissue) and **Ctrl.-10^m-P** vs. **S-6^m-P** 0.7612 (Post-Wash), 0.0032 (Apical Wash), 0.0301 (Tissue)

Supplementary Figures

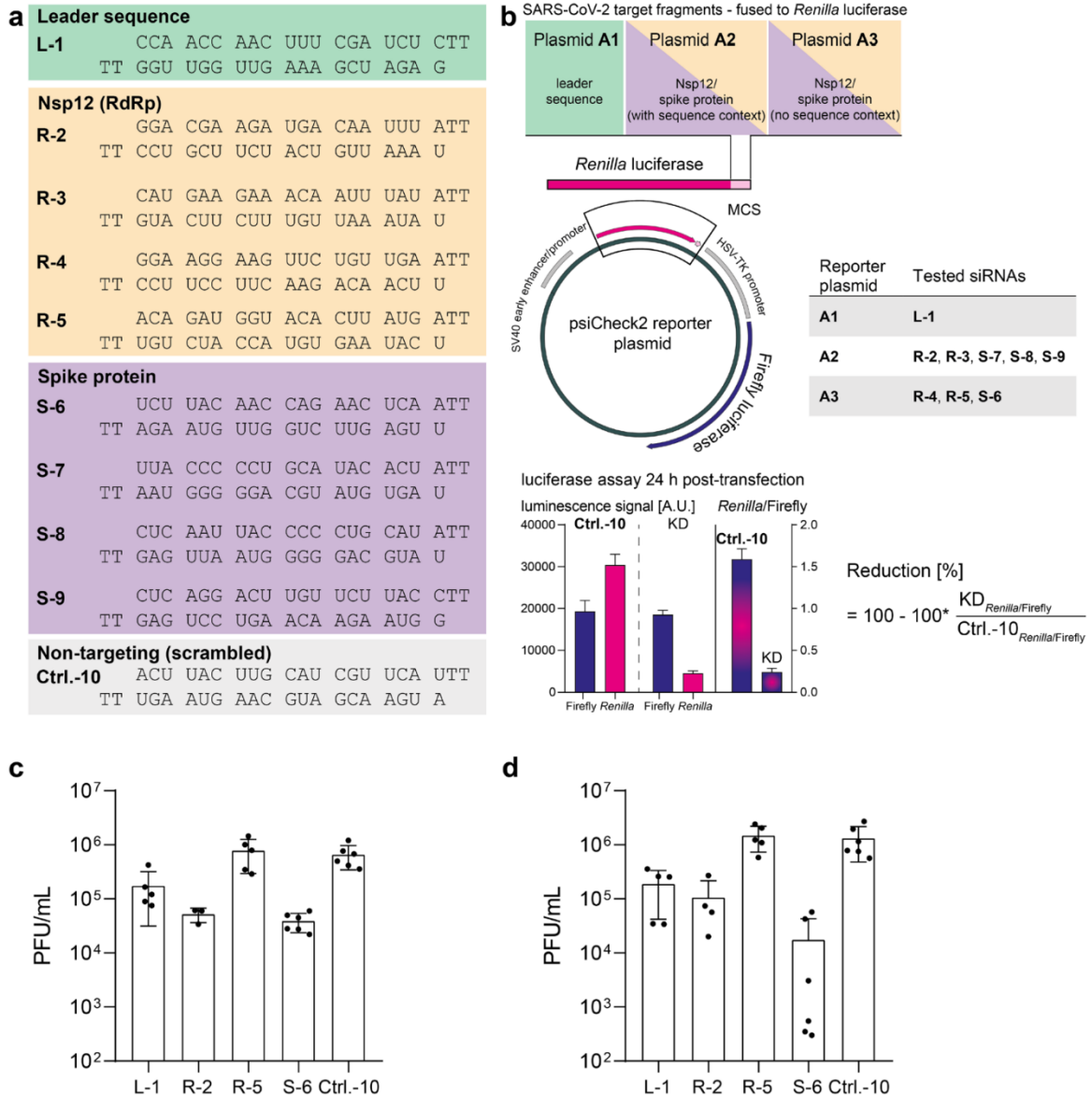


Figure S1: siRNA sequences, dual-luciferase reporter assay and antiviral activity in Vero-E6 cells. (a) Sequences of the designed siRNA duplexes. (b) Reporter plasmids for the dual-luciferase reporter assay and analysis of the assay to screen siRNA efficiency. (c, d) PFU/mL in Vero-E6 cells 72 h post SARS-CoV-2 infection (MOI 0.01). Cells were treated with 17 nM of the respective siRNAs (lipofection) either 1 h before (c) or 1 h after virus challenge (d). PFU = plaque forming units.

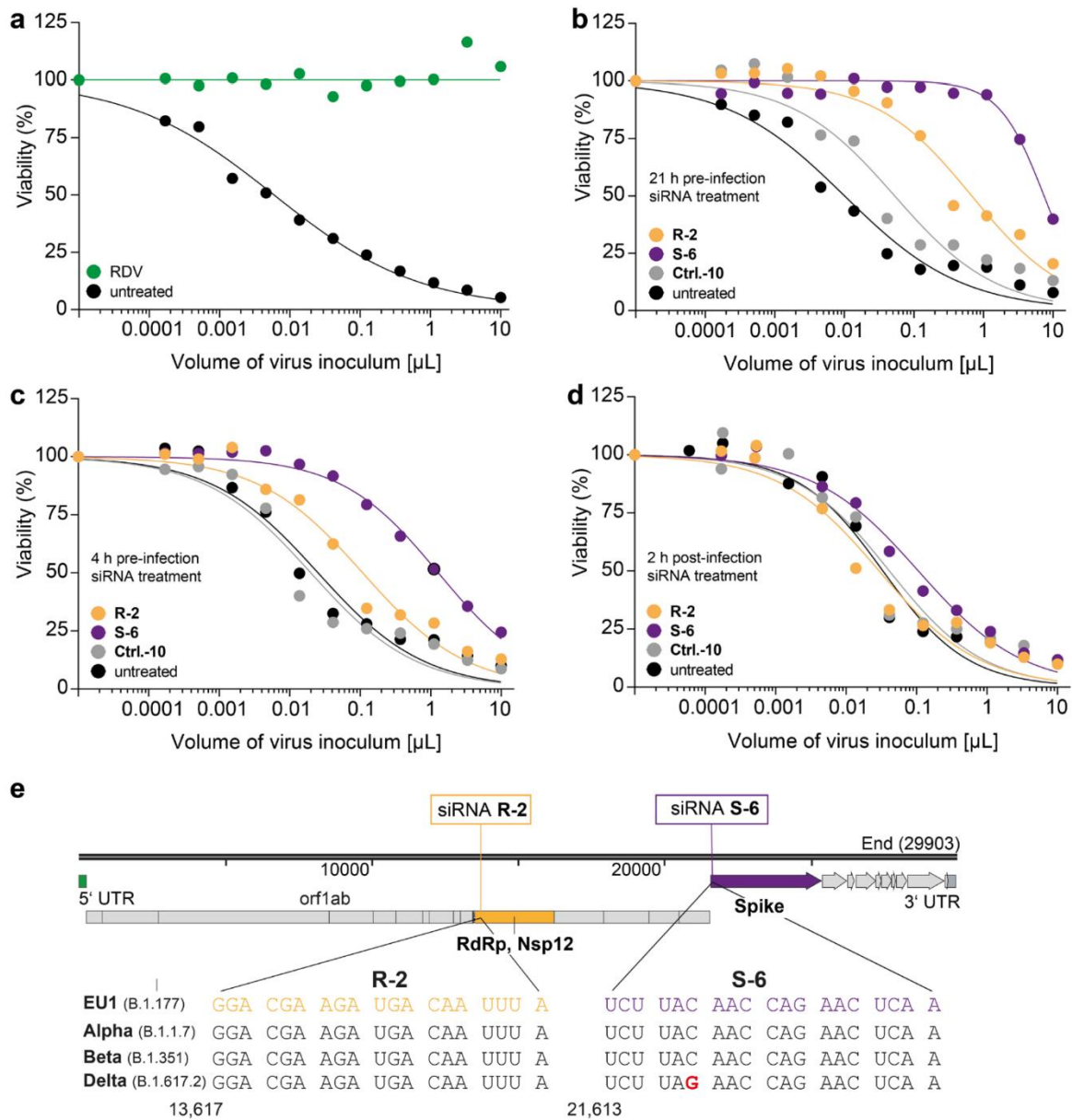


Figure S2: SARS-CoV-2 cytotoxicity assay including time-of-addition experiments and siRNA target sequences in VoCs Alpha, Beta and Delta. (a) Viability of MDA-MB-231-hACE2 cells depends on the SARS-CoV-2 virus inoculum (variant B.1.177 (EU1)) and specific treatment. Dots show the mean of two technical replicates from one representative biologically independent experiment. Treatment with 1 μM RDV 2 h pre-infection. (b – d) Time-of-addition experiments. Viability of MDA-MB-231-hACE2 cells depends on the SARS-CoV-2 virus inoculum (variant B.1.177 (EU1)) and specific treatment. Dots show the mean of technical replicates from one representative biologically independent experiment. siRNA treatment (20 nM, lipofection) 21 h pre-infection (b), 4 h pre-infection (c), or 2 h post-infection (d). (e) Target sequences of **R-2** and **S-6** aligned with the corresponding sequences in the VoCs B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta) and B.1.617.2 (Delta) showing that these regions are not affected by mutations in Alpha and Beta, whereas there is a mismatch in the **S-6** target region at position 21,618 in the Delta variant.

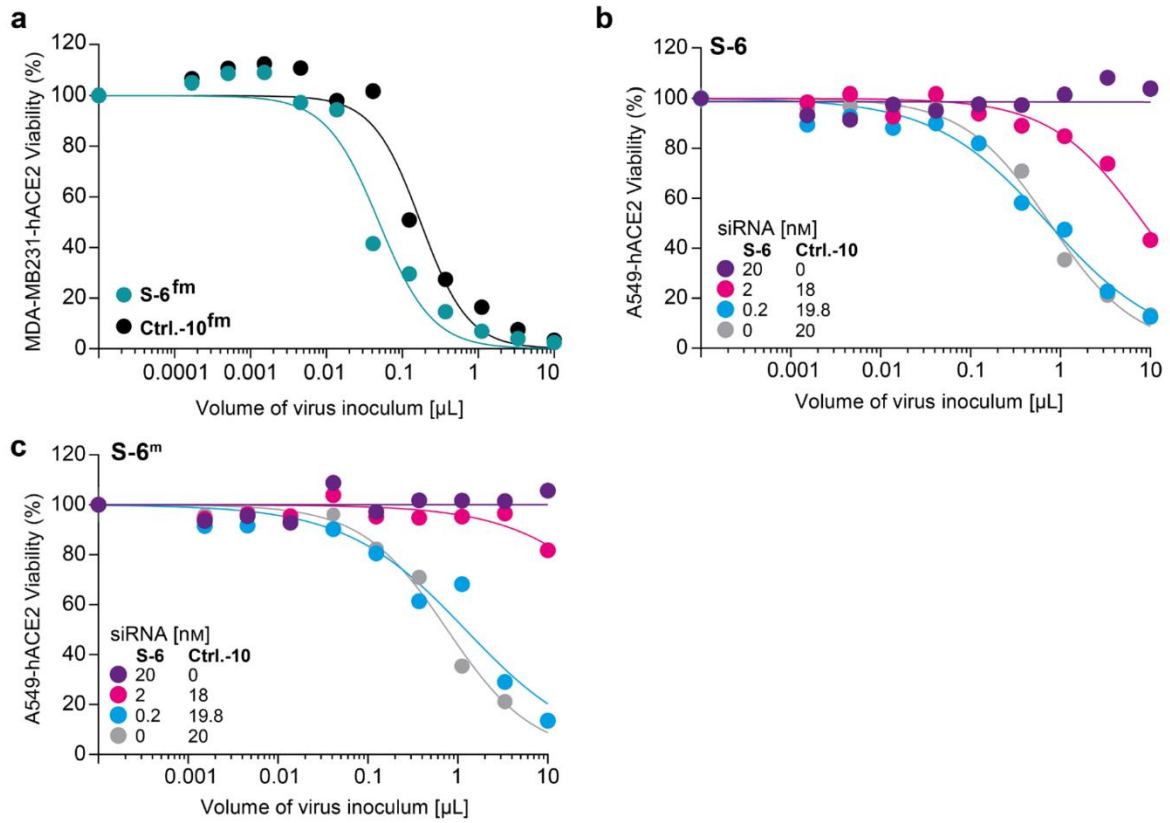


Figure S3: SARS-CoV-2 cytotoxicity assay with chemically modified siRNA. (a) Viability of MDA-MB-231-hACE2 with increasing SARS-CoV-2 virus inoculum (variant B.1.177 (EU1)) when treated with 40 nM **S-6^{fm}** using lipofection. Dots represent mean of two technical replicates. (b, c) Viability of SARS-CoV-2-infected A549-hACE2 cells in the context of titration of virus inoculum (0.0001 to 10 μL) and of **S-6** (b) or **S-6^m** (c) concentrations (0.2 to 20 nM, lipofection). Dots represent mean of two technical replicates. Representative data of one out of two independent experiments are displayed.

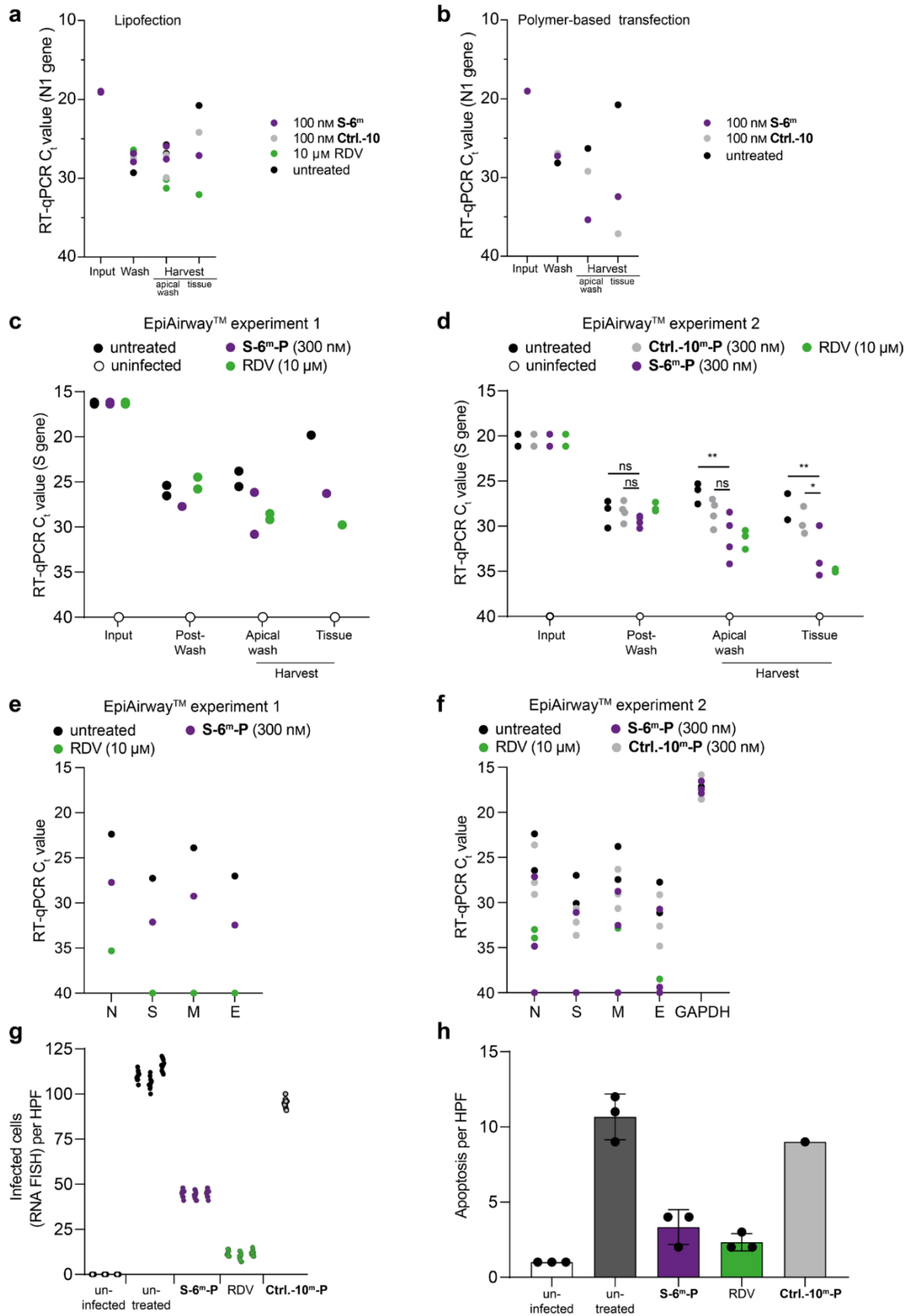


Figure S4: siRNA activity against SARS-CoV-2 infection of human 3D lung microtissues. (a, b) C_t values of SARS-CoV-2 RT-qPCR in 3D lung microtissues 72 h after virus challenge (SARS-CoV-2 variant B.1.177 (EU1)) are shown. Tissues were treated as indicated. (c, d) SARS-CoV-2 RT-qPCR results (C_t values depicted) of two independent SARS-CoV-2-infected (variant B.1.177

(EU1) 3D lung microtissue experiments. C_i values for the viral inoculum (Input), the post apical wash (Post-wash) and the apical wash and tissue at harvest 72 h p.i. are shown. Each dot represents data from one independent well. Figure 3c shows the mean of all data depicted in Figure S4c, d for **S-6^m-P**, RDV and untreated control. No transfection reagent was used. (c) Activity of **S-6^m-P** (300 nM, 21 h pre-infection treatment) was tested compared to the untreated and the RDV (10 μ M, 2 h pre-infection treatment) controls. (d) Activity of **S-6^m-P** (300 nM, 21 h pre-infection treatment) was tested against the **Ctrl.-10^m-P** (300 nM, 21 h pre-infection treatment), untreated and RDV (10 μ M, 2 h pre-infection treatment) controls. Ordinary two-way ANOVA combined with Tukey's multiple comparisons test was performed. Details about the statistical analysis are given in the materials and methods section. (e, f) SARS-CoV-2 RT-qPCR results (C_i values depicted) of two independent SARS-CoV-2-infected (variant B.1.177 (EU1)) 3D lung microtissue experiments. C_i values for the viral sgRNAs in the tissue harvest 72 h p.i. are shown. Each dot represents data from one independent well. Figure 3d shows the mean of all data depicted in Figure S3c, d for **S-6^m-P**, RDV and untreated control. No transfection reagent was used. (e) Activity of **S-6^m-P** (300 nM, 21 h pre-infection treatment) was tested compared to the untreated and the RDV (10 μ M, 2 h pre-infection treatment) controls. (f) Activity of **S-6^m-P** (300 nM, 21 h pre-infection treatment) was tested against the **Ctrl.-10^m-P** (300 nM, 21 h pre-infection treatment), untreated and RDV (10 μ M, 2 h pre-infection treatment) controls. (g) Quantitative SARS-CoV-2 RNA FISH analysis of 3D lung microtissues following SARS-CoV-2 infection (variant B.1.177 (EU1)). Each group represents data from ten HPFs from one independent experiment. (h) Histopathological analysis of uninfected and **S-6^m-P**-, **Ctrl.-10^m-P**-, RDV-pre-treated or untreated 3D lung microtissues 72 h post SARS-CoV-2 infection (variant B.1.177 (EU1)) to quantify apoptosis of epithelial cells. Bar represents mean, error bars represent SD.

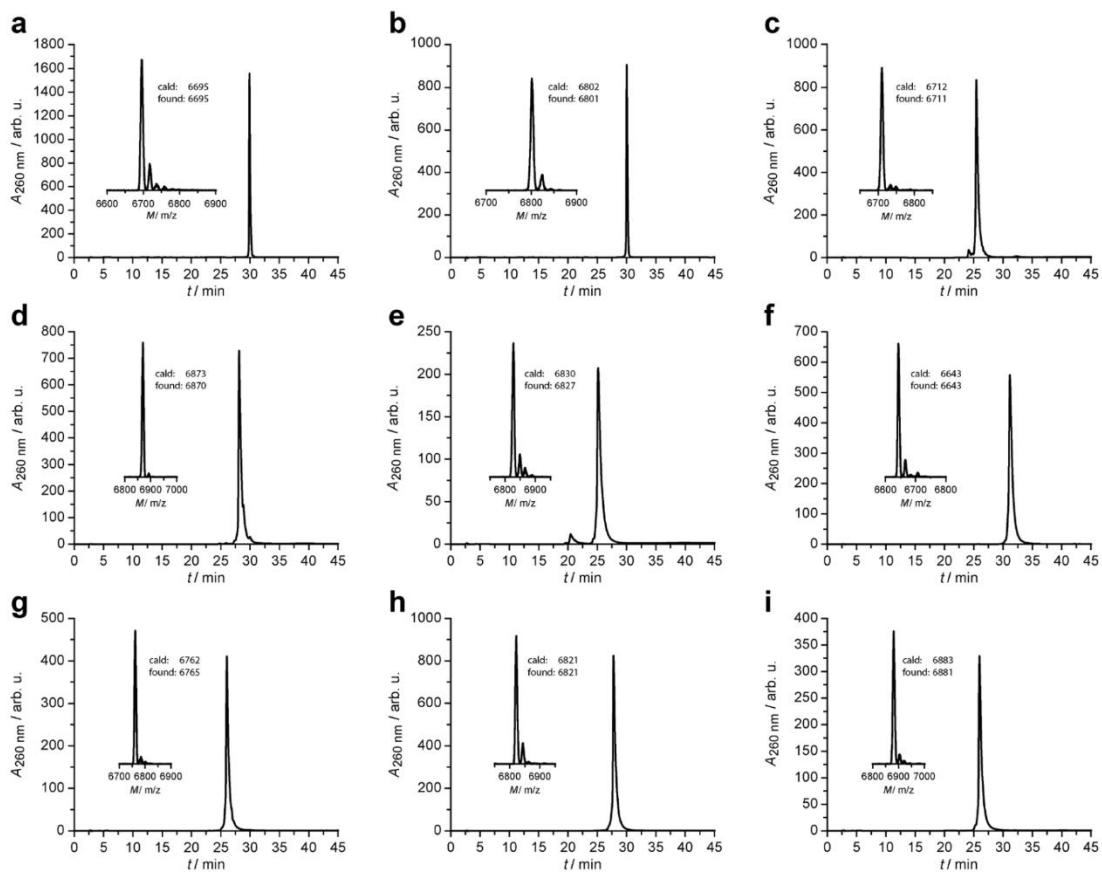


Figure S5: Analytical HPL-Chromatograms of the purified strands and the corresponding MALDI-TOF analysis. (a) **S-6^m-T* sense** (b) **S-6^m-T* antisense** (c) **S-6^m antisense** (d) **S-6^m-T* sense** (e) **S-6^m antisense** (f) **Ctrl.-10^m-T* sense** (g) **Ctrl.-10^m antisense** (h) **Ctrl.-10^m-T* sense** (i) **Ctrl.-10^m antisense**.

