

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

**Design, Synthese und physikochemische Evaluation von  
potenziellen PROTACs gegen die cGAS-STING-Kaskade  
auf Basis ihrer natürlichen biologischen Substrate**

Johann de Graaff

aus  
Celle, 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 selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 15.05.2025

---

Johann de Graaff

Dissertation eingereicht am: 15.05.2025

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachter: Dr. Pavel Kielkowski

Mündliche Prüfung am: 24.06.2025

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder auf Konferenzen vorgestellt.

### **Konferenzbeiträge**

Poster „Towards PROTACs targeting the cGAS-STING-Pathway“, 11/2022: Minerva Stiftung, Neve Ilan, Israel.

---

## Zitat

*“It is possible, to commit no mistakes, and still lose. That is not a weakness. That is life.”*

Captain Jean-Luc Picard  
(Star Trek: The Next Generation)

*Für meine Familie.*

## Danksagung

Den folgenden Menschen, welche mich auf dem Weg dieser Forschungsarbeit begleitet und Ihren Inhalt bereichert haben, möchte ich von ganzem Herzen meinen größten Dank aussprechen.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Carell danken. Du hast mir die Chance gegeben an einem solch interessanten und herausforderndem interdisziplinären Thema am Puls der Zeit zu arbeiten. Dabei habe ich gelernt, mich selbstständig und unabhängig Herausforderungen zu widmen und bin sowohl als Person als auch Wissenschaftler daran gewachsen. Doch deine Tür war immer offen für Fragen und Anregungen und Problemlösungen, sowohl auf wissenschaftlicher als auch menschlicher Seite, und das werde ich dir nie vergessen.

Mit großer Wertschätzung möchte ich an dieser Stelle Dr. Pavel Kielkowski als zweiten Gutachter danken. Auch möchte ich hier der gesamten Prüfungskommission meinen Dank aussprechen.

Des Weiteren möchte ich Dr. Markus Müller für das Korrekturlesen dieser Dissertation und für seine wissenschaftlichen Ratschläge und Perspektiven danken.

Mein Dank gebührt auch dem Rest des Teams AK Carell. Für die Organisation danke ich Slava Gärtner, Dr. Nädä Raddaoui und Alma Tursic-Wunder. Dr. Markus Müller, Kerstin Kurz und Claudia Scherübl gebührt mein Dank für das Aufrechterhalten des Inventars, der Infrastruktur und der Wartung und Instandhaltung der Geräte. Ohne Euch würde die Gruppe nicht funktionieren.

Ein großer Dank geht an meine Projektkollegen *Dr. Giacomo Ganazzoli* und *Yasmin V. Gärtner*. Die Zusammenarbeit mit euch war immer sehr bereichernd und angenehm. Auch möchte ich an dieser Stelle diejenigen danken, die auf dem Gebiet der zyklischen Dinukleotide gearbeitet und damit den Weg für dieses Projekt geebnet haben – *Dr. Samuele Stazzoni*, *Dr. Clemens R. Dialer*, *Dr. Simon Veth*, *Dr. Dilara Özdemir*, *Dr. Aikaterini Pappa*, *Dr. Fabian Hernichel* und *Dr. Anna-Lena J. Halbritter*.

Auch möchte ich meinen anderen Kollegen aus der Gruppe für den Umgang und die Hilfsbereitschaft danken; mit euch hat die Forschung auch in schweren Zeiten immer Spaß gemacht. Ganz besonders gilt dieser Dank an das „alte“ Labor F4.012 (*Dr. Jonas Feldmann*, *Dr. Felix M. Müller*, *Dr. Florian Schelter*, *Dr. Simon Veth* und *Dr. Stefan Wiedemann*) und das „neue“ Labor L03.012.

Ich möchte mich bei meinen Studenten bedanken, welche indirekt an dieser Arbeit mitgewirkt haben. In chronologischer Reihenfolge: *Sonja Wiens*, *Michael Weiß*, *Sebastian Olsson*, *Yajuan Ma*, *Areta Murati* und *Luoxia Shi*. Die Arbeit mit euch und eure Ausbildung hat mir sehr viel Spaß gemacht und ich wünsche euch alles Gute für eure Zukunft.

Für das Korrekturlesen und/oder Motivieren während des Verfassens dieser Dissertation möchte ich meinen Kollegen und