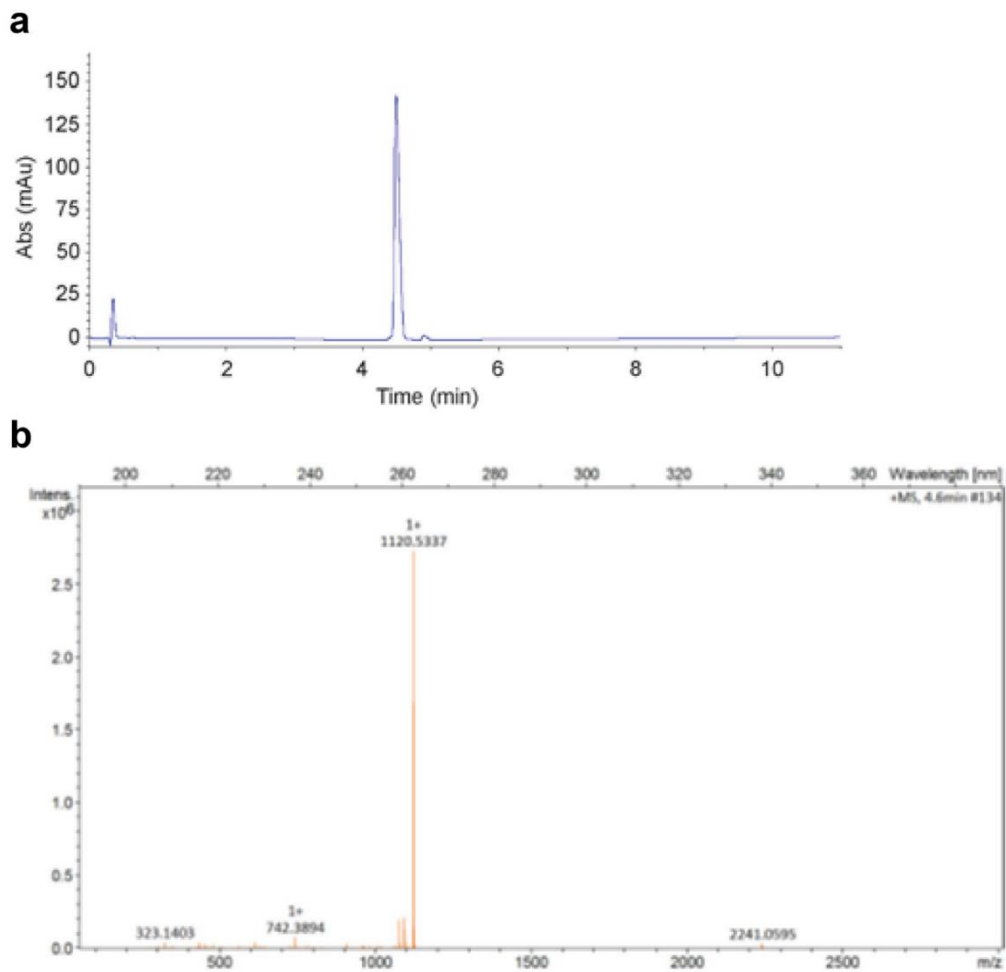


Figure S6: Purification of peptide P (N3-Deg3-CO-Tyr-Lys-Tyr-Arg-Tyr-Leu-OH). **(a)** HPL-Chromatograms of N3-Deg3-CO-Tyr-Lys-Tyr-Arg-Tyr-Leu-OH with a gradient of 40-100% of buffer b in 10 min. **(b)** ESI-MS data of N3-Deg3-CO-Tyr-Lys-Tyr-Arg-Tyr-Leu-OH.

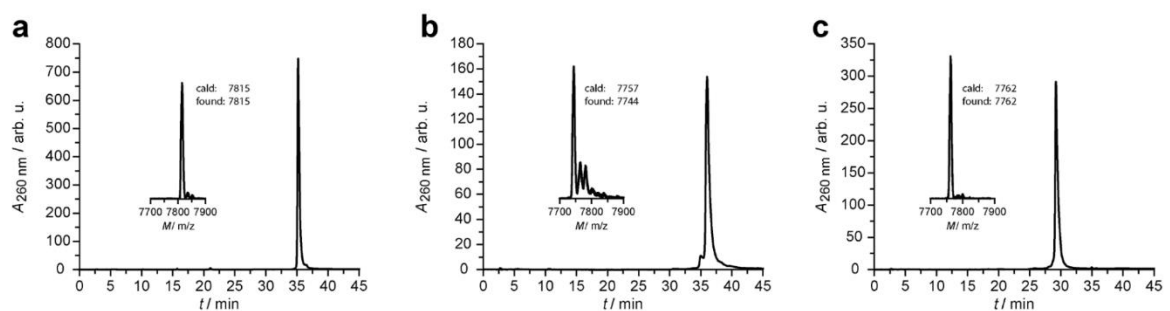


Figure S7: Analytical HPL-chromatograms of the purified click products as well as MALDI-TOF analysis. **(a)** S-6^m-P sense. **(b)** S-6^m-Alexa647 antisense. **(c)** Ctrl.-10^m-P sense.

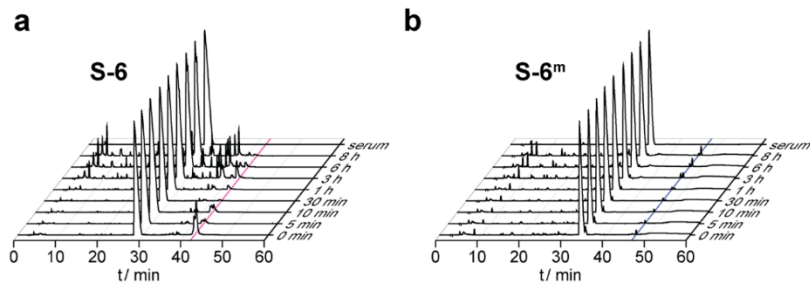


Figure S8: HPL-chromatograms of serum stability assay. (a) Serum stability assay of **S-6**. The magenta-coloured line indicates the signal of the siRNA. This area is shown in more detail in Figure 2b. (b) Serum stability assay of **S-6^m**. The blue-coloured line indicates the signal of the siRNA. This area is shown in more detail in Figure 2c.

Supporting Tables

Table S1: siRNA sequences of unmodified SARS-CoV-2 targeting siRNAs and the scrambled (non-targeting) siRNA.

siRNA	Viral RNA sequence target	Sequence (5' → 3')
L-1 sense	Leader	CCA ACC AAC UUU CGA UCU CTT
L-1 antisense		GAG AUC GAA AGU UGG UUG GTT
R-2 sense	RdRp, Nsp12	GGA CGA AGA UGA CAA UUU ATT
R-2 antisense		UAA AUU GUC AUC UUC GUC CTT
R-3 sense	RdRp, Nsp12	CAU GAA GAA ACA AUU UAU ATT
R-3 antisense		UAU AAA UUG UUU CUU CAU GTT
R-4 sense	RdRp, Nsp12	GGA AGG AAG UUC UGU UGA ATT
R-4 antisense		UUC AAC AGA ACU UCC UUC CTT
R-5 sense	RdRp, Nsp12	ACA GAU GGU ACA CUU AUG ATT
R-5 antisense		UCA UAA GUG UAC CAU CUG UTT
S-6 sense	Spike protein	UCU UAC AAC CAG AAC UCA ATT
S-6 antisense		UUG AGU UCU GGU UGU AAG ATT
S-7 sense	Spike protein	UUA CCC CCU GCA UAC CAU ATT
S-7 antisense		UAG UGU AUG CAG GGG GUA ATT
S-8 sense	Spike protein	CUC AAU UAC CCC CUG CAU ATT
S-8 antisense		UAU GCA GGG GGU AAU UGA GTT
S-9 sense	Spike protein	CUC AGG ACU UGU UCU UAC CTT
S-9 antisense		GGU AAG AAC AAG UCC UGA GTT
Ctrl.-10 sense	Non-targeting (scrambled)	ACU UAC UUG CAU CGU UCA UTT
Ctrl.-10 antisense		AUG AAC GAU GCA AGU AAG UTT

Table S2: Overview of the reporter plasmids for the dual-luciferase assay to screen the siRNA efficiencies. The listed inserted sequences are fused to the *Renilla* luciferase and the parts that are targeted by the siRNAs are marked in blue.

Plasmid name	Targeted by siRNA	Inserted sequence (5' → 3')	Viral sequence context Y/N?
A1	L-1	GTTCTTTAAGGTTTATACCTTCCCAGGTAACA AACCAACCAACTTTCG ATCTCTTGTAGATCTGTTCTCTAA	N
A2	R-2, R-3, S-7, S-8, S-9	GTCAGCTGATGCACAATCGTTTTTAAACGGGTTTGCGGTGTAAGTGCA GCCCGTCTTACACCGTGCGGCACAGGCACTAGTACTGATGTCGTATA CAGGGCTTTTGACATCTACAATGATAAAGTAGCTGGTTTTGCTAAATT CCTAAAACTAATTGTTGTCGCTTCCAAGAA AAGGACGAAGATGACAA TTTAA TTGATTCTTACTTTGTAGTTAAGAGACACACTTTCTCTAACTAC CAACATGAAGAAACAATTTATAA TTTACTTAAGGATTGTCCAGCTGTTG CTAAACATGACTTCTTTAAGTTTAGAATAGACGGTGACATGGTACCAC ATATATCAGGTJCTTGTTAACTAAACGAACAATGTTTGTGTTTTCTTG TTTTATTGCCACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATCTTACAACAGAAC TCAATTACCCCTGCATACACTAA TTCTTTACACGTGGTGTGTTATTAC CCTGACAAAGTTTTGATCCTCAGTTTTACATT CAACTCAGGACTTGT TCTTACCTTTCTTTCCAATGTTACTTGGTTCCATGCTATACATGTCTC TGGGACCAATGGTACTAAGAGGTTTGATAACCCTGTCCCTACCATTTAA TGATGGTGTGTTATTTGCTTCCACTGAGAAGTCTAACATAATAAGAGG CTGGATTTTGGTACTACTTTAGATTCCAAGACCCAGTCCCTACTTATT GTTAATAACGCTACTAATGTTGTTATTAAAGTCTGTGAATTTCAATTTT GTAATGATCCATTTTGGGTGTTTATTACCACAAAAACAACAAAAGTTG GAT	Y
A3	R-4, R-5, S-6	AAGG AAGGAAGTCTGTTGAATTAAACAGATGGTACACTTATGATTAA TCTTACAACCAAGAACTCAATTA ACTCAGGACTTGTCTTACCTT	N

Table S3: Details about the calculation of the CV50 values in Figure 1f - i. CV50 corresponds to the IC50 value. "n.a." refers to cases, where the CV50 and the 95% confidence interval (CI) could not be determined unambiguously as the cytotoxicity was too low with the applied volumes of virus inoculum. siRNAs were applied with 40 nM total concentration, 21 h prior to virus challenge.

	S-6	R-2	S-6 + R-2	Ctrl.-10
EU1 (B.1.177)				
Best-fit values				
HillSlope	0.8896	1.042	n.a.	0.4227
CV50	8.063	3.329	n.a.	0.007258
Log(CV50)	0.9065	0.5223	n.a.	-2.139
Std. Error				
HillSlope	0.1324	0.1044	n.a.	0.04065
CV50	1.273	0.3202	n.a.	0.001677
95% CI (profile likelihood)				
HillSlope	0.6576 to 1.216	0.8619 to 1.271	n.a.	0.3463 to 0.5200
CV50	6.044 to 11.88	2.725 to 4.114	n.a.	0.00447 to 0.01168
Log(CV50)	0.7813 to 1.075	0.4353 to 0.6142	n.a.	-2.350 to -1.933
Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	22	22	n.a.	22
R squared	0.8910	0.9596	n.a.	0.9396
Sum of Squares	795.6	596.4	n.a.	1423
Sy.x	6.014	5.207	n.a.	8.044
Constraints				
CV50	CV50 > 0	CV50 > 0	CV50 > 0	CV > 50
Number of points				
# of X values	24	24	24	24
# Y values analysed	24	24	24	24
Alpha VOC (B.1.1.7)				
Best-fit values				
HillSlope	n.a.	1.728	n.a.	0.7856
CV50	n.a.	12.49	n.a.	0.1598
Log(CV50)	n.a.	1.097	n.a.	-0.7963
Std. Error				
HillSlope	n.a.	0.3829	n.a.	0.07238
CV50	n.a.	1.393	n.a.	0.02105
95% CI (profile likelihood)				
HillSlope	n.a.	1.100 to 3.683	n.a.	0.6451 to 0.9767
CV50	n.a.	10.41 to 17.49	n.a.	0.1216 to 0.2117
Log(CV50)	n.a.	1.018 to 1.243	n.a.	-0.9149 to -0.6744
Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	n.a.	22	n.a.	22
R squared	n.a.	0.8574	n.a.	0.9705
Sum of Squares	n.a.	554.6	n.a.	908.0
Sy.x	n.a.	5.021	n.a.	6.424
Constraints				
CV50	CV50 > 0	CV50 > 0	CV50 > 0	CV > 50
Number of points				
# of X values	24	24	24	24
# Y values analysed	24	24	24	24
Beta VOC (B.1.351)				
Best-fit values				
HillSlope	1.335	1.051	n.a.	0.5809
CV50	12.53	3.190	n.a.	0.01571
Log(CV50)	1.098	0.5038	n.a.	-1.804
Std. Error				
HillSlope	0.2804	0.08898	n.a.	0.04608
CV50	1.882	0.2591	n.a.	0.002358
95% CI (profile likelihood)				
HillSlope	0.9158 to 1.991	0.8953 to 1.238	n.a.	0.4898 to 0.6979
CV50	9.809 to 18.71	2.689 to 3.815	n.a.	0.01152 to 0.02152
Log(CV50)	0.9916 to 1.272	0.4296 to 0.5815	n.a.	-1.938 to -1.667
Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	22	22	n.a.	22
R squared	0.8290	0.9699	n.a.	0.9710
Sum of Squares	718.1	432.3	n.a.	867.1

Sy.x	5.713	4.433	n.a.	6.278
Constraints				
CV50	CV50 > 0	CV50 > 0	CV50 > 0	CV > 50
Number of points				
# of X values	24	24	24	24
# Y values analysed	24	24	24	24
Delta VOC (B.1.617.2)				
	S-6	S-6 + R-2	S-6δ	Ctrl.-10
Best-fit values				
HillSlope	0.6885	0.8244	1.285	0.6749
CV50	0.4374	3.435	9.555	0.03284
Log(CV50)	-0.3591	0.5359	0.9802	-1.484
Std. Error				
HillSlope	0.0369	0.09183	0.1535	0.05481
CV50	0.05336	0.4456	0.8109	0.004436
95% CI (profile likelihood)				
HillSlope	0.5919 to 0.8056	0.6729 to 1.011	0.9937 to 1.657	0.5673 to 0.8173
CV50	0.3383 to 0.5693	2.625 to 4.613	8.136 to 11.75	0.02482 to 0.04374
Log(CV50)	-0.4707 to -0.2447	0.4192 to 0.6639	0.9104 to 1.070	-1.605 to -1.359
Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	22	22	22	22
R squared	0.9733	0.9386	0.9310	0.9750
Sum of Squares	672.8	776.4	363.7	820.6
Sy.x	5.530	5.941	4.066	6.107
Constraints				
CV50	CV50 > 0	CV50 > 0	CV50 > 0	CV > 50
Number of points				
# of X values	24	24	24	24
# Y values analysed	24	24	24	24

Table S4: Details about the calculation of the CV50 values in Figure 2e, f. CV50 corresponds to the IC50 value. A = 20 nM **S-6** or **S-6^m** + 0 nM **Ctrl.-10**, B = 2 nM **S-6** or **S-6^m** + 18 nM **Ctrl.-10**, C = 0.2 nM **S-6** or **S-6^m** + 19.8 nM **Ctrl.-10**, D = 0.02 nM **S-6** or **S-6^m** + 19.98 nM **Ctrl.-10**, E = 0 nM **S-6** or **S-6^m** + 20 nM **Ctrl.-10**.

	A	B	C	D	E
S-6^m treatment					
Best-fit values					
HillSlope	0.9282	0.8438	0.4413	0.3480	0.3159
CV50	15.14	9.876	0.1939	0.001238	0.005409
Log(CV50)	1.180	0.9946	-0.7125	-1.907	-2.267
Std. Error					
HillSlope	0.1201	0.07660	0.02208	0.01683	0.01982
CV50	2.280	1.037	0.02219	0.001647	0.0009914
95% CI (profile likelihood)					
HillSlope	0.7041 to 1.213	0.6881 to 1.031	0.3995 to 0.4877	0.3155 to 0.3839	0.2781 to 0.3583
CV50	11.66 to 22.51	8.100 to 12.76	0.1529 to 0.2465	0.009386 to 0.01630	0.003696 to 0.007863
Log(CV50)	1.067 to 1.352	0.9085 to 1.106	-0.8156 to -0.6081	-2.028 to -1.788	-2.432 to -2.104
Goodness of Fit					
Degrees of Freedom	22	22	22	22	22
R squared	0.9000	0.9492	0.9826	0.9800	0.9636
Sum of Squares	311.0	256.6	366.5	380.6	609.2
Sy.x	3.760	3.415	4.082	4.159	5.262
Constraints					
CV50	CV50 > 0	CV50 > 0	CV50 > 0	CV > 50	CV > 50
Number of points					
# of X values	24	24	24	24	24
# Y values analysed	24	24	24	24	24
S-6 treatment					
Best-fit values					
HillSlope	1.120	0.9597	0.3640	0.3199	0.3159
CV50	9.896	5.532	0.02813	0.007129	0.005409
Log(CV50)	0.9955	0.7429	-1.551	-2.147	-2.267
Std. Error					
HillSlope	0.1414	0.08769	0.01870	0.01681	0.01982
CV50	1.046	0.4945	0.003867	0.001084	0.0009914
95% CI (profile likelihood)					
HillSlope	0.8582 to 1.446	0.7985 to 1.153	0.3285 to 0.4032	0.2877 to 0.3554	0.2781 to 0.3583
CV50	8.131 to 12.89	4.626 to 6.747	0.02112 to 0.03746	0.005194 to 0.009744	0.003696 to 0.007863
Log(CV50)	0.9101 to 1.110	0.6652 to 0.8291	-1.675 to -1.426	-2.285 to -2.011	-2.432 to -2.104
Goodness of Fit					
Degrees of Freedom	22	22	22	22	22
R squared	0.9091	0.9571	0.9785	0.9745	0.9636
Sum of Squares	418.5	386.8	436.1	434.8	609.2
Sy.x	4.361	4.193	4.452	4.446	5.262
Constraints					
CV50	CV50 > 0	CV50 > 0	CV50 > 0	CV > 50	CV > 50
Number of points					
# of X values	24	24	24	24	24
# Y values analysed	24	24	24	24	24

Table S5: **Summary of synthesized RNA strands.** X = C8-Alkyne-dU, A_m = 2'-OMe-A, C_m = 2'-OMe-C, G_m = 2'-OMe-G, U_m = 2'-OMe-U, A_F = 2'-F-A, C_F = 2'-F-C, G_F = 2'-F-G, U_F = 2'-F-U.

siRNA	Sequence 5' → 3'
S-6^m sense	UCU UAC _m AAC CAG AAC UC _m A ATT
S-6^m sense (alkyne)	UCU UAC _m AAC CAG AAC UC _m A AXT
S-6^m antisense	UUG AGU _m UCU GGU UGU _m AAG ATT
S-6^m antisense (alkyne)	UUG AGU _m UCU GGU UGU _m AAG AXT
S-6^{fm} sense (alkyne)	U _m C _m U _m U _m A _m C _m A _F A _m C _F C _m A _F G _m A _F A _m C _F U _m C _m A _m A _m XT
S-6^{fm} antisense	U _m U _F G _F A _F G _m U _F U _m C _F U _m G _F G _m U _F U _m G _F U _m A _F A _m G _F A _m TT
Ctrl.-10^m sense (alkyne)	ACU UAC _m UUG CAU CGU UC _m A UXT
Ctrl.-10^m antisense	AUG AAC _m GAU GCA AGU _m AAG UTT
Ctrl.-10^{fm} sense (alkyne)	A _m C _m U _m U _m A _m C _m U _F U _m G _F C _m A _F U _m C _F G _m U _F U _m C _m A _m U _m XT
Ctrl.-10^{fm} antisense	A _m U _F G _F A _F A _m C _F G _m A _F U _m G _F C _m A _F A _m G _F U _m A _F A _m G _F U _m TT

Table S6: Summary of clicked RNA strands and their HPLC gradients. X = C8-Alkyne-dU, C_m = 2'-OMe-C, U_m = 2'-OMe-U.

RNA	Sequence 5' → 3'	HPLC gradient
S-6^m-P sense	UCU UAC _m AAC CAG AAC UC _m A A(X-YKYRYL)T	0_35
S-6^m-Alexa647 antisense	UUG AGU _m UCU GGU UGU _m AAG A(X-Alexa647)T	0_30
Ctrl.-10^m-P sense	ACU UAC _m UUG CAU CGU UC _m A U(X-YKYRYL)T	0_40

Table S7: List of primers for RT-qPCR. fw = forward, rev = reverse.

Primer name	Sequence (5' → 3')	Application	Reference
Spike-total_fw	GCT GGT GCT GCA GCT TAT TA	RT-qPCR (iTaq SYBR Green); viral genome and sgmRNA	[6]
Spike-total_rev	AGG GTC AAG TGC ACA GTC TA		
Leader_fw_sgmRNA	CCT TCC CAG GTA ACA AAC CAA CC	RT-qPCR (PowerUp SYBR Green); sgmRNAs	
M_rev_sgmRNA	GGT AAT AGT ACC GTT GGA ATC TGC C		
N_rev_sgmRNA	GGG TGC ATT TCG CTG ATT TTG G		
E_rev_sgmRNA	CCT GTC TCT TCC GAA ACG AAT GAG		
S_rev_sgmRNA	ACA CAC TGA CTA GAG ACT AGT GGC		
GAPDH_fw	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	RT-qPCR (PowerUp SYBR Green); human reference gene	
GAPDH_rev	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA		

References Supplementary Information

- [1] a) P. R. Wratil, N. A. Schmacke, A. Osterman, T. Weinberger, J. Rech, B. Karakoc, M. Zeilberger, J. Steffen, T. T. Mueller, P. M. Spaeth, M. Stern, M. Albanese, H. Thun, J. Reinbold, B. Sandmeyer, P. Kressler, B. Grabein, P. Falkai, K. Adorjan, V. Hornung, L. Kaderali, M. Klein, O. T. Keppler, *Infection* **2022**, *50*, 381-394; b) M. Muenchhoff, A. Graf, S. Krebs, C. Quartucci, S. Hasmann, J. C. Hellmuth, C. Scherer, A. Osterman, S. Boehm, C. Mandel, A. S. Becker-Pennrich, M. Zoller, H. C. Stubbe, S. Munker, D. Munker, K. Milger, M. Gapp, S. Schneider, A. Ruhle, L. Jocham, L. Nicolai, K. Pekayvaz, T. Weinberger, H. Mairhofer, E. Khatamzas, K. Hofmann, P. M. Spaeth, S. Bender, S. Käab, B. Zwissler, J. Mayerle, J. Behr, M. von Bergwelt-Baildon, M. Reincke, B. Grabein, C. L. Hinske, H. Blum, O. T. Keppler, *Euro. Surveill.* **2021**, *26*, 2002066; c) P. R. Wratil, M. Stern, A. Priller, A. Willmann, G. Almanzar, E. Vogel, M. Feuerherd, C. C. Cheng, S. Yazici, C. Christa, S. Jeske, G. Lupoli, T. Vogt, M. Albanese, E. Mejias-Pérez, S. Bauernfried, N. Graf, H. Mijocevic, M. Vu, K. Tinnfeld, J. Wettengel, D. Hoffmann, M. Muenchhoff, C. Daechert, H. Mairhofer, S. Krebs, V. Fingerle, A. Graf, P. Steininger, H. Blum, V. Hornung, B. Liebl, K. Überla, M. Prelog, P. Knolle, O. T. Keppler, U. Protzer, *Nat. Med.* **2022**, *28*, 496-503.

- [2] M. Muenchhoff, H. Mairhofer, H. Nitschko, N. Grzimek-Koschewa, D. Hoffmann, A. Berger, H. Rabenau, M. Wiedera, N. Ackermann, R. Konrad, S. Zange, A. Graf, S. Krebs, H. Blum, A. Sing, B. Liebl, R. Wölfel, S. Ciesek, C. Drosten, U. Protzer, S. Boehm, O. T. Keppler, *Euro Surveill.* **2020**, *25*, 2001057.
- [3] J. R. Tyson, P. James, D. Stoddart, N. Sparks, A. Wickenhagen, G. Hall, J. H. Choi, H. Lapointe, K. Kamelian, A. D. Smith, N. Prystajecy, I. Goodfellow, S. J. Wilson, R. Harrigan, T. P. Snutch, N. J. Loman, J. Quick, *bioRxiv* **2020**, 2020.09.04.283077.
- [4] T. Weinberger, J. Steffen, A. Osterman, T. T. Mueller, M. Muenchhoff, P. R. Wratil, A. Graf, S. Krebs, C. Quartucci, P. M. Spaeth, B. Grabein, K. Adorjan, H. Blum, O. T. Keppler, M. Klein, *Clin. Infect. Dis.* **2021**.
- [5] P.-A. Koenig, H. Das, H. Liu, B. M. Kümmerer, F. N. Gohr, L.-M. Jenster, L. D. J. Schiffelers, Y. M. Tesfamariam, M. Uchima, J. D. Wuerth, K. Gatterdam, N. Ruetalo, M. H. Christensen, C. I. Fandrey, S. Normann, J. M. P. Tödtmann, S. Pritzl, L. Hanke, J. Boos, M. Yuan, X. Zhu, J. L. Schmid-Burgk, H. Kato, M. Schindler, I. A. Wilson, M. Geyer, K. U. Ludwig, B. M. Hällberg, N. C. Wu, F. I. Schmidt, *Science* **2021**, *371*, eabe6230.
- [6] M. Park, J. Won, B. Y. Choi, C. J. Lee, *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 963-977.

Anhang III



Supporting Information

Efficient Tandem Copper-Catalyzed Click Synthesis of Multisugar-Modified Oligonucleotides

*A. J. Tölke, J. F. Gaisbauer, Y. V. Gärtner, B. Steigenberger, A. Holovan, F. Streshnev, S. Schneider, M. Müller, T. Carell**

Supporting Information

Efficient Tandem Cu-Catalyzed Click Synthesis of Multi-Sugar-Modified Oligonucleotides

*Annika J. Tölke, Julia F. Gaisbauer, Yasmin V. Gärtner, Barbara Steigenberger, Anna Holovan, Filipp Streshnev, Sabine Schneider, Markus Müller, Thomas Carell**

-
- [a] MSc. Annika J. Tölke, BSc. Julia F. Gaisbauer, Dr. Anna Holovan, MSc. Yasmin V. Gärtner, MSc. Filipp Streshnev, Dr. Sabine Schneider, Dr. Markus Müller, Prof. Dr. T. Carell
Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München,
Butenandtstr. 5-13, 81377 Munich, Germany
<http://www.carellgroup.de>
- [b] Dr. B. Steigenberger
Mass Spectrometry Core Facility, Max Planck Institute of Biochemistry
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, Germany

[*] Corresponding author: Thomas.Carell@lmu.de

SUPPORTING INFORMATION

Table of Contents

Table of Contents	2
General Chemistry Methods	3
Synthesis and characterization of the tandem click linker	4
Synthesis and characterization of the delivery molecules	9
Synthesis and characterization of the octadiynyl-2'-methoxyuridine-phosphoramidite	11
Synthesis and purification of oligonucleotides	14
Synthesized Oligonucleotides.....	15
Tandem click procedure	16
Tandem click procedure for the highly modified oligonucleotide	16
Clicked Oligonucleotides	16
Calibration curve	18
Quantification of tandem click reaction	19
Optimization of tandem click reaction	19
Nucleoside Click procedure	22
Trapped ion mobility spectrometry (TIMS)-TOF-Experiment.....	23
Investigation of conformational changes of Glc during click reaction	25
NMR spectra of synthesized compounds	26
References	42

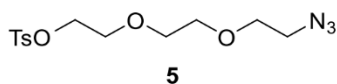
SUPPORTING INFORMATION

General Chemistry Methods

Chemicals were purchased from TCI, Sigma-Aldrich, ABCR, Carbosynth, Acros organics, Fluka and Roth without further purification. Technical solvents were purified by distillation. Solvents were of reagent grade or purified by distillation. Reactions and chromatography fractions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel F₂₅₄ TLC plates from Merck KGaA. Flash-column chromatography was either performed on Silicagel 60 (40-63 μm) silica gel from Macherey-Nagel or on a Puriflash 5.125 from Interchim using C18 silica column (PF-15RPAQ-F0012). NMR spectra were recorded on a Bruker Ascend (500 MHz), Varian Inova (400 MHz), Bruker ARX (600 MHz) or Bruker Avance III HD (800 MHz) spectrometer. ¹H NMR shifts were adjusted to the residual solvent: (CD₃)₂CO (2.05 ppm), (CD₃)₂SO (2.50 ppm), D₂O (4.79 ppm), CD₃OD (4.87 ppm), CDCl₃ (7.26 ppm). ¹³C NMR shifts were adjusted to the residual solvent: (CD₃)₂CO (206.26 ppm), (CD₃)₂SO (39.52 ppm), CD₃OD (49.0 ppm), CDCl₃ (17.2 ppm).^[1] All NMR spectra were analyzed using the software MestReNova 10.0.1 from Mestrelab Research. NMR data are reported as follows: chemical shift (multiplicity, coupling constants where applicable, number of hydrogens). Splitting is reported with the following symbols: s = singlet, d = doublet, t = triplet, dd = doublet of doublets, dt = doublet of triplets, ddd = doublet of doublets of doublets, m = multiplet. High resolution mass spectra were measured by the analytical section of the Department of Chemistry of the Ludwig-Maximilians-Universität München on the following spectrometers (ionization mode in brackets): MAT 95 (EI) and MAT 90 (ESI) from Thermo Finnigan GmbH. IR spectra were recorded on a Shimadzu IRSpirit FT-IR instrument. For click reactions and for dissolving oligonucleotides water was used in the form of ultrapure water which was purified by the water treatment system OmniaPure xs^{basic} from Stakpure. Degassing of click reaction mixtures was carried out by bubbling through with argon. For lyophilisation of aqueous solutions, the sample was frozen with liquid nitrogen and dried using a 2-4 LD plus lyophilizer from Christ.

SUPPORTING INFORMATION

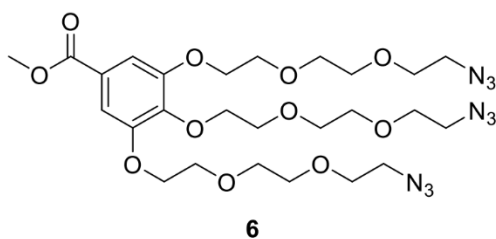
Synthesis and characterization of the tandem click linker

2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**5**)

4 (1.69 g, 10.0 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in deionized H₂O (14.6 mL). Sodium azide (1.95 g, 30.0 mmol, 3.00 eq.) was added and the mixture was stirred at 75 °C for 21 h. The solvent was evaporated, the residue was suspended in dry acetone, filtered and the filtrate was concentrated in vacuo. The colorless oil was dissolved in dry THF (55.0 mL) and triethylamine (4.60 mL, 32.7 mmol, 3.27 eq.) was added. The reaction mixture was cooled to 0 °C and a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (2.19 g, 11.5 mmol, 1.15 eq.) in dry THF (10.0 mL) was added dropwise. The ice bath was removed, and the reaction mixture was stirred at rt for 17 h. The solvent was evaporated, the residue was taken up in DCM and washed with H₂O and brine. The organic phase was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica, *i*Hex:EtOAc = 7:3) to yield **5** (2.03 g, 6.16 mmol, 62%) as a colorless oil.

R_f = 0.27 (*i*Hex:EtOAc = 7:3); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.19 – 4.14 (m, 2H), 3.72 – 3.68 (m, 2H), 3.64 (dd, *J* = 5.6, 4.6 Hz, 2H), 3.60 (s, 4H), 3.36 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H); **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 144.9, 133.2, 130.0, 128.1, 70.9, 70.8, 70.2, 69.4, 68.9, 50.8, 21.8; **HRMS** (ESI): calcd. for C₁₃H₁₉N₃O₅NaS⁺ [M+Na]⁺: 352.0938, found: 352.0949.

The data is consistent with the literature.^[2]

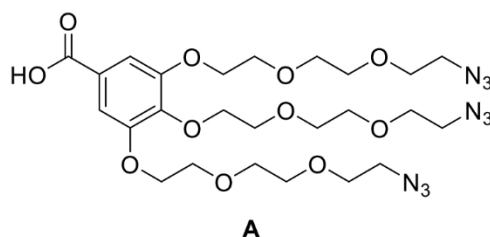
Methyl 3,4,5-tris(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoate (**6**)

5 (3.22 g, 9.78 mmol, 4.00 eq.) was dissolved in dry DMF (73 mL) and methyl gallate (450 mg, 2.44 mmol, 1.00 eq.) and K₂CO₃ (3.38 g, 24.4 mmol, 10.0 eq.) were added consecutively. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 40 h, filtrated and the solvent was evaporated. The residue was taken up in DCM and was washed with H₂O (2×) and brine. The organic phase was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica, *i*Hex:EtOAc = 3:2 → 2:3) to yield **6** (902 mg, 1.38 mmol, 56%) as a colorless oil.

R_f = 0.24 (*i*Hex:EtOAc = 2:3); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.30 (s, 2H), 4.25 – 4.18 (m, 6H), 3.90 – 3.86 (m, 7H), 3.83 – 3.80 (m, 2H), 3.77 – 3.71 (m, 7H), 3.70 – 3.60 (m, 12H), 3.38 (td, *J* = 5.1, 3.5 Hz, 5H); **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 166.7, 152.5, 142.7, 125.1, 109.2, 72.6, 71.6, 71.1, 70.9, 70.9, 70.7, 70.2, 70.2, 69.9, 69.0, 52.3, 50.8, 42.9; **HRMS** (ESI): calcd. for C₂₆H₄₅N₁₀O₁₁⁺ [M+NH₄]⁺: 673.3264, found: 673.3260.

The data is consistent with the literature.^[3]

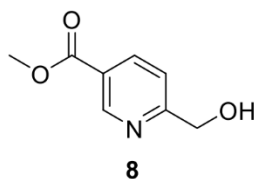
SUPPORTING INFORMATION

3,4,5-tris(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoic acid (**A**)

6 (450 mg, 686 μmol , 1.00 eq.) was dissolved in MeOH (13.7 mL) and sodium hydroxide (1 M in H₂O, 3.40 mL) was added. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 4.5 h. The solvents were evaporated, the residue was taken up in EtOAc and filtered over Amberlite IR-120 to yield **A** (382 mg, 595 μmol , 87%) as a colorless oil.

R_f = 0.22 (DCM:MeOH = 95:5); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.37 (s, 2H), 4.28 – 4.19 (m, 6H), 3.91 – 3.81 (m, 6H), 3.77 – 3.61 (m, 19H), 3.42 – 3.36 (m, 5H); **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.6, 152.5, 143.5, 124.1, 109.8, 72.6, 71.6, 71.1, 71.0, 70.9, 70.9, 70.8, 70.2, 70.2, 69.9, 69.1, 61.9, 50.8, 42.9; **HRMS** (ESI): calcd. for C₂₅H₃₉N₉O₁₁Na⁺ [M+Na]⁺: 664.2661, found: 664.2651.

The data is consistent with the literature.^[4]

Methyl 6-(hydroxymethyl)nicotinate (**8**)

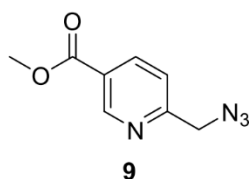
Dimethyl pyridine-2,5-dicarboxylate (**7**) (5.00 g, 25.6 mmol, 1.00 eq.) and CaCl₂ (13.4 g, 120 mmol, 4.70 eq.) were suspended in dry THF/dry MeOH (1/2, 150 mL) and cooled down to 0 °C. NaBH₄ (2.42 g, 64.0 mmol, 2.50 eq.) was added portionwise, the reaction mixture was stirred at 0 °C for 2 h. The solution was quenched with H₂O and was extracted with DCM (4 \times). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to yield **8** (3.35 g, 20.0 mmol, 78%) as a colorless solid.

R_f = 0.29 (*i*Hex:EtOAc = 1:4); **¹H NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.17 (dd, J = 2.2, 0.8 Hz, 1H), 8.30 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 7.36 (dd, J = 8.1, 0.9 Hz, 1H), 4.84 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.58 (t, J = 5.1 Hz, 1H); **¹³C NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 165.8, 163.5, 150.1, 137.9, 125.1, 120.1, 64.3, 52.6; **HRMS** (ESI): calcd. for C₈H₁₀NO₃⁺ [M+H]⁺: 168.0655; found: 168.0657.

The data is consistent with the literature.^[5]

SUPPORTING INFORMATION

Methyl 6-(azidomethyl)nicotinate (9)

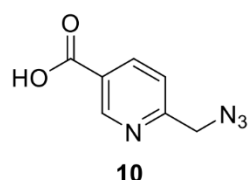


8 (3.13 g, 18.7 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in dry THF (62 mL) and triethylamine (7.80 mL, 56.1 mmol, 3.00 eq.) was added and cooled down to 0 °C. Methylsulfonyl chloride (2.20 mL, 28.1 mmol, 1.50 eq.) was added dropwise at 0 °C and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The solvent was evaporated, the residue was taken up in H₂O and extracted with DCM (3×). The combined organic layers were washed with H₂O and brine, dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The reddish oil was dissolved in THF:H₂O (1:1, 135 mL), sodium azide (6.08 g, 93.5 mmol, 5.00 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at 50 °C for 16 h. The mixture was diluted with H₂O and was extracted with DCM (3×). The combined organic layers were washed with H₂O and brine, dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica, *i*Hex:EtOAc = 4:1 → 7:3) to yield **9** (2.98 g, 15.5 mmol, 83%) as a yellowish solid.

R_f = 0.34 (*i*Hex:EtOAc = 4:1); ¹H NMR (800 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.19 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.33 (dd, *J* = 8.1, 2.2 Hz, 1H), 7.45 (dd, *J* = 8.1, 0.8 Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 3.96 (s, 3H); ¹³C NMR (201 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 165.6, 160.2, 150.9, 138.3, 125.4, 121.5, 55.6, 52.6; HRMS (EI): calcd. for C₈H₈N₄O₂⁻ [M]: 192.0653; found: 192.0656.

The data is consistent with the literature.^[5]

6-(azidomethyl)nicotinic acid (10)

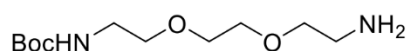


9 (500 mg, 2.60 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in MeOH (11 mL) and LiOH (1 M in H₂O, 7.8 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Acetic acid (265 μL) was added and the mixture was purified by flash column chromatography (silica, EtOAc:MeCN = 100:0 + 1% AcOH → 96:4 + 1% AcOH). The combined product fractions were concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with H₂O, extracted with DCM (3×) and with EtOAc (3×). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to yield **9** (399 mg, 2.24 mmol, 86%) as a yellowish solid.

R_f = 0.42 (EtOAc + 1% AcOH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm) = 9.11 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.40 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 8.1, 0.8 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ (ppm) = 167.6, 161.4, 151.5, 139.9, 127.6, 123.3, 56.0; HRMS (ESI): calcd. for C₇H₅N₄O₂⁻ [M-H]: 177.0418; found: 177.0416.

The data is consistent with the literature.^[5]

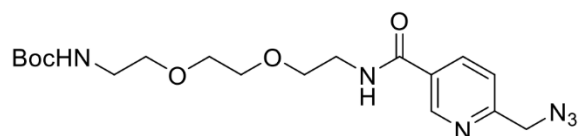
SUPPORTING INFORMATION

tert-butyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate

Under argon atmosphere, 2,2-(ethylenedioxy)bis(ethylamine) (3.70 mL, 25.0 mmol, 5.00 eq.) was dissolved in dry DCM (25 mL), cooled down to 0 °C and stirred for 30 min before di-*tert*-butyl dicarbonate (1.10 mL, 5.00 mmol, 1.00 eq.) dissolved in dry DCM (10 mL) was added dropwise (0.04 mL/min) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for additional 15 h. The solvent was reduced *in vacuo*, sat. NaHCO₃ solution was added and extracted with DCM (3×). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica, DCM:MeOH = 95:5 + 1% NH₄OH → 90:10 + 1% NH₄OH) to yield *tert*-butyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (1.00 g, 4.04 mmol, 81%) as a colorless oil.

R_f = 0.27 (DCM:MeOH = 90:10 + 1% NH₄OH); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.15 (s, 1H), 3.62 (s, 4H), 3.53 (dt, *J* = 14.9, 5.2 Hz, 4H), 3.32 (q, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.89 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 1.62 (s, 2H), 1.44 (s, 9H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 156.2, 79.3, 73.5, 70.4, 70.3, 41.8, 40.4, 28.6. HRMS (ESI): calcd. for C₁₁H₂₅N₂O₄⁺ [M+H]⁺: 249.1809; found: 249.1808.

The data is consistent with the literature.^[6]

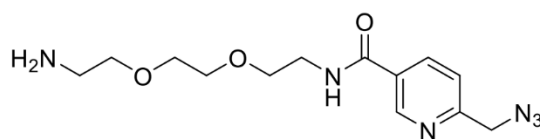
tert-butyl (2-(2-(2-(6-(azidomethyl)nicotinamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (11)

11

10 (356 mg, 2.00 mmol, 1.00 eq.) and HATU (913 mg, 2.40 mmol, 1.20 eq.) were dissolved in dry DMF (15 mL) and DIPEA (517 mg, 4.00 mmol, 2.00 eq.) was added. The mixture was stirred at rt for 30 min before *tert*-butyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (497 mg, 2.00 mmol, 1.00 eq.) dissolved in dry DMF (5 mL) was added. The reaction mixture was stirred at rt for additional 15 h. The solvent was evaporated, the residue was taken up in DCM and washed with brine. The aqueous phase was re-extracted with DCM (3×), the combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica, DCM:MeOH = 100:0 → 98:2) to yield **11** (522 mg, 1.28 mmol, 64%) as a yellowish oil.

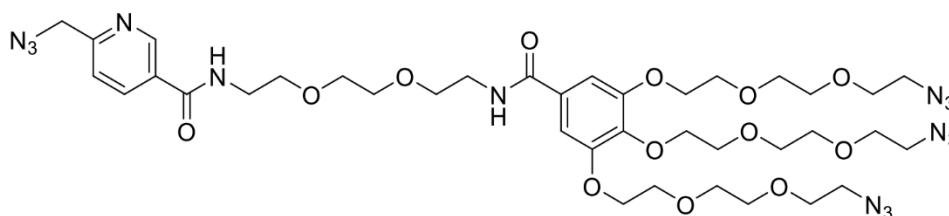
R_f = 0.27 (DCM:MeOH = 95:5); ¹H NMR (400 MHz, 50 °C, CDCl₃): δ (ppm) = 9.03 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 3.71 – 3.63 (m, 8H), 3.57 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.30 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, 50 °C, CDCl₃): δ (ppm) = 165.3, 158.6, 156.4, 148.1, 136.7, 123.0, 121.8, 79.7, 70.8, 70.5, 69.9, 55.4, 40.2, 28.6; HRMS (ESI): calcd. for C₁₈H₂₈N₆O₅Na⁺ [M+Na]⁺: 431.2013; found: 431.2008. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 403.8 (m), 411.0 (m), 419.6 (m), 431.1 (m), 435.4 (m), 441.2 (m), 448.4 (m), 458.4 (m), 477.1 (m), 485.7 (m), 507.3 (m), 557.6 (m), 628.0 (m), 734.3 (m), 757.3 (m), 778.9 (m), 846.4 (m), 971.5 (m), 1024.6 (m), 1099.4 (m), 1166.9 (m), 1248.8 (m), 1273.2 (m), 1350.8 (m), 1365.2 (m), 1391.1 (m), 1454.3 (m), 1483.1 (m), 1533.4 (s), 1598.0 (m), 1646.9 (s), 1691.4 (s), 2100.9 (s), 2869.8 (w), 2931.6 (w), 2976.2 (w), 3325.4 (w).

SUPPORTING INFORMATION

***N*-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-6-(azidomethyl)nicotinamide (B)****B**

11 (313 mg, 766 μmol , 1.00 eq.) was dissolved in dry DCM/dry MeOH (10/1, 6 mL) and HCl (4 N in dioxane, 1.90 mL, 7.66 mmol, 10.0 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 1.5 h. The solvent was evaporated to afford **B** (301 mg, 976 μmol , quantitative) as a yellowish foam.

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 10.16 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 9.31 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 9.03 (dd, J = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 8.46 (s, 2H), 7.99 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.80 (dd, J = 5.5, 3.9 Hz, 4H), 3.74 – 3.70 (m, 6H), 3.22 (q, J = 5.2 Hz, 2H); **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 161.5, 152.9, 146.6, 141.4, 133.0, 125.1, 70.6, 70.2, 67.2, 66.7, 50.4, 40.7, 39.8; **HRMS** (ESI): calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_3^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 309.1670; found: 309.1669. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 409.5 (m), 441.2 (m), 471.4 (m), 482.9 (m), 548.9 (m), 615.1 (s), 638.1 (m), 668.2 (m), 702.7 (m), 751.6 (m), 827.7 (m), 870.8 (s), 888.1 (m), 928.3 (m), 1020.3 (m), 1049.1 (m), 1083.6 (s), 1116.6 (s), 1254.6 (m), 1301.9 (s), 1347.9 (m), 1448.6 (m), 1536.2 (s), 1602.3 (m), 1639.7 (s), 1665.6 (s), 1955.8 (w), 2111.1 (s), 2491.9 (m), 2580.9 (m), 2871.3 (m), 3211.8 (w).

6-(azidomethyl)-*N*-(2-(2-(2-(3,4,5-tris(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)nicotinamide (3)**3**

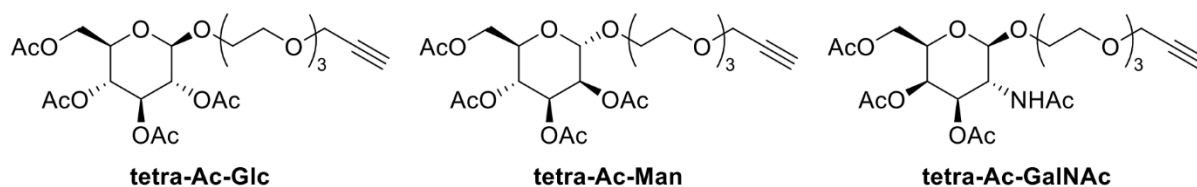
A (377 mg, 588 μmol , 1.00 eq.) and HATU (268 mg, 705 μmol , 1.20 eq.) were dissolved in dry DMF (9.9 mL) and DIPEA (205 μL , 1.18 mmol, 2.00 eq.) was added. The mixture was stirred at rt for 30 min before **B** (199 mg, 646 μmol , 1.10 eq.) dissolved in dry DMF (3.3 mL) was added. The reaction mixture was stirred at rt for additional 18 h. The solvent was evaporated, the residue was taken up in DCM and was washed with brine. The aqueous phase was re-extracted with DCM, the combined organic layers were dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica, DCM:MeOH = 100:0 \rightarrow 97:3) to yield **3** (378 mg, 406 μmol , 69%) as a yellowish oil.

R_f = 0.27 (DCM:MeOH = 95:5); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 9.02 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.19 (dt, J = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.14 – 7.04 (m, 3H), 6.90 (q, J = 5.8 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 4.18 (q, J = 5.4 Hz, 6H), 3.84 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 3.81 – 3.78 (m, 2H), 3.75 – 3.64 (m, 28H), 3.60 (td, J = 5.6, 3.2 Hz, 3H), 3.39 – 3.35 (m, 5H); **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 167.3, 165.3, 158.6, 152.6, 147.9, 141.6, 136.8, 129.8, 129.6, 121.9, 107.4, 72.5, 71.5, 71.5, 70.9, 70.90, 70.8, 70.8, 70.7, 70.6, 70.5, 70.3, 70.2, 70.0, 69.9, 69.6, 69.2, 55.2, 50.8, 50.8, 42.9, 40.0, 39.9; **HRMS** (ESI): calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{57}\text{N}_{15}\text{O}_{13}\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 954.4152; found: 954.4141. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 406.7 (m), 416.8 (m), 425.4 (m), 431.1 (m), 441.2 (m), 449.8 (m), 456.9 (m), 471.4 (m), 482.9 (m), 500.1 (m), 513.0 (m), 556.1 (m), 576.3 (m), 642.4 (m), 668.2 (m), 760.2 (m), 842.1 (m), 852.2 (m), 938.4 (m), 998.8 (m), 1100.8 (s), 1243.1 (m), 1289.1 (m), 1330.7 (m), 1376.7 (m), 1425.6 (m), 1437.1 (m), 1457.2 (m), 1497.4 (m), 1541.9 (m), 1559.2 (m), 1577.9 (m), 1638.3 (m), 1646.9 (m), 1654.1 (m), 2098.1 (s), 2322.3 (w), 2359.7 (w), 2839.6 (m), 2868.4 (m), 2917.2 (m), 2950.3 (m), 3322.5 (w).

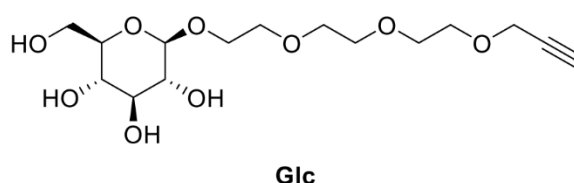
SUPPORTING INFORMATION

Synthesis and characterization of the delivery molecules

The synthesis of the precursor's **tetra-Ac-Glc**, **tetra-Ac-Man** and **tetra-Ac-GalNAc** were prepared according to literature procedures.^[7-8]



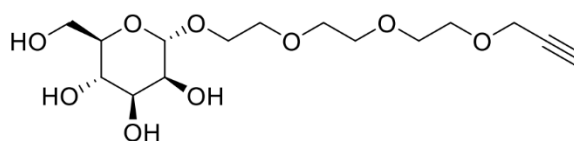
1-O-{2-[2-(2-propargyloxyethoxy)ethoxy]ethanol} D-glucopyranose (Glc)



The acetyl protected sugar **tetra-Ac-Glc** (436 mg, 840 μmol , 1.00 eq.) was dissolved in dry methanol (8.0 mL) and sodium methoxide (9.10 mg, 168 μmol , 0.20 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 30 min. The pH value of the reaction was adjusted to 7 with acetic acid and NaHCO_3 . The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by reverse-phase column chromatography (C18 silica, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$, 100:0 \rightarrow 20:80) to afford **Glc** (228 mg, 651 μmol , 77%) as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (800 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 4.30 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.19 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 4.02 (ddd, $J = 10.4, 5.1, 3.2$ Hz, 1H), 3.86 (dd, $J = 11.9, 1.8$ Hz, 1H), 3.76 – 3.72 (m, 1H), 3.72 – 3.64 (m, 11H), 3.37 – 3.34 (m, 1H), 3.30 – 3.25 (m, 2H), 3.19 (dd, $J = 9.3, 7.8$ Hz, 1H), 2.85 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H); **$^{13}\text{C NMR}$** (201 MHz, CD_3OD): δ (ppm) = 104.5, 80.6, 78.0, 77.9, 75.9, 75.1, 71.6, 71.5, 71.5, 71.3, 70.1, 69.7, 62.8, 59.0; **HRMS** (ESI): calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NaO}_9^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 373.1469, found: 373.1478.

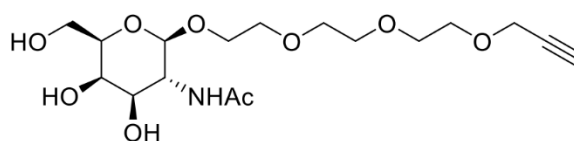
SUPPORTING INFORMATION

1-O-{2-[2-(2-propargyloxyethoxy)ethoxy]ethanol} D-mannopyranose (Man)**Man**

The acetyl protected sugar **tetra-Ac-Man** (446 mg, 860 μmol , 1.00 eq.) was dissolved in dry methanol (8.5 mL) and sodium methoxide (9.30 mg, 172 μmol , 0.20 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 30 min. The pH value of the reaction was adjusted to 6 with acetic acid and NaHCO_3 . The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by reverse-phase column chromatography (C18 silica, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$, 100:0 \rightarrow 20:80) to afford **Man** (234 mg, 66.8 μmol , 78%) as a colorless oil.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ (ppm) = 4.90 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 4.26 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 3.98 (dt, J = 3.0, 1.4 Hz, 1H), 3.92 – 3.87 (m, 2H), 3.85 – 3.82 (m, 1H), 3.79 – 3.63 (m, 14H), 2.91 (tt, J = 2.3, 1.0 Hz, 1H); **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, D_2O): δ (ppm) = 100.6, 79.9, 76.6, 73.4, 71.1, 70.6, 70.3, 70.2, 70.1, 69.3, 67.4, 67.0, 61.6, 58.6; **HRMS** (ESI): calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NaO}_9^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 373.1469, found: 373.1479.

The data is consistent with the literature.^[9]

1-O-{2-[2-(2-propargyloxyethoxy)ethoxy]ethanol}-2-acetamido-2-deoxy-D-galactopyranose (GalNAc)**GalNAc**

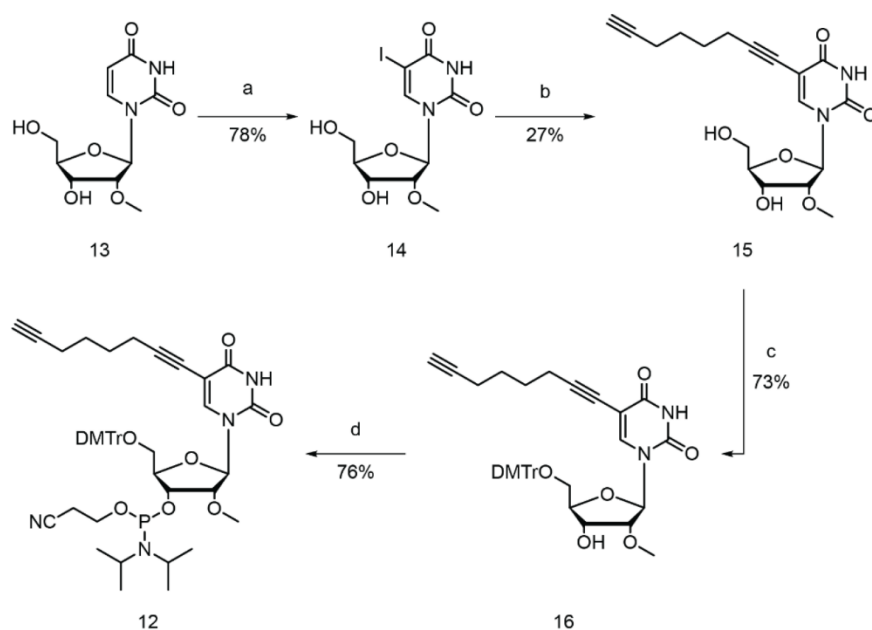
The acetyl protected sugar **tetra-Ac-GalNAc** (769 mg, 1.49 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in dry methanol (15 mL) and sodium methoxide (337 mg, 6.24 mmol, 4.20 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 2 h. The pH value of the reaction was adjusted to 6 with HCl (2 M in H_2O). The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by reverse-phase column chromatography (C18 silica, $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$, 100:0 \rightarrow 20:80) to afford **GalNAc** (370 mg, 945 μmol , 64%) as a colorless solid.

$^1\text{H NMR}$ (800 MHz, D_2O): δ (ppm) = 4.51 (dd, J = 8.5, 1.1 Hz, 1H), 4.25 (dd, J = 2.7, 0.9 Hz, 2H), 4.03 – 3.99 (m, 1H), 3.93 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 10.8, 8.5 Hz, 1H), 3.83 – 3.75 (m, 5H), 3.73 – 3.66 (m, 12H), 2.90 – 2.89 (m, 1H), 2.05 – 2.03 (m, 3H); **$^{13}\text{C NMR}$** (201 MHz, D_2O): δ (ppm) = 174.7, 101.5, 79.3, 75.9, 75.1, 71.1, 69.7, 69.7, 69.6, 69.4, 68.8, 68.6, 67.8, 61.0, 57.9, 52.4, 22.2; **HRMS** (ESI): calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{NNaO}_9^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 414.1740, found: 414.1729.

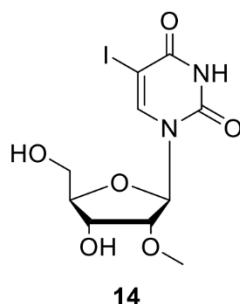
The data is consistent with the literature.^[8]

SUPPORTING INFORMATION

Synthesis and characterization of the octadiynyl-2'-methoxyuridine-phosphoramidite



Scheme S1. Synthesis of the octadiynyl-2'-methoxyuridine-phosphoramidite **12**. Reagents and conditions: (a) I₂, CAN, MeCN, 80 °C, 4 h; (b) CuI, Pd(PPh₃)₄, octa-1,7-diyne, DMF, rt, 48 h; (c) DMTrCl, DMAP, Pyridine, rt, 18 h; (d) CED-Cl, DIPEA, DCM, rt, 3 h.

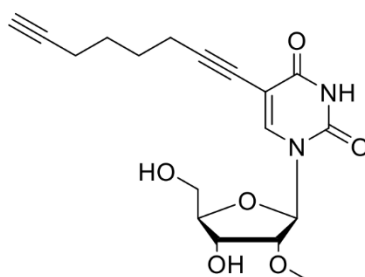
5-Iodo-2'-O-methyluridine (**14**)

2'-O-Methyluridine (500 mg, 1.94 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in dry MeCN (32 mL). Iodine (295 mg, 1.16 mmol, 0.60 eq.) and ammonium cerium(IV) nitrate (531 mg, 968 μ mol, 0.50 eq.) were added, the reaction mixture was stirred at 80 °C for 4 h and was cooled to -10 °C. The resulting precipitate was filtered and washed with MeCN (2 \times) and H₂O (2 \times) to yield **14** (583 mg, 1.52 mmol, 78%) as a colorless solid.

¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ (ppm) = 11.69 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 5.78 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 5.30 (t, J = 4.6 Hz, 1H), 5.13 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 4.11 (q, J = 5.5 Hz, 1H), 3.85 (dt, J = 5.5, 2.6 Hz, 1H), 3.79 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 3.70 (ddd, J = 12.2, 4.5, 2.8 Hz, 1H), 3.57 (ddd, J = 12.1, 4.4, 2.5 Hz, 1H), 3.38 (s, 3H); **¹³C NMR** (126 MHz, (CD₃)₂SO): δ (ppm) = 160.5, 150.1, 144.9, 86.6, 84.8, 83.0, 69.3, 67.8, 59.7, 57.6; **HRMS** (ESI): calcd. for C₁₀H₁₄IN₂O₆⁺ [M+H]⁺: 384.9891; found: 384.9890. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 403.8 (m), 425.4 (m), 528.8 (s), 582.0 (s), 626.6 (s), 758.8 (m), 765.9 (m), 781.8 (m), 872.3 (m), 942.8 (m), 964.3 (m), 1023.2 (m), 1041.9 (m), 1072.1 (s), 1082.1 (s), 1107.9 (s), 1138.2 (m), 1187.0 (m), 1266.1 (m), 1345.1 (m), 1404.0 (m), 1437.1 (m), 1599.5 (m), 1655.5 (s), 1685.7 (m), 2805.2 (w), 2831.0 (w), 2928.7 (w), 2943.1 (w), 3052.3 (w), 3075.3 (w), 3168.7 (w), 3381.4 (w), 3460.5 (w).

SUPPORTING INFORMATION

5-(Octa-1,7-diynyl)-2'-O-methyluridine (15)

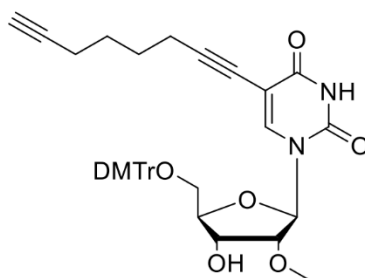


15

14 (490 mg, 1.28 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in dry DMF (6.4 mL). CuI (48.6 mg, 255 μ mol, 0.20 eq.), Pd(PPh₃)₄ (147 mg, 128 μ mol, 0.10 eq.) and octa-1,7-diyne (271 mg, 2.55 mmol, 2.00 eq.) were added and the reaction mixture was stirred at rt for 48 h. The solvent was evaporated, the residue was taken up in EtOAc and washed with H₂O (2 \times) and brine (2 \times). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica, DCM:MeOH = 97:3 \rightarrow 91:9) to yield **15** (76.0 mg, 210 μ mol, 27%) as a yellowish oil.

R_f = 0.47 (DCM:MeOH = 90:10); ¹H NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ (ppm) = 11.60 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 5.82 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 5.22 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 5.13 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 4.11 (dt, J = 6.3, 5.1 Hz, 1H), 3.85 (dt, J = 5.4, 2.8 Hz, 1H), 3.81 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 3.68 (ddd, J = 12.1, 5.0, 2.9 Hz, 1H), 3.57 (ddd, J = 12.1, 4.8, 2.8 Hz, 1H), 3.37 (s, 3H), 2.76 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 2.40 – 2.36 (m, 2H), 2.19 (td, J = 6.7, 2.6 Hz, 2H), 1.57 (dtd, J = 6.3, 4.1, 3.5, 2.2 Hz, 4H); ¹³C NMR (126 MHz, (CD₃)₂SO): δ (ppm) = 161.7, 149.5, 142.5, 99.0, 93.0, 86.3, 84.9, 84.2, 82.8, 72.9, 71.3, 67.9, 60.0, 57.5, 27.2, 27.0, 18.2, 17.2; HRMS (ESI): calcd. for C₁₈H₂₁N₂O₆⁻ [M-H]: 361.1405; found: 361.1399. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 497.2 (m), 528.8 (m), 559.0 (m), 589.2 (s), 622.2 (m), 658.1 (s), 767.3 (s), 776.0 (s), 957.0 (m), 1005.9 (m), 1060.5 (s), 1079.2 (m), 1106.5 (s), 1141.0 (m), 1191.3 (m), 1247.3 (m), 1260.3 (m), 1270.3 (m), 1392.5 (m), 1408.3 (m), 1434.1 (m), 1455.7 (m), 1674.1 (s), 2240.3 (w), 2868.3 (w), 2940.2 (w), 3069.5 (w), 3244.9 (m), 3262.1 (m), 3365.6 (w), 3467.6 (w).

5-(Octa-1,7-diynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-methyluridine (16)



16

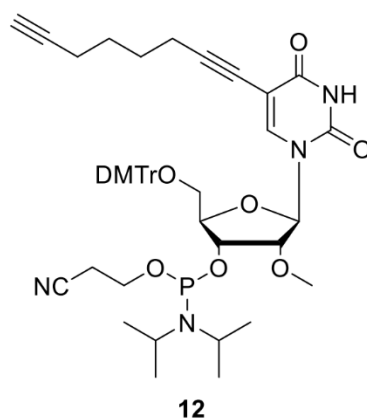
15 (78.0 mg, 215 μ mol, 1.00 eq.) was dissolved in dry pyridine (2.2 mL) and DMAP (2.60 mg, 21.5 μ mol, 0.10 eq.) was added. The mixture was cooled down to 0 $^{\circ}$ C, 4,4'-dimethoxytrityl chloride (109 mg, 323 μ mol, 1.50 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at rt for 18 h. The reaction was quenched by addition of MeOH and the solvents were evaporated. After purification by flash column chromatography (silica, DCM:MeOH = 100:0 + 0.1% pyridine \rightarrow 98:2 + 0.1% pyridine) and co-lyophilization from benzene, **16** (104 mg, 156 μ mol, 73%) was obtained as a yellowish foam.

R_f = 0.26 (DCM:MeOH = 95:5); ¹H NMR (500 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) = 7.99 (s, 1H), 7.57 – 7.51 (m, 2H), 7.46 – 7.39 (m, 4H), 7.37 – 7.30 (m, 3H), 7.28 – 7.22 (m, 1H), 6.93 – 6.88 (m, 4H), 5.94 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.53 (td, J = 6.6, 5.2 Hz, 1H), 4.09 (ddt, J = 9.4, 7.2, 3.8 Hz, 3H), 3.80 (s, 6H), 3.55 (s, 3H), 3.47 (dd, J = 10.9, 3.9 Hz, 1H), 3.38 (dd, J = 10.9, 2.1 Hz, 1H), 2.80 – 2.76 (m, 1H), 2.31 (t, J =

SUPPORTING INFORMATION

2.7 Hz, 1H), 2.09 (tt, $J = 7.1, 2.9$ Hz, 4H), 1.51 – 1.29 (m, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ (ppm) = 161.8, 159.3, 150.0, 145.6, 142.0, 136.5, 136.3, 130.6, 130.6, 128.6, 128.4, 127.2, 113.7, 113.7, 100.7, 93.7, 88.1, 87.1, 84.3, 84.1, 84.1, 72.7, 69.7, 69.6, 63.2, 58.4, 55.2, 28.1, 27.9, 19.0, 17.9; **HRMS** (ESI): calcd. for $\text{C}_{39}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 687.2677; found: 687.2666. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 584.8 (m), 704.1 (m), 827.7 (m), 1001.6 (w), 1033.2 (m), 1066.3 (m), 1087.8 (m), 1116.6 (m), 1176.9 (m), 1250.2 (s), 1276.1 (m), 1299.1 (m), 1445.6 (m), 1457.1 (m), 1508.9 (m), 1608.0 (m), 1695.7 (s), 2836.7 (w), 2933.0 (m), 3071.0 (w), 3185.9 (w), 3292.3 (w).

5-(Octa-1,7-diynyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphino)-2'-O-methyluridine (12**)**



16 (95.0 mg, 143 μmol , 1.00 eq.) was dissolved in dry DCM (1.4 mL), DIPEA (100 μL , 572 μmol , 4.00 eq.) was added and the solution was cooled down to 0 $^\circ\text{C}$. 2-Cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphor-amidite (800 μL , 357 μmol , 2.50 eq.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at rt for 3 h. The reaction was diluted with sat. NaHCO_3 solution and extracted with DCM (3 \times). The combined organic layers were dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. After purification by flash column chromatography (silica, $\text{EtOAc}:\textit{n}\text{Hex} = 1:1 + 0.1\%$ pyridine) and co-lyophilization from benzene, **12** (94.0 mg, 109 μmol , 76%) was obtained as a colorless solid.

$^{31}\text{P NMR}$ (202 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ (ppm) = 149.95, 149.90; **HRMS** (ESI): calcd. for $\text{C}_{48}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_9\text{P}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 865.3936; found: 865.3939.

SUPPORTING INFORMATION

Synthesis and purification of oligonucleotides

All canonical and modified phosphoramidites were obtained from *Sigma-Aldrich* (Bz-A-CE, Dmf-G-CE, Ac-C-CE, U-CE, 2'-OMe-Bz-A-CE and 2'-OMe-Ac-C-CE) and *Baseclick* (C8-Alkyne-dU-CEP). RNA oligonucleotides (**Table S1**, **Figure S1**) were synthesized on a 2 μ mol scale using High Load Glen UnySupport™ as solid support using an RNA automated synthesizer (*Applied Biosystems 394 DNA/RNA Synthesizer*) with standard phosphoramidite chemistry. Oligonucleotides were synthesized in DMT-OFF mode using DCA as deblocking agent in CH_2Cl_2 , Activator 42® as activator in MeCN, Ac_2O as capping reagent in pyridine/THF and I_2 in pyridine/ H_2O or DDTT (0.05 M) in pyridine/acetonitrile (3/2) as oxidizer/sulfurizer. The cleavage and deprotection of the CPG bound RNA oligonucleotides were performed with $\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{aq.})}/\text{NH}_2\text{Me}_{(\text{aq.})}$ (1/1, 1 mL) at 65 °C for 60 min. The supernatant was transferred, and the beads were washed with water (3 x 0.2 mL). The combined aqueous solutions were evaporated at 35 °C under reduced pressure using a SpeedVac concentrator. For partially modified strands the residue was subsequently heated in a solution of triethylamine trihydrofluoride (98% in triethylamine, 125 μ L) in DMSO (100 μ L) at 65 °C for 1.5 h. Upon cooling in an ice bath, the oligonucleotides were precipitated by adding NaOAc (3.0 M in H_2O , 25 μ L) and *n*-BuOH (1 mL). The resulting suspension was vortexed and kept at -80 °C for 30 min. After the centrifugation at 4 °C for 1 h, the supernatant was removed, and the remaining oligonucleotide pellet was lyophilized. The oligonucleotides were further purified by semi-preparative reverse-phase HPLC using an *Agilent Technologies 1260 Infinity II* System with a *G7114A* detector equipped with the column *VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18ec* from *Macherey Nagel*. A flow rate of 5 mL/min was applied with a gradient of 0-30% of buffer B in 45 min for the purifications (0-40% for highly modified strands). The following buffer system was used: buffer A: 100 mM NEt_3/HOAc , pH 7.0 in H_2O and buffer B: 100 mM NEt_3/HOAc pH 7.0 in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 20/80. The purified oligonucleotides were analyzed by analytical RP-HPLC on an *Agilent Technologies 1260 Infinity II* System with a *G7165A* detector equipped with the column *EC 250/4 Nucleodur 100-3 C18ec* from *Macherey Nagel* using a flow rate of 1 mL/min, a gradient of 0-30% of buffer B in 45 min (0-40% for highly modified strands). The extinction coefficients of the oligonucleotides were calculated using the software OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) from *Integrated DNA-Technologies*. For oligonucleotides containing non-canonical bases, the extinction coefficients were assumed to be identical to those containing only canonical counterparts. The structural integrity of the synthesized oligonucleotides was analysed by MALDI-TOF mass measurement for which the synthesized oligonucleotide was desalted on a 0.025 μ m VSWP filter from *Millipore*, co-crystallized in a 3-hydroxypicolinic acid matrix and measured on an *Autoflex II* from *Bruker*.

SUPPORTING INFORMATION

Synthesized Oligonucleotides

Table S1. Summary of synthesized oligonucleotides. Am = 2'-OMe-A, Cm = 2'-OMe-C, Gm = 2'-OMe-G, Um = 2'-OMe-U, Af = 2'-F-A, Cf = 2'-F-C, Gf = 2'-F-G, dT = thymidin, s = phosphorothioate, X = C8-Alkyne-dU, Xm = C8-Alkyne-2'-OMe-U.

Oligonucleotide	Sequence (5'→3')
ORN 1-sense	CCA UGAm GAA GUA UGA CAmA CXdT
ORN 1-antisense	GUU GUCm AUA CUU CUCm AUG GdTdT
ORN 2-sense	GCC AUCm AAC GAU AAG UGmA AXdT
ORN 2-antisense	UUC ACUm UAU CGU UGAm UGG CdTdT
ORN 3-sense	Cms Ums Am Gm Am Cm Cf Um Gf Um dT Um Um Gm Cm Um Um Um Um Gm Xm
ORN 3-antisense	Ams Cfs Am Af Af Af Gm Cf Am Af Am Af Cm Af Gm Gf Um Cf Um Am Gms Ams Am

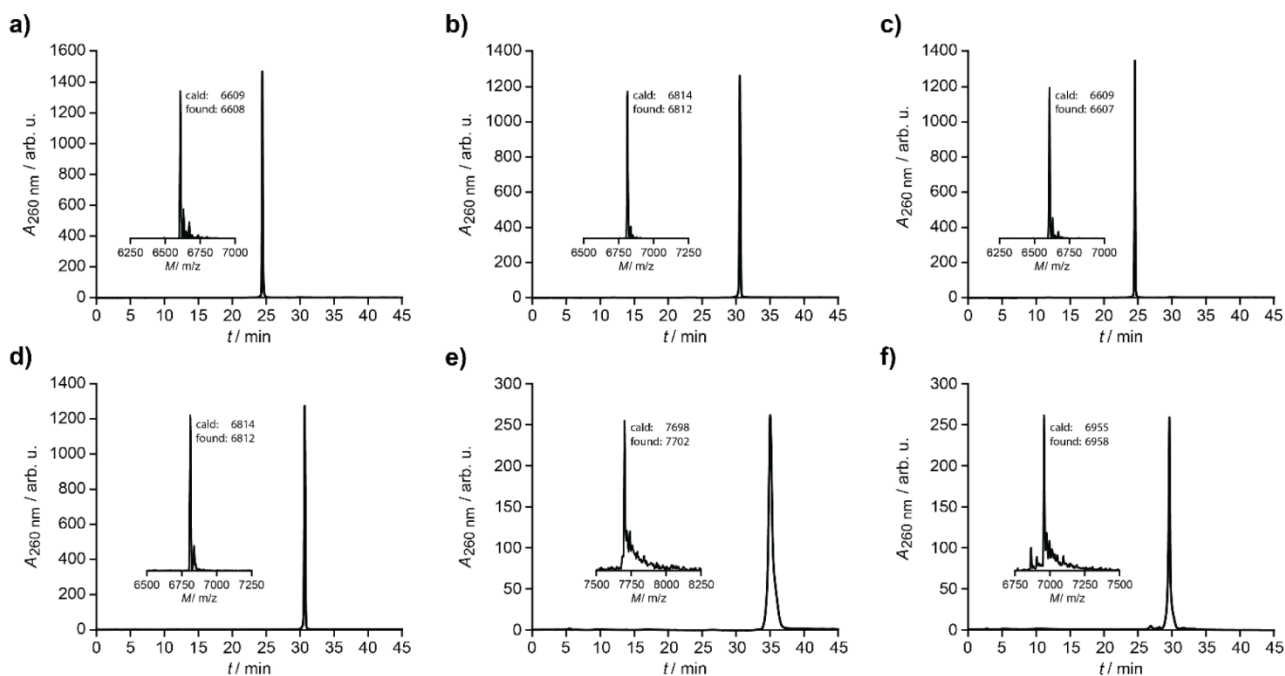


Figure S1. HPL-chromatograms and MALDI-TOF mass spectra of the purified Oligonucleotides. (a) ORN 1-antisense (b) ORN 1-sense (c) ORN 2-antisense (d) ORN 2-sense (e) ORN 3-antisense (f) ORN 3-sense.

SUPPORTING INFORMATION

Tandem click procedure

To a solution of the oligonucleotide (4.0 mM in H₂O, 5.0 μL) the azide-linker solution (20 mM in DMSO, 2.5 μL, 2.5 eq.), CuSO₄ (50 mM in 100 mM THPTA solution in H₂O, 5.0 μL) and ascorbate (50 mM in H₂O, 10 μL) were added. The reaction mixture was degassed with argon and thoroughly shaken at 25 °C for 30 min. Then the sugar-alkyne solution (50 mM in DMSO, 8.0 μL, 20 eq.), CuSO₄ (50 mM in 100 mM THPTA solution in H₂O, 5.0 μL) and ascorbate (50 mM in H₂O, 10 μL) were added. The reaction mixture was degassed with argon and thoroughly mixed at 25 °C for 1 h. The reaction was monitored by MALDI-TOF. After the addition of EDTA (50 mM, 20 μL), the crude mixtures were purified by reversed-phase HPLC. The click products were analysed by analytical reversed-phase HPLC and MALDI-TOF (**Table S2, Figure S2a-e**).

Analytical reversed-phase HPLC for purification and analytics was performed at 60 °C with a gradient of 0-40% of buffer B in 45 min.

Tandem click procedure for the highly modified oligonucleotide

To a solution of oligonucleotide **ORN 3-sense** (4.0 mM in H₂O, 5.0 μL) the azide-linker solution (20 mM in DMSO, 1.2 μL, 1.2 eq.), CuBr·Me₂S (50 mM in 100 mM THPTA solution in DMSO/H₂O (v/v = 1/1), 5.0 μL) and ascorbate (50 mM in H₂O, 5.0 μL) were added. The reaction mixture was degassed with argon and thoroughly shaken at 25 °C for 30 min. Then the sugar-alkyne solution (50 mM in DMSO, 3.9 μL, 9.8 eq.), CuBr·Me₂S (50 mM in 100 mM THPTA solution in DMSO/H₂O (v/v = 1/1), 5.0 μL) and ascorbate (50 mM in H₂O, 5.0 μL) were added. The reaction mixture was degassed with argon and thoroughly mixed at 25 °C for 1 h. The reaction was monitored by MALDI-TOF. After the addition of EDTA (50 mM, 20 μL), the crude mixture was purified by reversed-phase HPLC. The click product was analysed by analytical reversed-phase HPLC and MALDI-TOF (**Table S2, Figure S2g**).

Analytical reversed-phase HPLC for purification and analytics was performed at 60 °C with a gradient of 0-35% of buffer B in 45 min.

Clicked Oligonucleotides

Table S2. Summary of clicked oligonucleotides. Am = 2'-OMe-A, Cm = 2'-OMe-C, Gm = 2'-OMe-G, Um = 2'-OMe-U, Cf = 2'-F-C, Gf = 2'-F-G, dT = thymidin, s = phosphorothioate, X(3xSugar) = C8-Alkyne-dU + Linker + 3x Sugar, Xm(3xSugar) = C8-Alkyne-2'-OMe-U + Linker + 3x Sugar.

Oligonucleotide	Sequence (5'→3')
ORN 1-sense-3xGlc	CCA UGAm GAA GUA UGA CAmA CX(3xGlc)dT
ORN 2-sense-3xGlc	GCC AUCm AAC GAU AAG UGmA AX(3xGlc)dT
ORN 1-sense-3xMan	CCA UGAm GAA GUA UGA CAmA CX(3xMan)dT
ORN 2-sense-3xMan	GCC AUCm AAC GAU AAG UGmA AX(3xMan)dT
ORN 1-sense-3xGalNAc	CCA UGAm GAA GUA UGA CAmA CX(3xGalNAc)dT
ORN 2-sense-3xGalNAc	GCC AUCm AAC GAU AAG UGmA AX(3xGalNAc)dT
ORN 3-sense-3xGalNAc	Cms Ums Am Gm Am Cm Cf Um Gf Um dT Um Um Gm Cm Um Um Um Um Gm Xm(3xGalNAc)

SUPPORTING INFORMATION

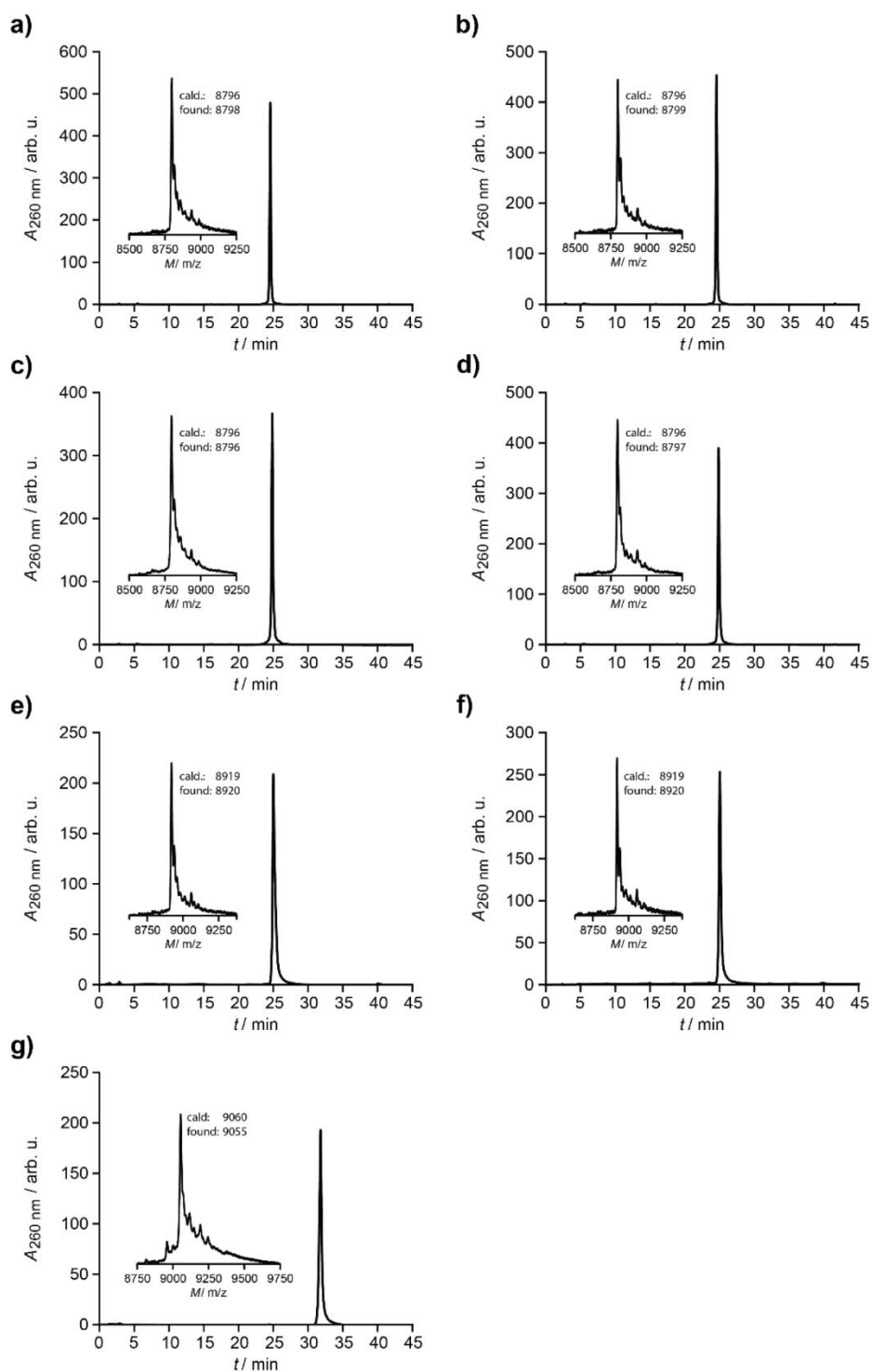


Figure S2. HPL-chromatograms and MALDI-TOF mass spectra of the clicked and purified Oligonucleotides. (a) ORN 1-sense-3xGlc (b) ORN 2-sense-3xGlc (c) ORN 1-sense-3xMan (d) ORN 2-sense-3xMan (e) ORN 1-sense-3xGalNAc (f) ORN 2-sense-3xGalNAc (g) ORN 3-sense-3xGalNAc.

SUPPORTING INFORMATION

Calibration curve

Oligonucleotides **ORN 1-sense**, **ORN 2-sense** and **ORN 3-sense** were used for the development of HPLC calibration curves (Figure S3, Table S3). Separate stock solutions of the oligonucleotides were prepared in ddH₂O (1 mM). Separate standard solutions containing 10; 8; 6; 4; 2 and 1 nmol of **ORN 1-sense** and **ORN 2-sense** (6, 4, 2, 1 and 0.5 nmol for **ORN 3-sense**) were prepared in a final volume of 100 μ L. The standard solutions were injected in an analytical HPLC equipped with a C18 column and using buffers A and B (gradient for **ORN 1-sense** and **ORN 2-sense**: 0-40% of B in 45 min at 60 °C; gradient for **ORN 3-sense**: 0-35% of B in 45 min at 60 °C; flow rate = 1 mL/min). The absorbance was monitored at 260 nm and 290 nm and the areas of the chromatographic peaks were determined by integration of the HPL-chromatograms. The plot of the chromatographic area (a.u.) versus the amount (nmol) of each oligonucleotide followed a linear relationship.

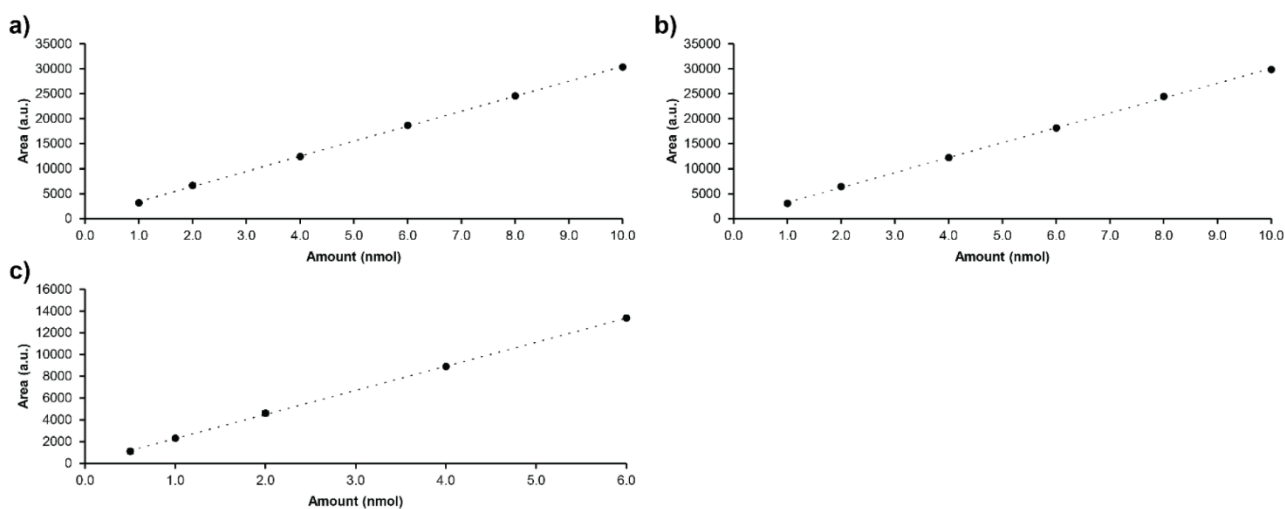


Figure S3. Chromatographic area (a.u.) vs. amount (nmol) of (a) **ORN 1-sense**, (b) **ORN 2-sense** and (c) **ORN 3-sense**. The line shows the fit of the data to a linear regression equation. Error bars are standard deviations from three independent experiments.

Table S3. Calibration curves ($y = mx + n$) obtained by HPLC analyses of **ORN 1-sense**, **ORN 2-sense** and **ORN 3-sense** and calculated extinction coefficients of **ORN 1-sense**, **ORN 2-sense** and **ORN 3-sense** using the OligoAnalyzer Version 3.0 from Integrated DNA Technologies.

Oligonucleotide	Slope, m [nmol^{-1}]	Intercept, n	r^2	ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]
ORN 1-sense	3009.4	400.2	0.9997	215700
ORN 2-sense	2983.1	259.84	0.9996	216300
ORN 3-sense	2213.9	67.874	0.9998	195400

SUPPORTING INFORMATION

Quantification of tandem click reaction

The yield of tandem click reactions was determined using the corresponding calibration curves at 290 nm (Table S4). The areas of the chromatographic peaks were determined by integration. The product is defined as one oligonucleotide and three sugar molecules attached to one linker. The byproduct consists of two oligonucleotides and two sugar molecules attached to one linker.

Table S4. Determined yields of various tandem click reactions via the corresponding calibration curve.

Oligonucleotide	Integrated Area [a.u.]		Yield [%]	
	Product	Byproduct	Product	Byproduct
ORN 1-sense-3xGlc	56087.9	4208.6	92.5	2.8
	48039.6	3035.92	79.2	1.9
ORN 2-sense-3xGlc	51490.1	6330.50	85.9	4.9
	48770.4	5914.28	81.3	4.5
ORN 1-sense-3xMan	54230.2	3773.86	89.4	2.5
	49160.0	3091.01	81.0	1.9
ORN 2-sense-3xMan	48843.1	7221.80	81.4	5.6
	47658.8	5708.96	79.4	4.3
ORN 1-sense-3xGalNAc	59090.4	4060.37	97.5	2.7
	53269.6	3457.29	87.8	2.2
ORN 2-sense-3xGalNAc	51163.0	6166.93	85.3	4.7
	48992.3	4772.49	81.7	3.6
ORN 3-sense-3xGalNAc	33141.9	4391.90	74.7	4.8
	35160.4	3287.98	79.3	3.6

Optimization of tandem click reaction

To investigate the influence of the Cu⁺ concentration on the tandem click reaction yield three CuSO₄ stock solutions were prepared: 25 mM CuSO₄, 50 mM CuSO₄, 100 mM CuSO₄. The ratio between CuSO₄ and THPTA as well as to ascorbate was kept constant. The tandem click procedure was followed and after completion the reaction mixture was directly injected into the analytical HPLC. The areas of the chromatographic peaks were determined by integration and the ratio was calculated (Table S5, Figure S4).

Table S5. Influence of CuSO₄ concentration on the product/byproduct ratio of the tandem click reaction.

Oligonucleotide	CuSO ₄ stock solution	Integrated Area [a.u.]		Ratio [%]	
		Product	Byproduct	Product	Byproduct
ORN 2-sense-3xGalNAc	25 mM	23356.3	4111.43	91.9	8.1
	50 mM	51163.0	6166.93	94.3	5.7
	100 mM	23685.3	982.314	98.0	2.0

SUPPORTING INFORMATION

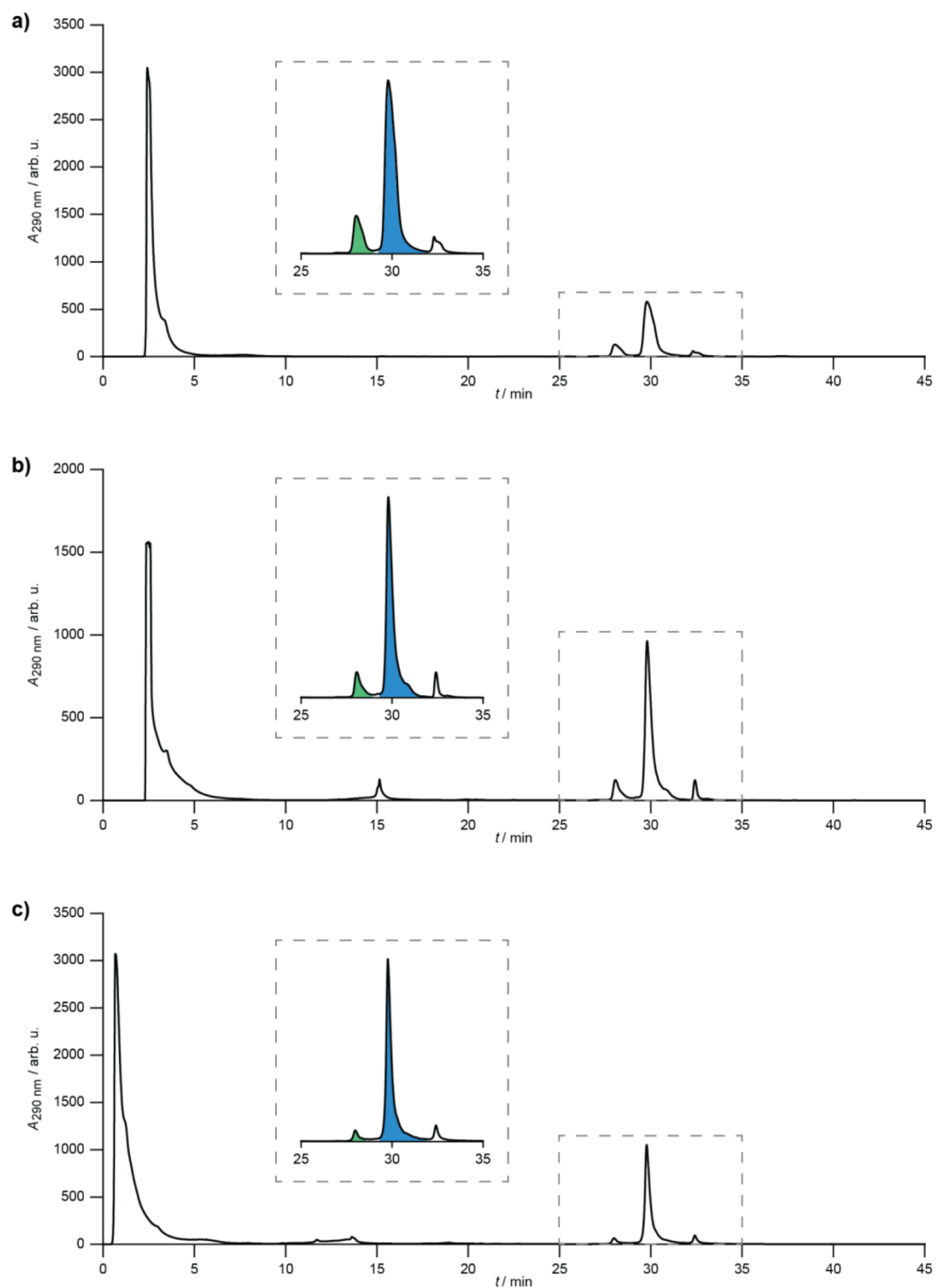


Figure S4. Crude HPL-chromatograms of the tandem click reaction towards ORN 2-sense-3xGalNAc with (a) 25 mM, (b) 50 mM and (c) 100 mM CuSO_4 stock solutions at 290 nm. The signal that could be assigned to the product ORN 2-sense-3xGalNAc is highlighted in blue there as the signal corresponding to the byproduct was marked in green. The reagents elute within the first five minutes.

SUPPORTING INFORMATION

In addition, the influence of the Cu^+ concentration on the yield of the tandem click reaction for oligonucleotide **ORN 3-sense** was determined for two different concentrations: 50 mM $\text{CuBr}\cdot\text{Me}_2\text{S}$, 100 mM $\text{CuBr}\cdot\text{Me}_2\text{S}$. The ratio between $\text{CuBr}\cdot\text{Me}_2\text{S}$ and THPTA as well as to ascorbate was kept constant. The tandem click procedure for highly modified oligonucleotides was followed and after completion the reaction mixture was directly injected into the analytical HPLC. The areas of the chromatographic peaks were determined by integration and the ratio was calculated (**Table S6, Figure S5**).

Table S6. Influence of $\text{CuBr}\cdot\text{Me}_2\text{S}$ concentration on the product/byproduct ratio of the tandem click reaction for highly modified oligonucleotides.

Oligonucleotide	CuBr·Me ₂ S stock solution	Integrated Area [a.u.]		Ratio [%]	
		Product	Byproduct	Product	Byproduct
ORN 3-sense-3xGalNAc	50 mM	33141.9	4391.90	93.8	6.2
	100 mM	37111.8	3667.52	95.3	4.7

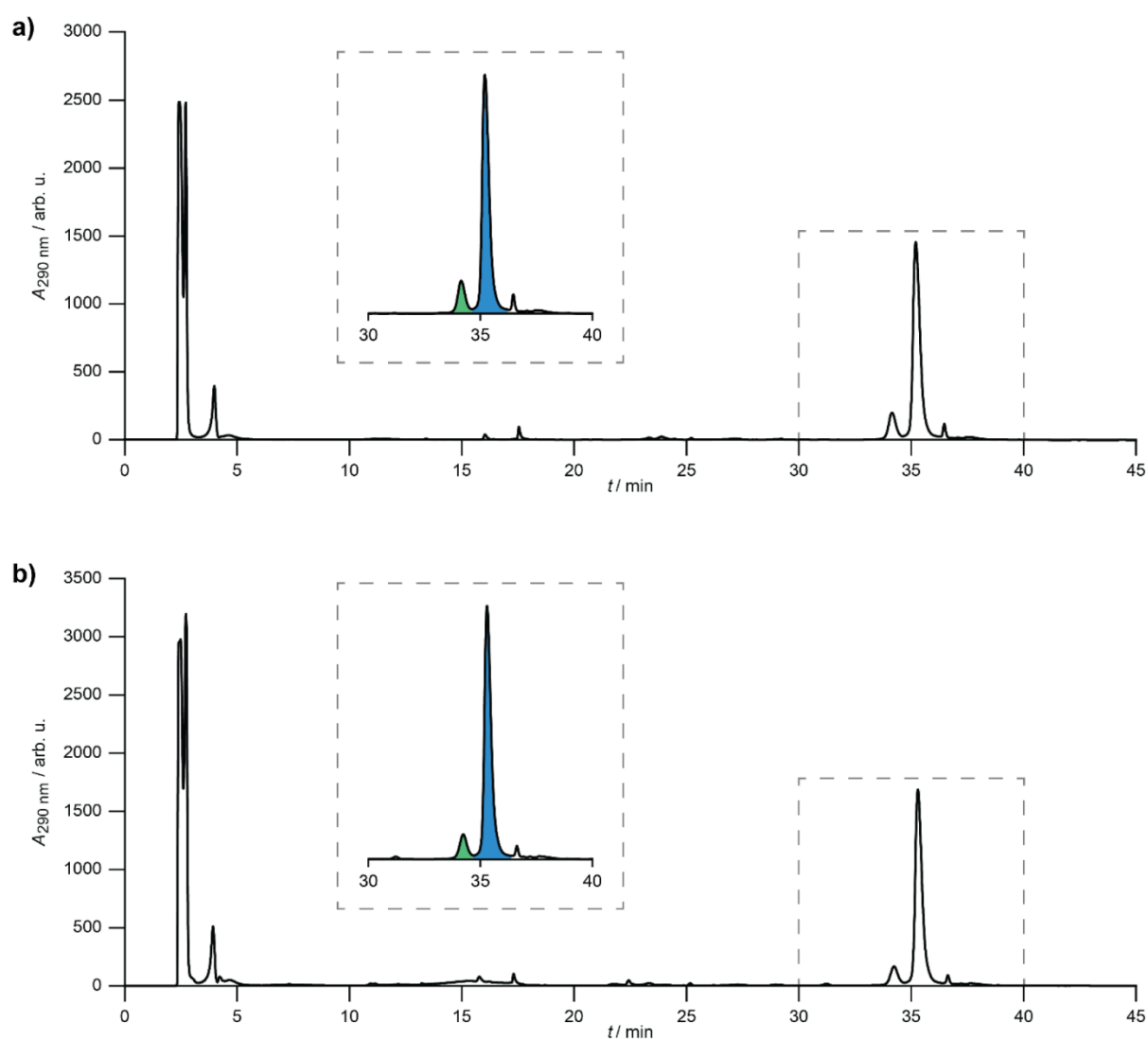


Figure S5. Crude HPL-chromatograms of the tandem click reaction towards **ORN 3-sense-3xGalNAc** with (a) 50 mM and (b) 100 mM $\text{CuBr}\cdot\text{Me}_2\text{S}$ stock solutions at 290 nm. The signal that could be assigned to the product **ORN 3-sense-3xGalNAc** is highlighted in blue there as the signal corresponding to the byproduct was marked in green. The reagents elute within the first five minutes.

SUPPORTING INFORMATION

Nucleoside Click procedure

The experiment was performed in accordance with the conditions of the tandem click (S16). To a solution of the 5-(octa-1,7-diyne)-2'-*O*-methyluridine nucleoside (4.0 mM in DMSO, 6.90 mL) the azide-linker solution (20 mM in DMSO, 3.45 mL, 2.5 eq.), CuSO₄ (50 mM in 100 mM THPTA solution in H₂O, 6.90 mL) and ascorbate (50 mM in H₂O, 13.8 mL) were added. The reaction mixture was degassed with argon and thoroughly shaken at 25 °C for 30 min. The reaction was quenched by the addition of EDTA (50 mM in H₂O, 27.6 mL) and the salts were removed through extraction with DCM (4 x 40 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated. The crude was taken up in H₂O and lyophilized to remove residues of DMSO. Only the unreacted linker **3** was removed by reverse-phase column chromatography (C18 silica, H₂O:MeCN, 100:0 → 45:55). The linker **3**, the crude mixture and the final crude were analyzed by ¹H NMR (**Figure S6**). The shift of the signal at 4.52 ppm to 5.65 ppm (final crude in red) indicates the full conversion to one product. The downfield shift of the picolyl-CH₂ signal (4.52 ppm) of linker **3** indicates that only the picolyl azide reacts with the nucleoside.

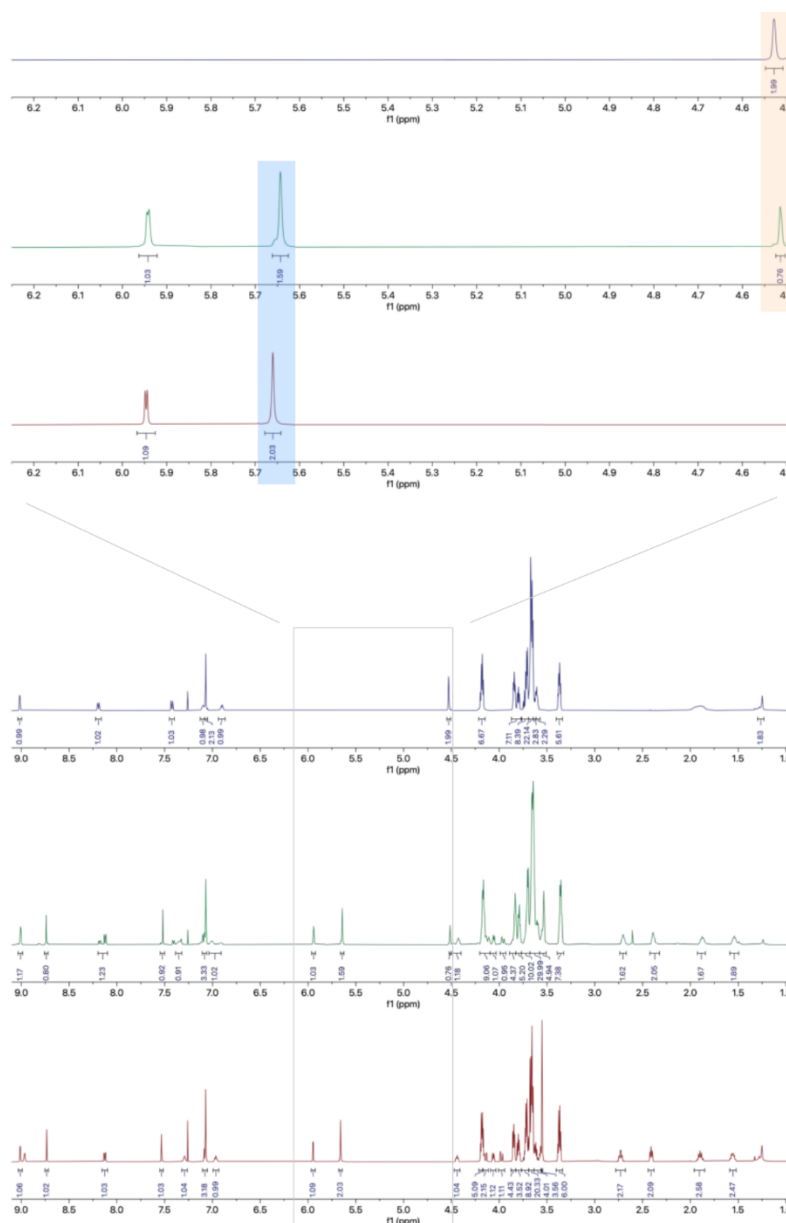


Figure S6. ¹H NMR spectra of linker **3** (blue), the crude mixture (green) and the final fraction (red). The picolyl-CH₂ group of the linker **3** before (orange) and after (blue) the click reaction are highlighted.

SUPPORTING INFORMATION

Trapped ion mobility spectrometry (TIMS)-TOF-Experiment

A TIMS-TOF-Experiment was carried out to investigate the regioselectivity of the click reaction between the oligonucleotide **ORN 2-sense** and the picolyl azide of linker **3**. The lyophilized RNA strands were dissolved in 100 μ L of MS-grade water and diluted 1:100 in ammonium acetate buffer (150 mM, pH 7.5). RNA-strands were then directly infused into a timsTOF Pro mass spectrometer (Bruker) using a syringe pump (flow rate 20-30 μ L/min). Parameters for the ESI source were as followed: The capillary voltage was set to 4500 V, the nebulizer was set to 5.0 bar, dry gas was enabled to 5 L/min and the dry temperature was set to 220 $^{\circ}$ C. Tims was enabled and the inverse ion mobility $1/K_0$ was set to 0.6 – 1.8 Vs cm^{-2} . Data was recorded in positive mode. MS averaging was set to higher than 1x, the ramp time was set to 100 ms or higher and the mass range was focused on the region of interest (between 1000 to 1500 m/z depending on the RNA strand).

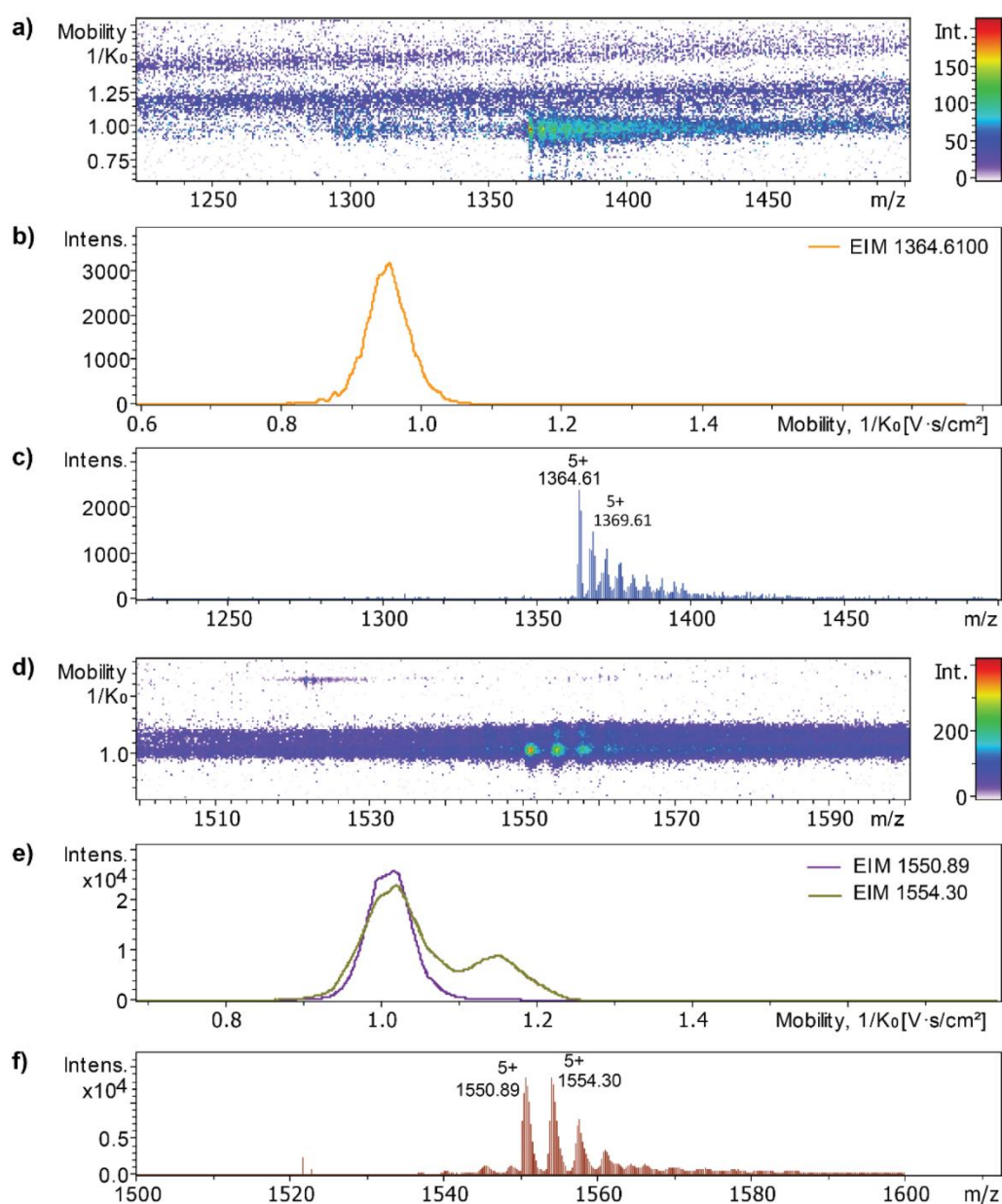


Figure S7. Analysis of the initial click reaction of **ORN 2-sense** and linker **3** by trapped ion mobility MS. Heat maps of (a) **ORN 2-sense** and (d) **ORN 2-sense + 3**. (b), (e) Extracted ion mobilogram, plotting the signal intensity at 1364 Da (**ORN 2-sense** (b)), 1550 Da and 1554 Da (**ORN 2-sense + 3** (e)) against ion mobility ($1/K_0$). (c), (f) Mass spectra at the ion mobility values of 0.95 (**ORN 2-sense** (c)), 1.15 and 1.019 (**ORN 2-sense + 3** (f)).

SUPPORTING INFORMATION

First, the starting material **ORN 2-sense** was measured as a reference by trapped ion mobility spectrometry. The data shows one mobility with a mass of 1364 Da (**Figure S7a-c**). In contrast, **ORN 2-sense** conjugated to linker **3** shows two different mobilities in the heat map (**Figure S7d**). The dominating species with a mobility of $1/K_0 = 1.019$ can be identified as the desired conjugate by its mass of 1550 Da (**Figure S7e-f** (purple line)). The second species with a mobility of $1/K_0 = 1.15$ and a mass of 1554 Da correlates to the ammonium adduct of the desired conjugate **ORN 2-sense + 3** (**Figure S7e** (brown line)). It was assumed that **ORN 2-sense + 3** is formed under the click condition and can adopt two different conformations in the presence of ammonium ions (**Figure S8**) and therefore shows two different mobilities.

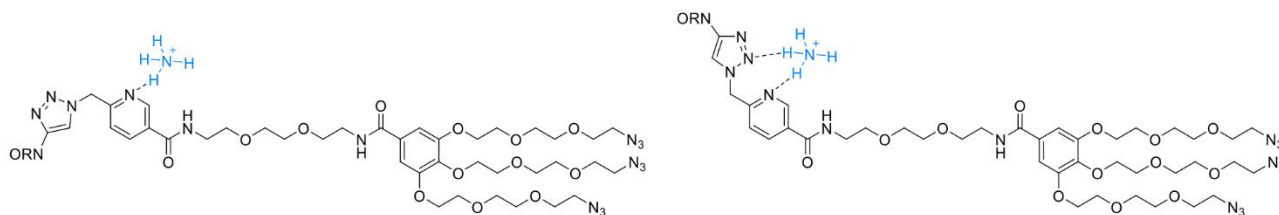


Figure S8. Possible conformational isomers of linker **3** in solution containing ammonium ions.

SUPPORTING INFORMATION

Investigation of conformational changes of Glc during click reaction

The stability and the influence of the CuAAC reagents on the carbohydrates was investigated using **Glc** as an example. To test the stability, **Glc** was dissolved in DMSO (20 mM) and stored for one month at -20 °C. After lyophilization a ^1H NMR measurement was performed showing no degradation or anomerisation (**Figure S9**).

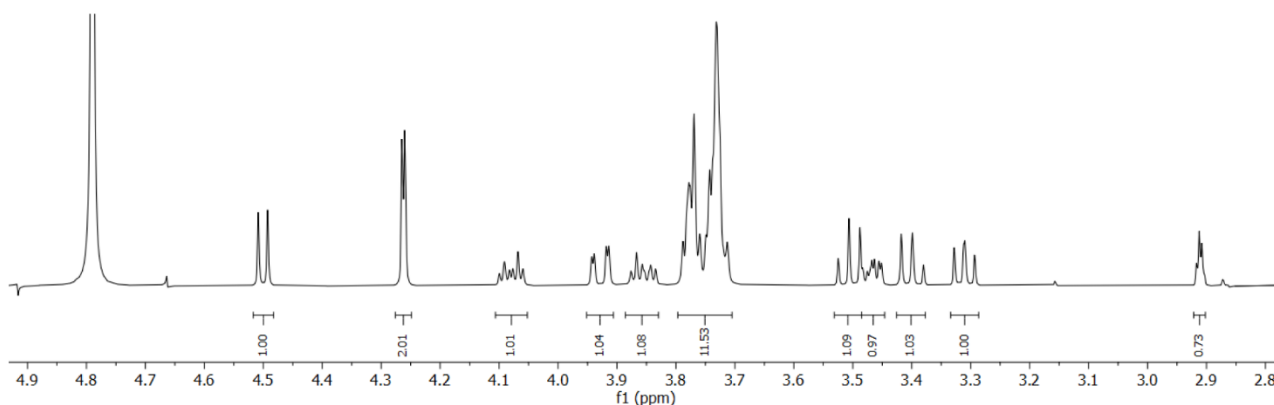


Figure S9. ^1H NMR spectra of **Glc** stored at -20 °C for one month.

To investigate whether *O*-glycosidic anomeric interconversion occurs during the click reactions, **Glc** was incubated under the tandem click reaction conditions. The glucose-alkyne solution (50 mM in DMSO, 286 μL), CuSO_4 (50 mM in 100 mM THPTA solution in H_2O , 179 μL) and ascorbate (50 mM in H_2O , 358 μL) were added into a reaction vessel and the reaction mixture was degassed with argon and thoroughly mixed at 25 °C for 1 h. Afterwards the reaction was immediately desalted using a *Sep-Pak*[®] from *Waters*. For equilibration, the cartridge was washed with MeCN (10 mL), MeCN/100 mM NaCl (1/1, 10 mL) and 100 mM NaCl (10 mL). The reaction was diluted with 100 mM NaCl (5 mL), loaded onto the cartridge, and washed with H_2O (10 mL). Elution was achieved by adding elution buffer (35% MeCN, 35% MeOH, 30% H_2O). After removing the solvents using vacuum centrifugation and lyophilization a ^1H NMR measurement was performed (**Figure S10**). The ^1H NMR spectra shows that the duplet signal corresponding to the anomeric center is converted into two duplets due to the click reaction. The coupling constant of both duplets is identical (7.9 Hz), this indicates that the **Glc** undergoes a conformational change by sugar puckering and not by anomeric interconversion.

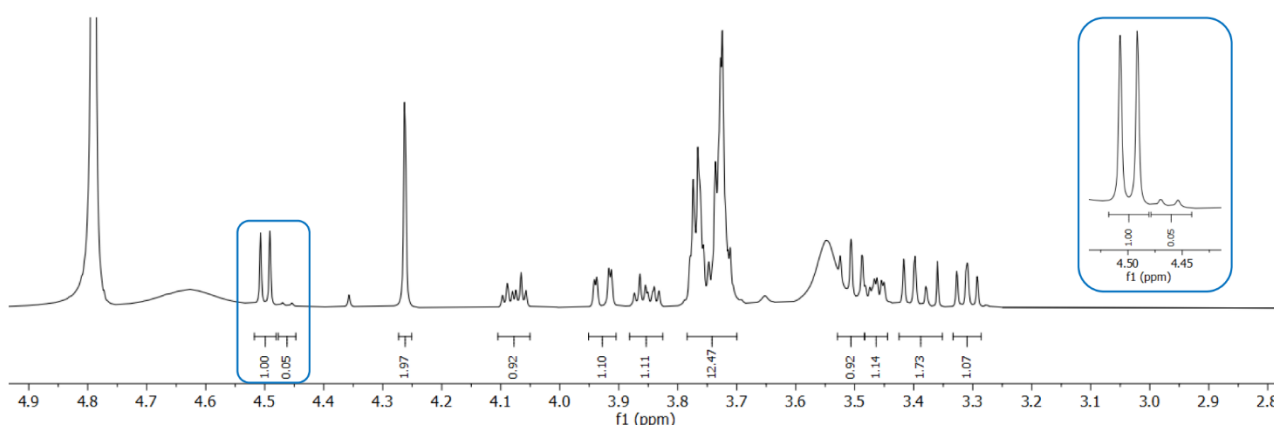
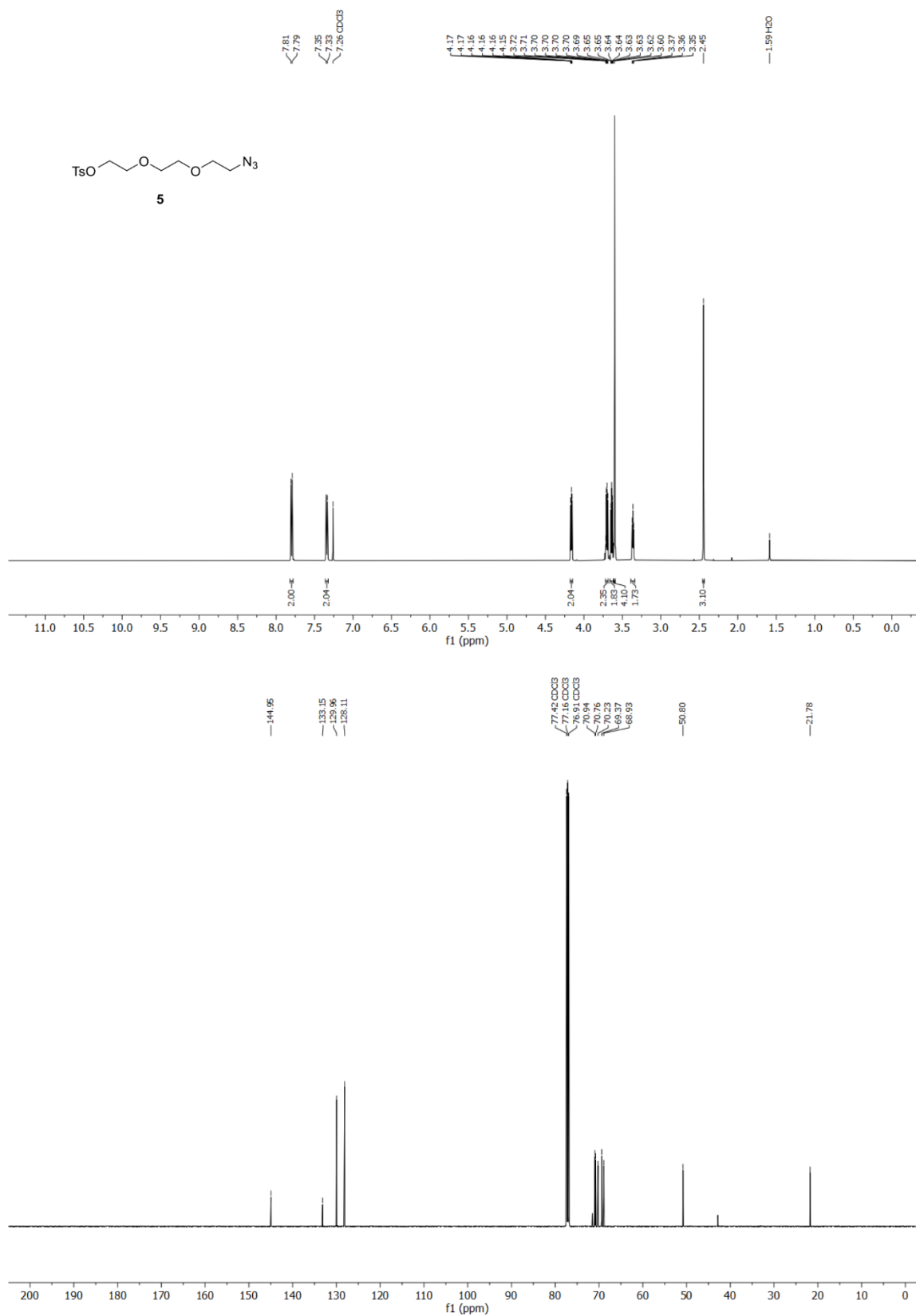


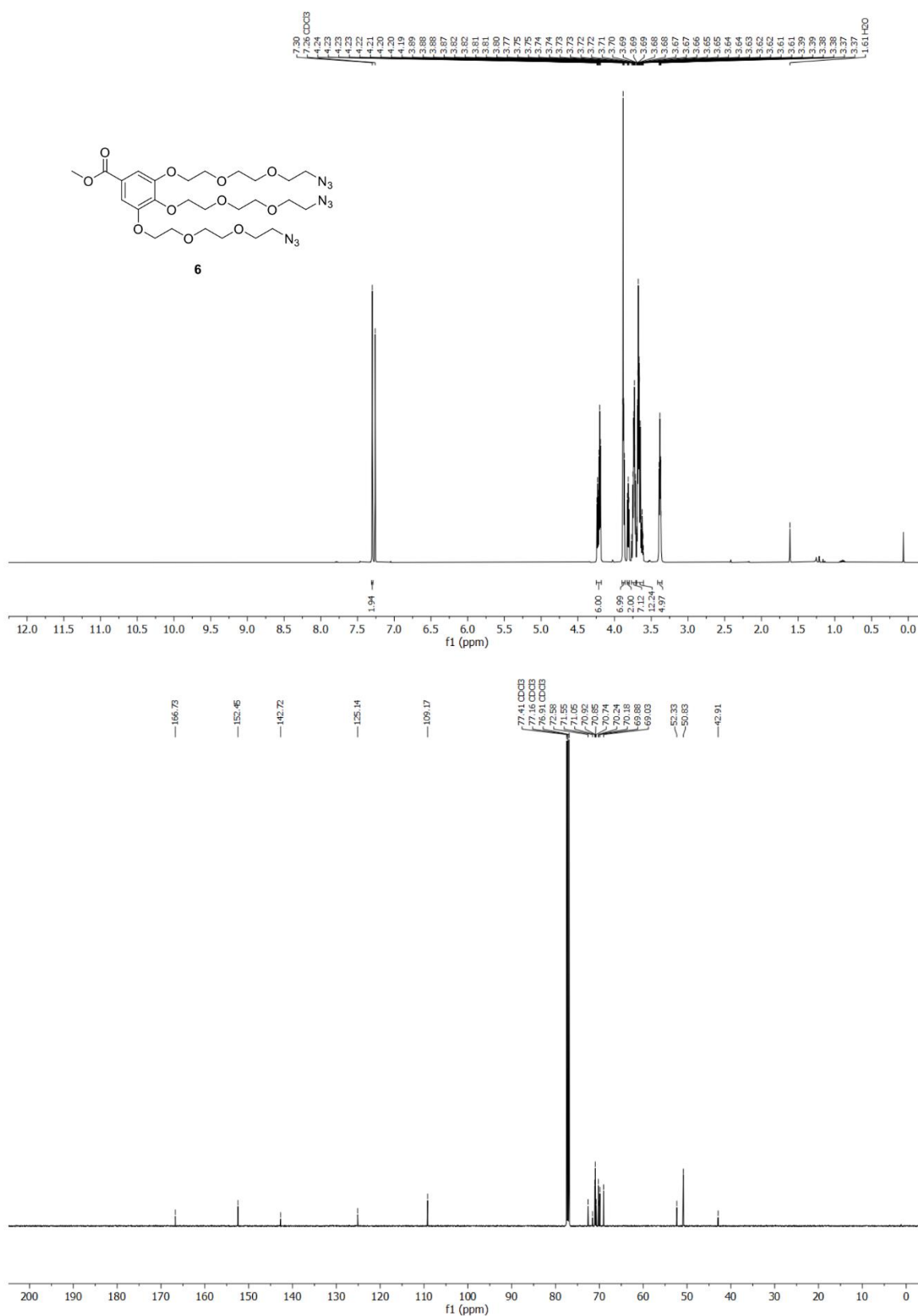
Figure S10. ^1H NMR spectra of **Glc** under the entire tandem click reaction conditions.

SUPPORTING INFORMATION

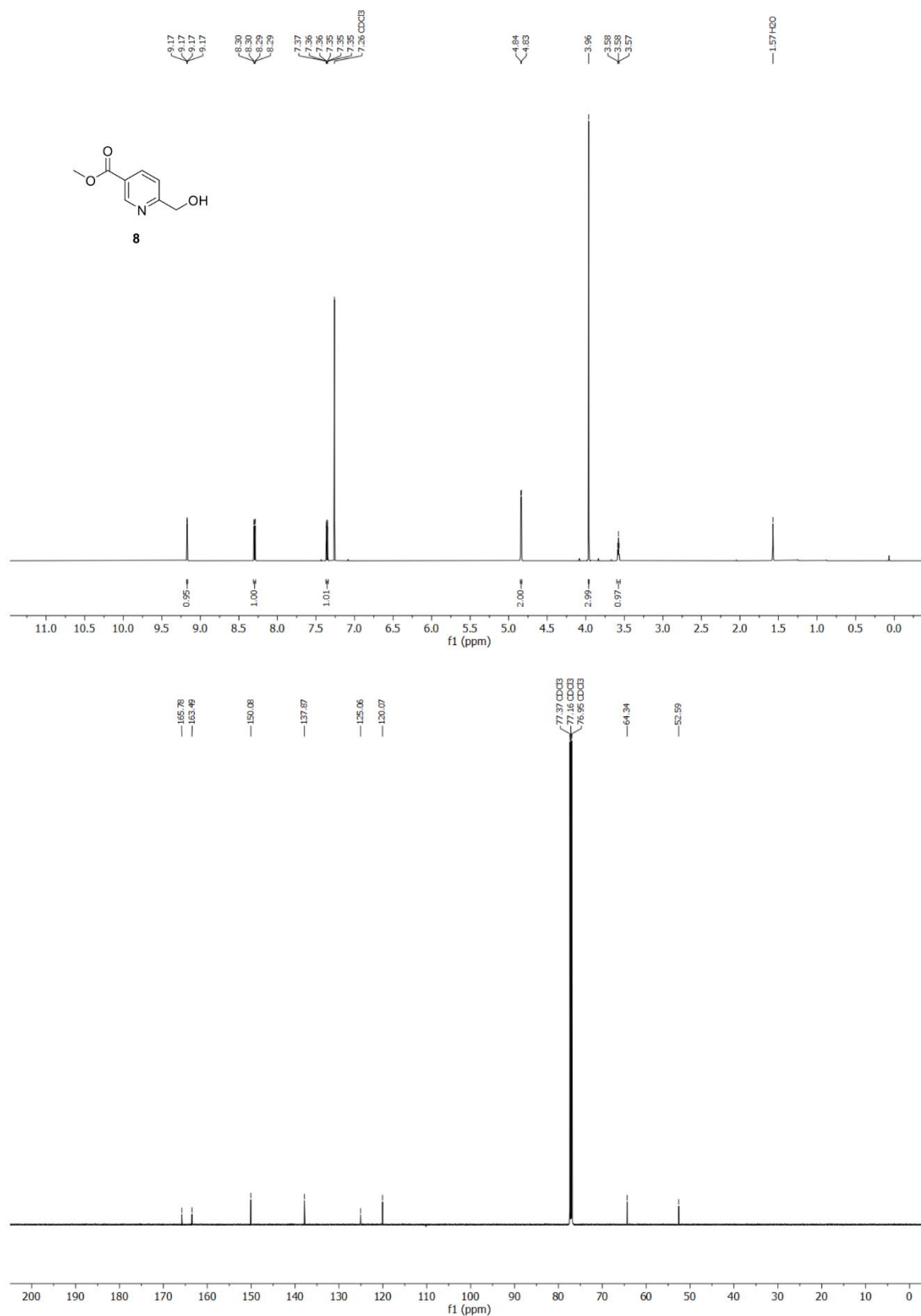
NMR spectra of synthesized compounds

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound 5

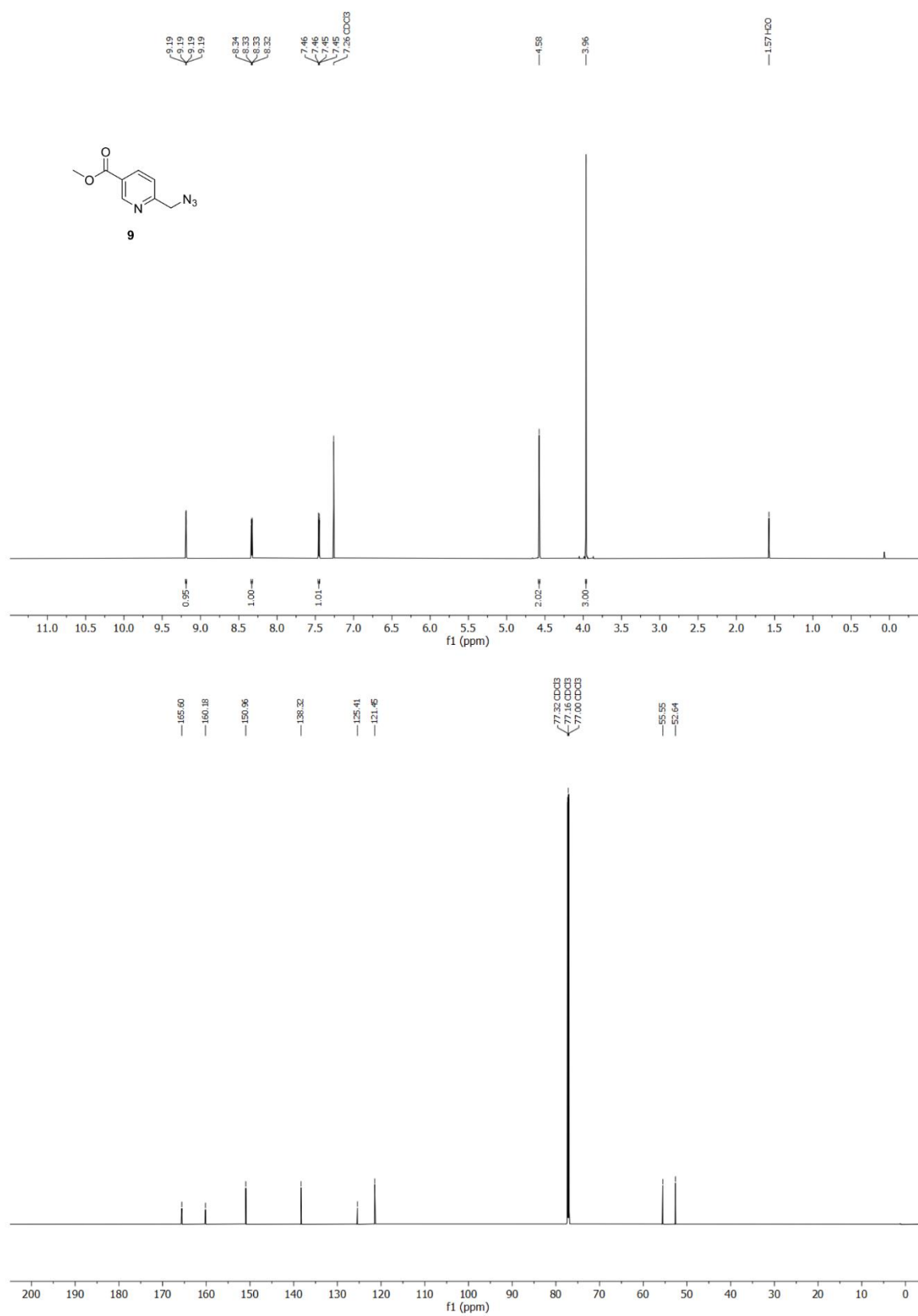
SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound 6

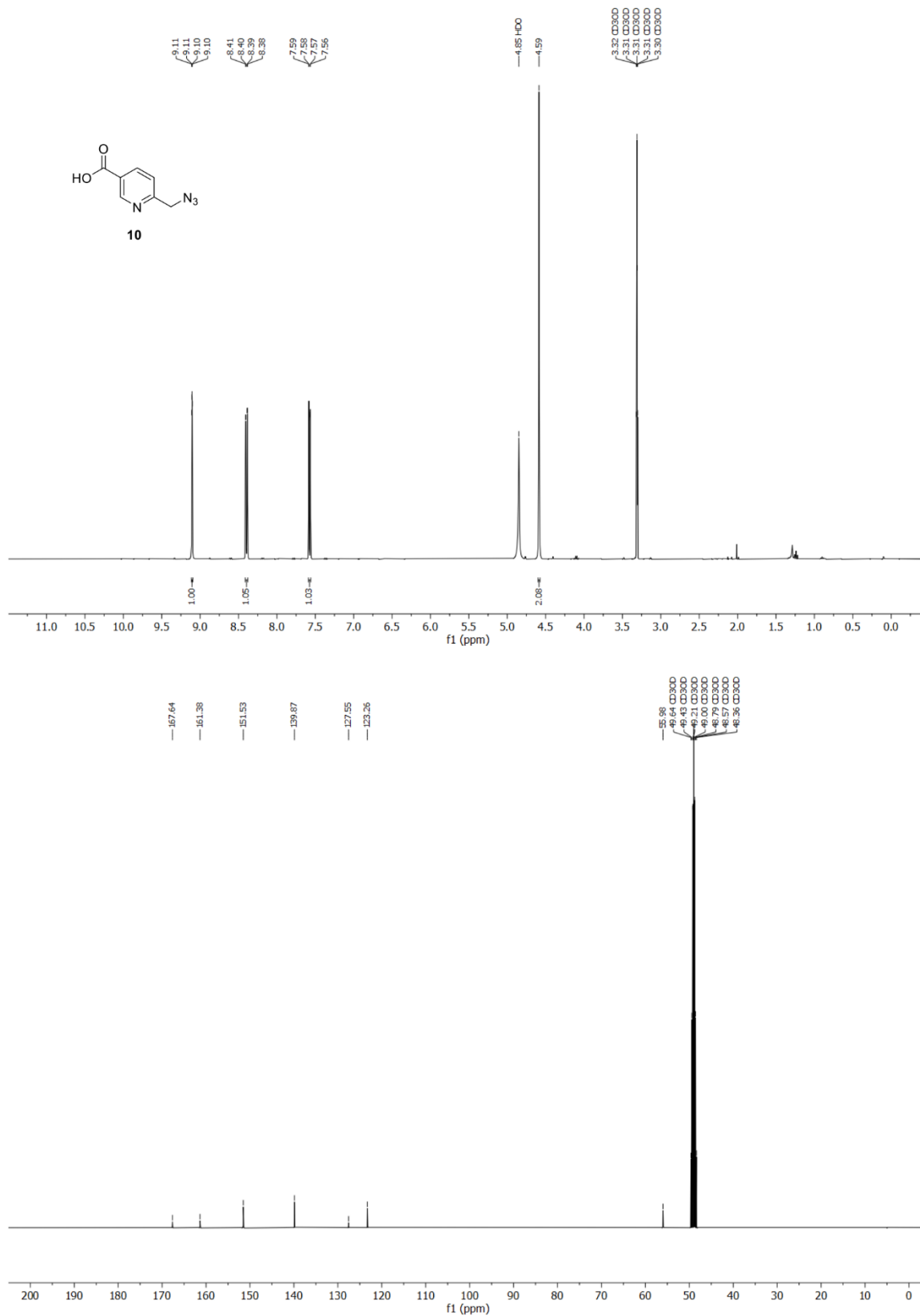
SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound 8

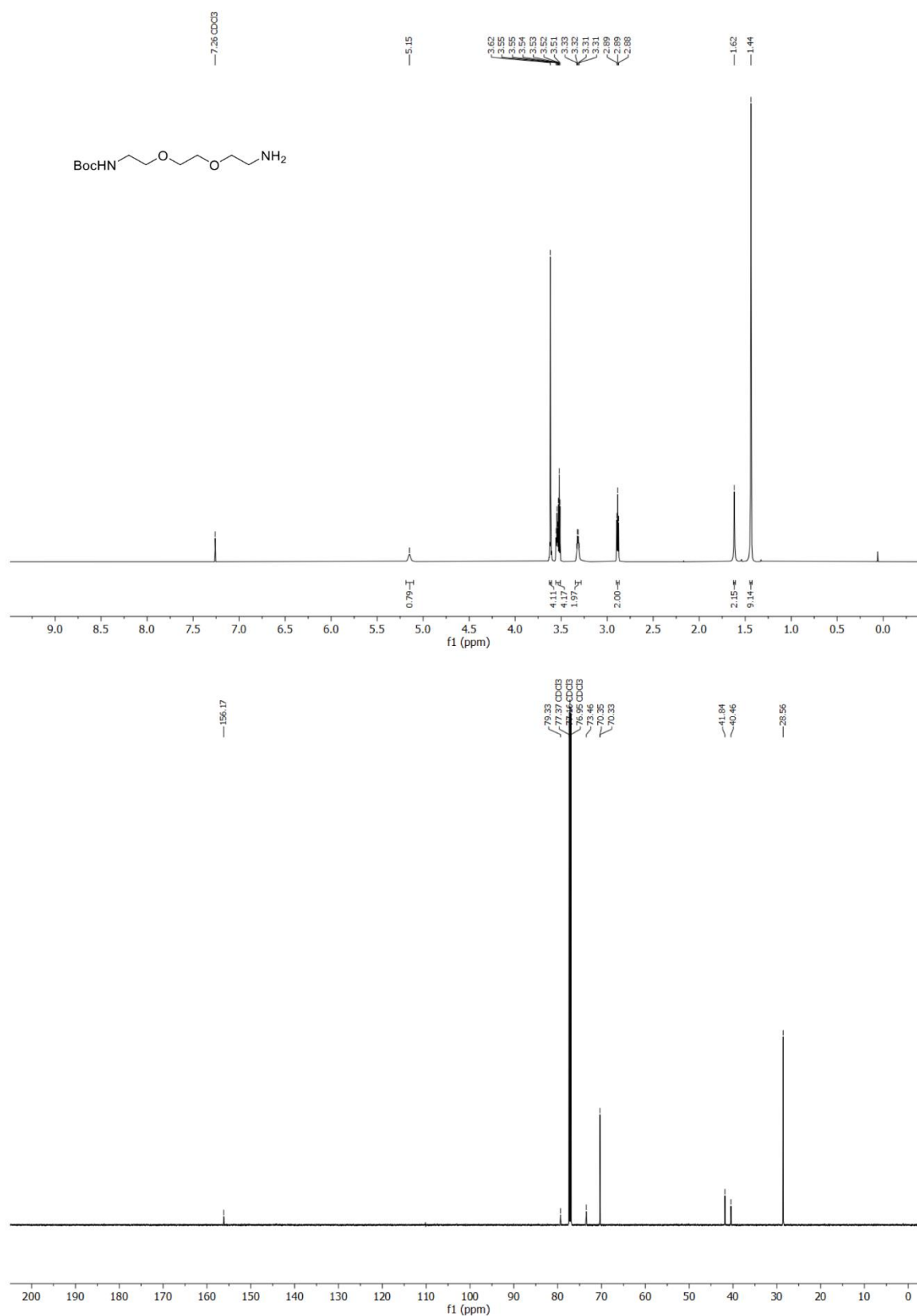
SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound **9**

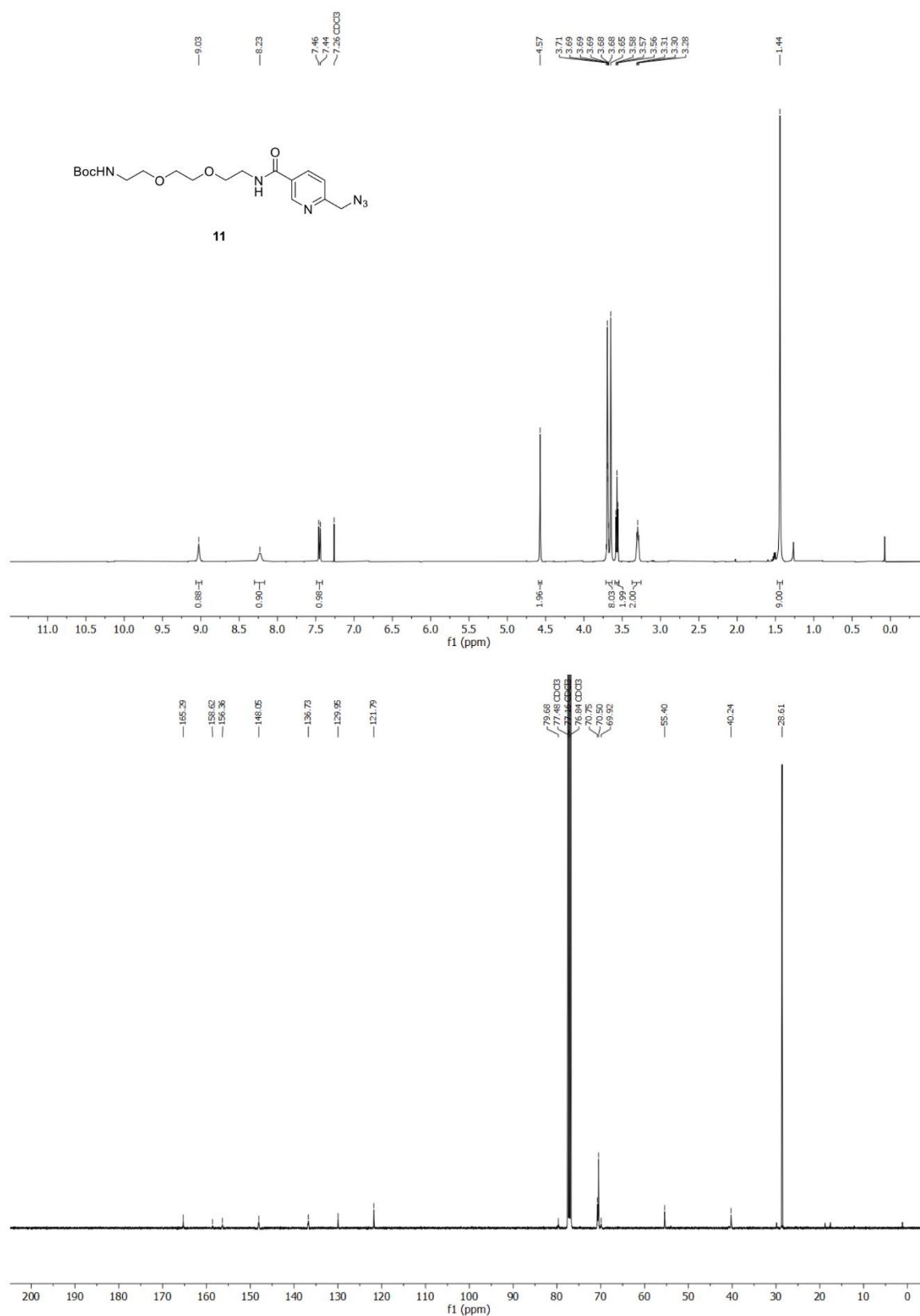
SUPPORTING INFORMATION

¹H and ¹³C{¹H} NMR spectra of compound 10

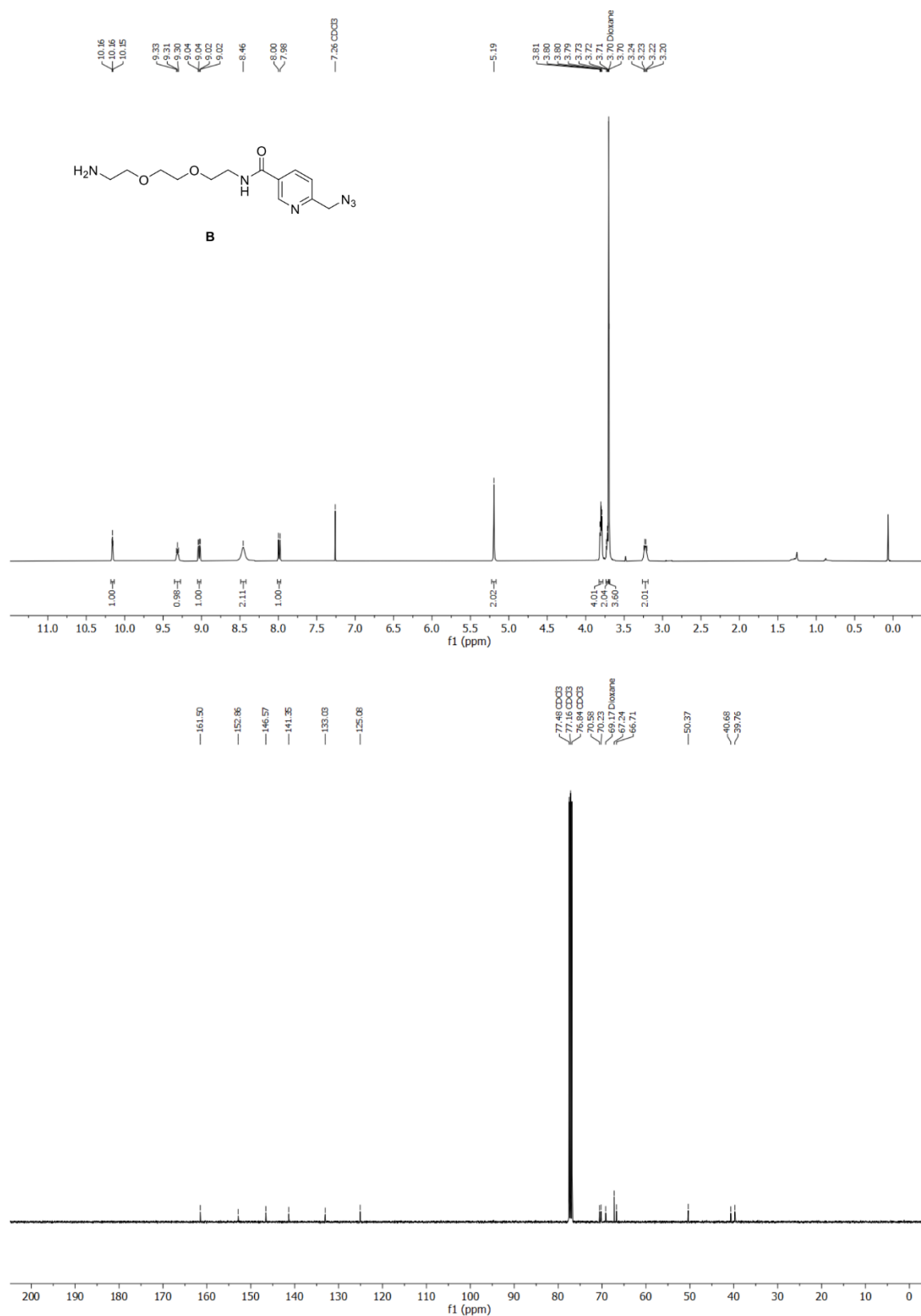
SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of *tert*-butyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate

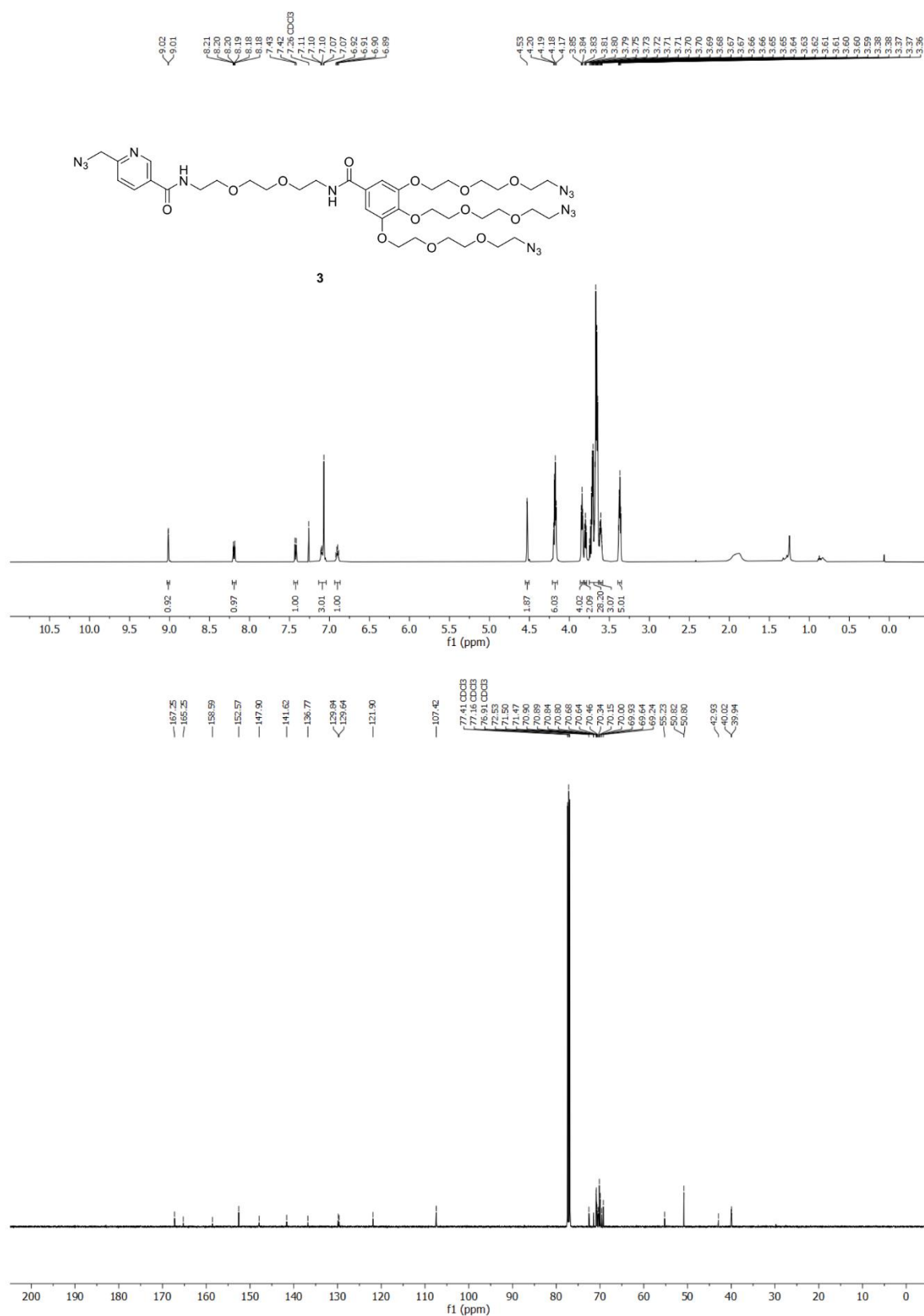
SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound 11

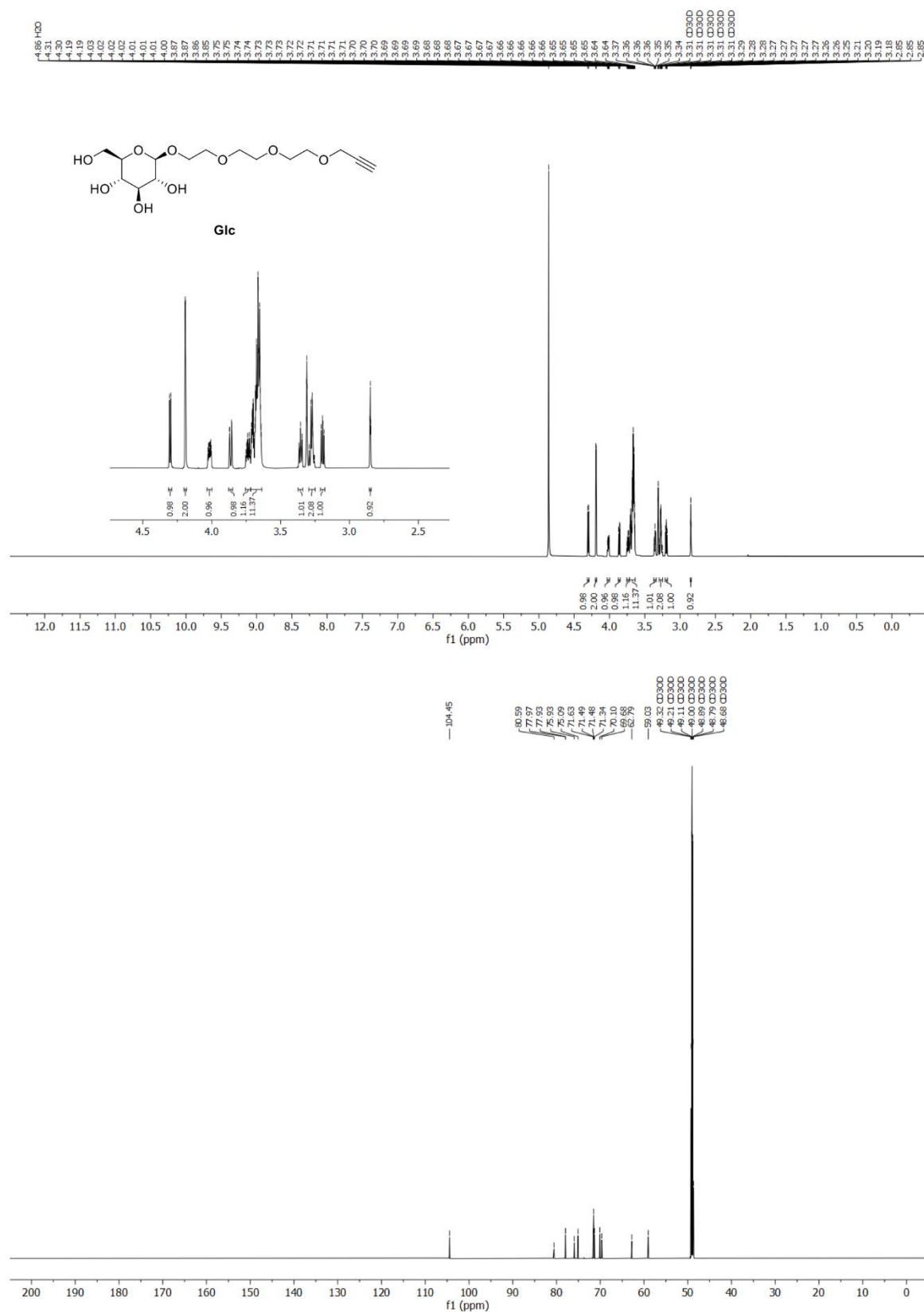
SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound B

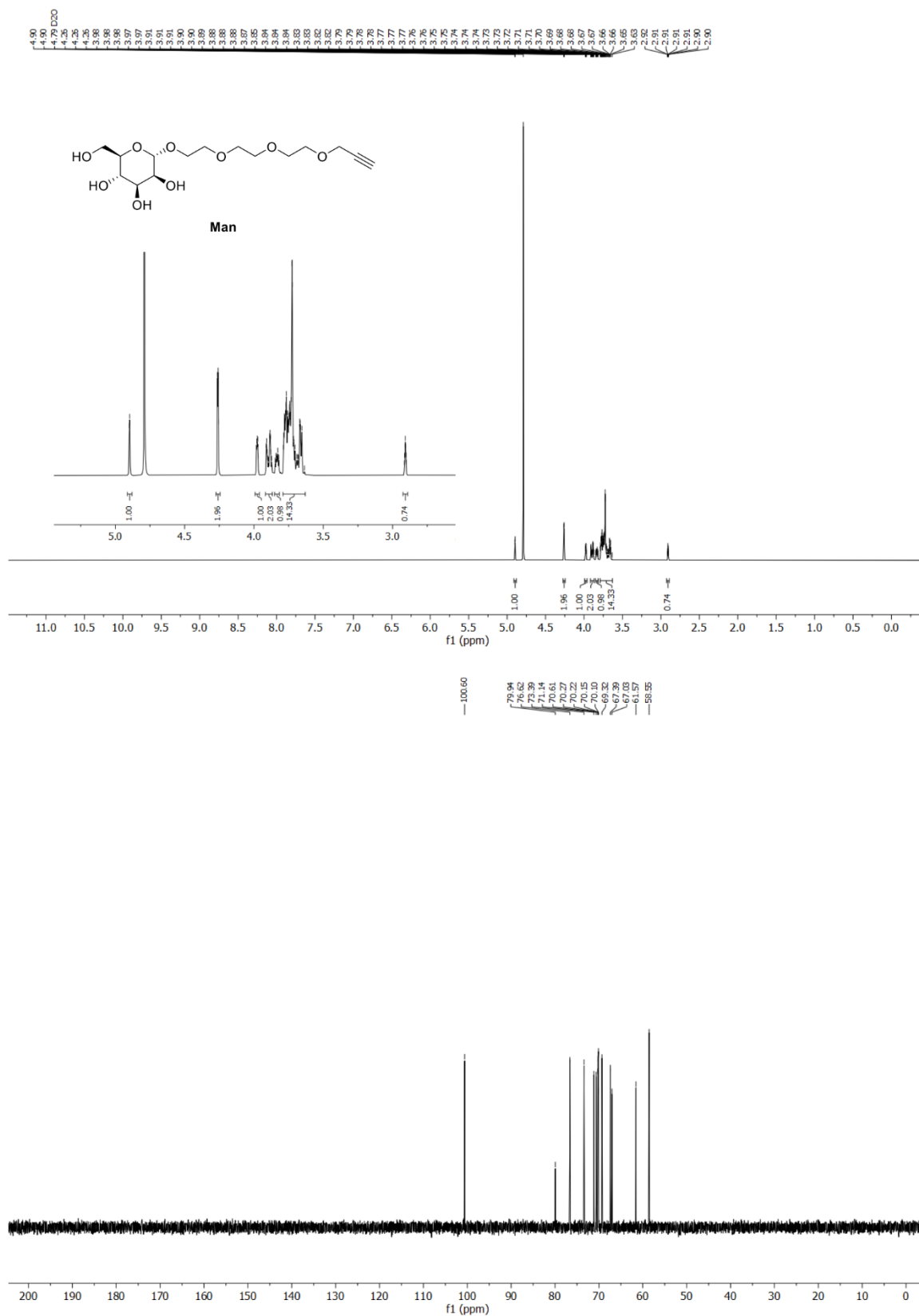
SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound 3

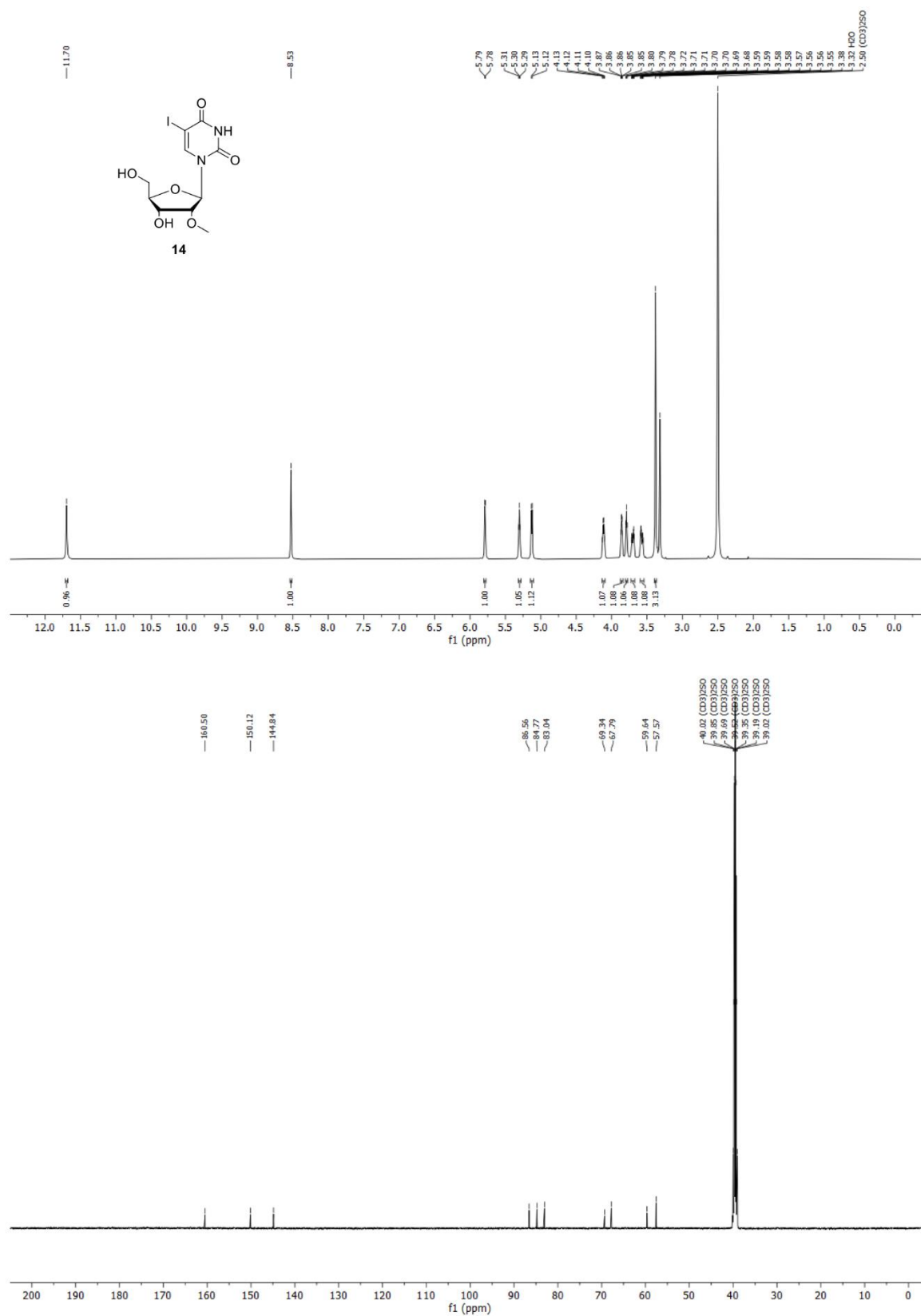
SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound Glc

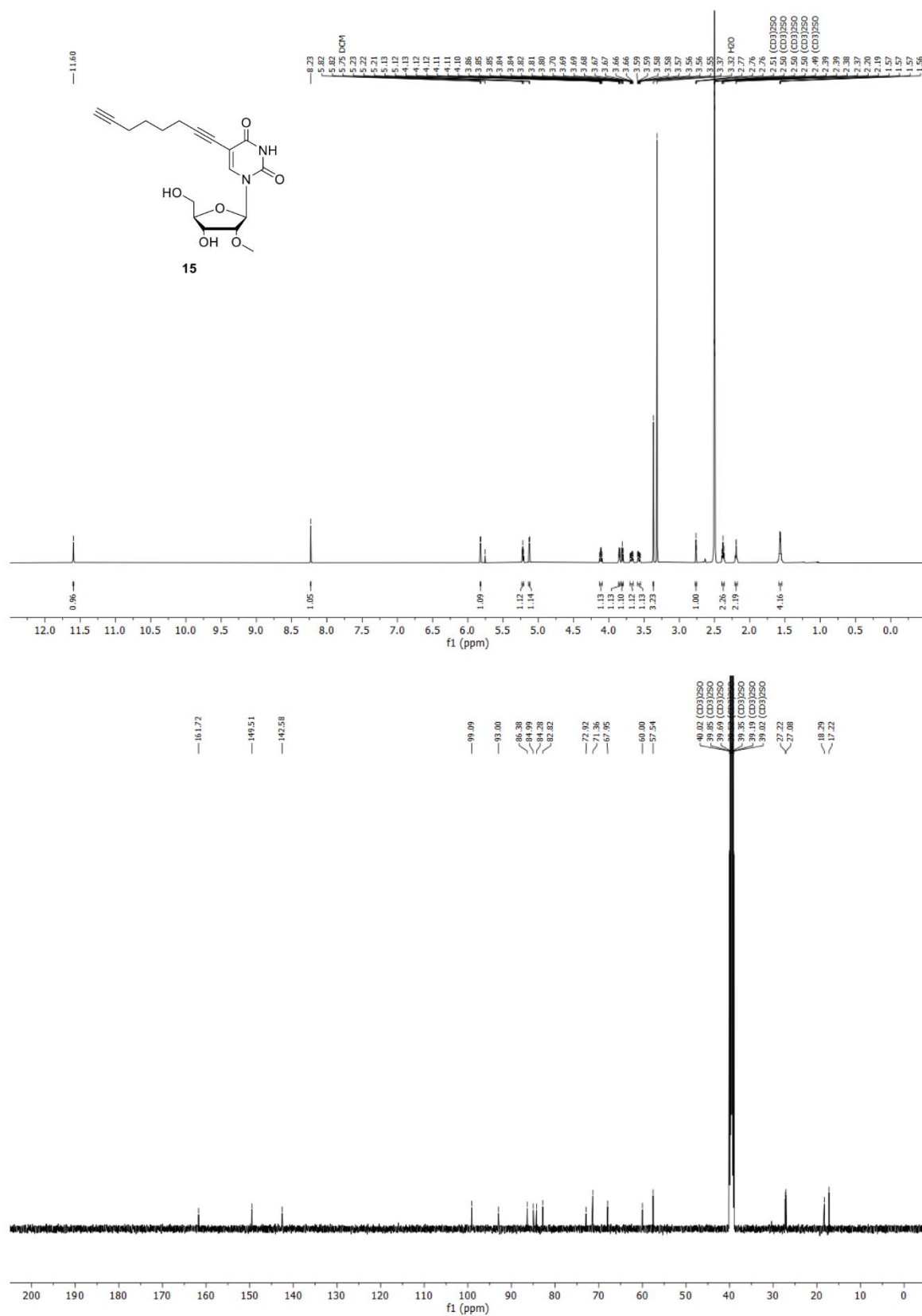
SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound Man

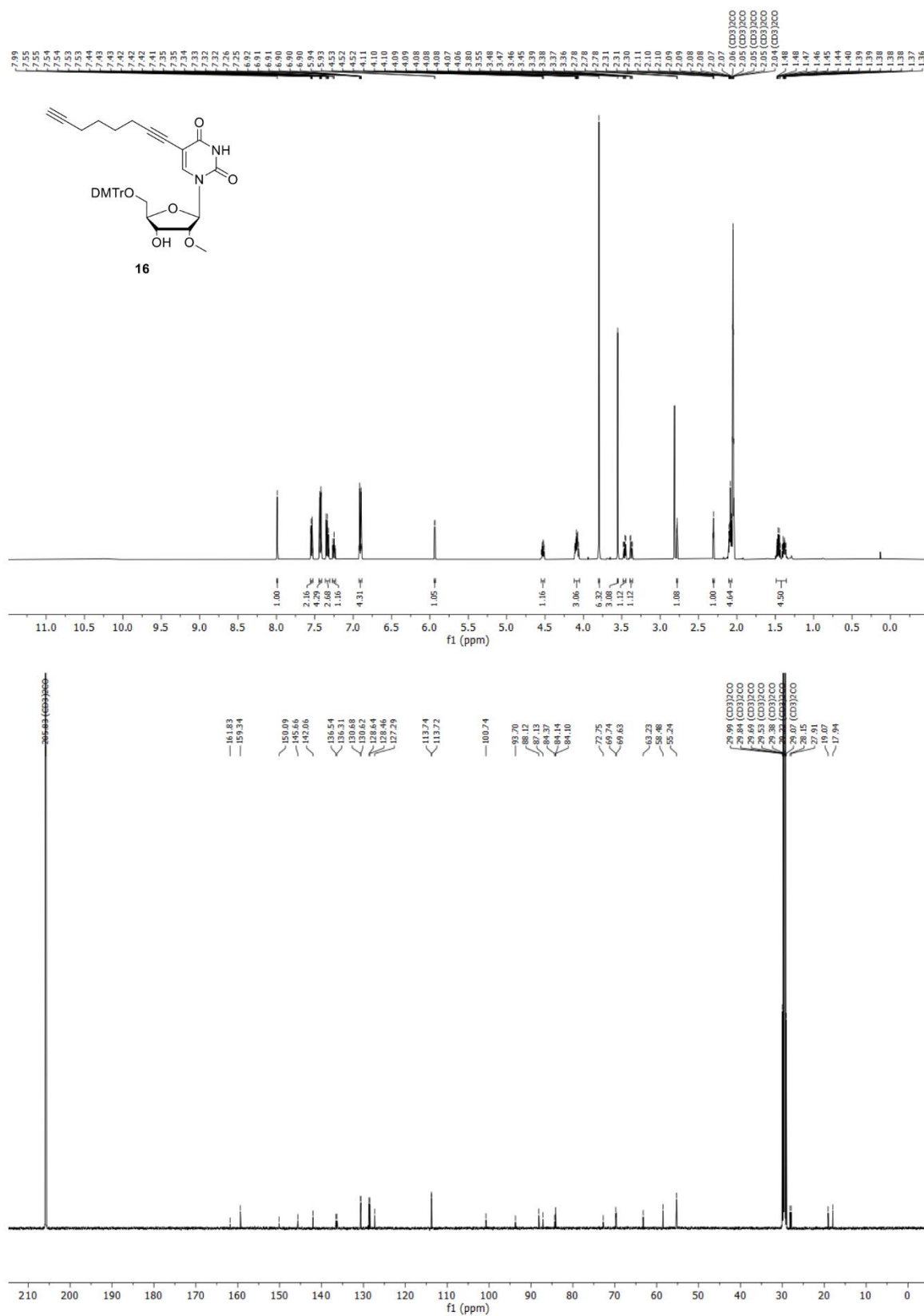
SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound 14

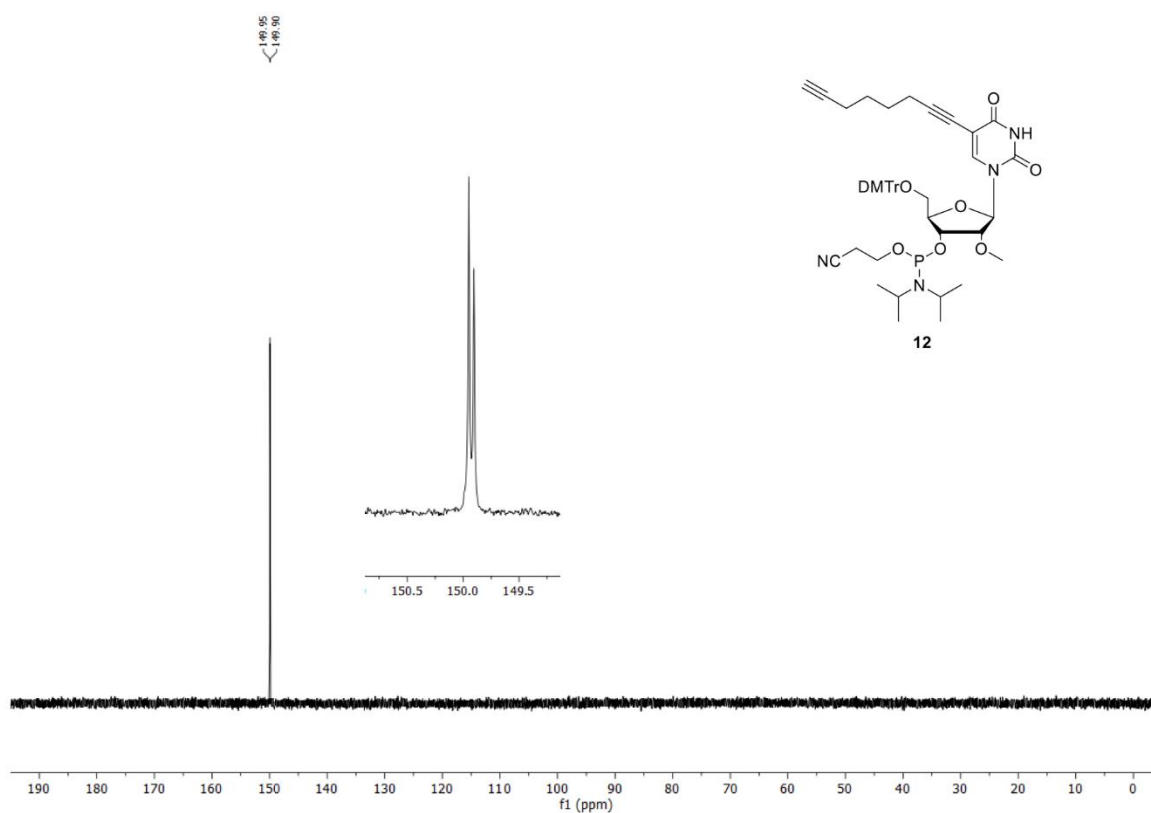
SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound 15

SUPPORTING INFORMATION

 ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound 16

SUPPORTING INFORMATION

 $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of compound 12

References

- [1] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
 [2] E. Figueras, A. Borbély, M. Ismail, M. Frese, N. Sewald, *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 1281-1286.
 [3] S. J. Meunier, Q. Wu, S.-N. Wang, R. Roy, *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 1472-1482.
 [4] S. P. Amaral, M. Fernandez-Villamarin, J. Correa, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4522-4525.
 [5] C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5852-5856.
 [6] A. Uvyn, R. De Coen, O. De Wever, K. Deswarte, B. N. Lambrecht, B. G. De Geest, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 10952-10955.
 [7] B. K. Gorityala, Z. Lu, M. L. Leow, J. Ma, X. W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15229-15232.
 [8] M. R. Bockman, R. J. Dalal, R. Kumar, T. M. Reineke, *Polym. Chem.* **2021**, *12*, 4063-4071.
 [9] V. Percec, P. Leowanawat, H. J. Sun, O. Kulikov, C. D. Nusbaum, T. M. Tran, A. Bertin, D. A. Wilson, M. Peterca, S. Zhang, N. P. Kamat, K. Vargo, D. Mook, E. D. Johnston, D. A. Hammer, D. J. Pochan, Y. Chen, Y. M. Chabre, T. C. Shiao, M. Bergeron-Breik, S. Andre, R. Roy, H. J. Gabius, P. A. Heiney, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9055-9077.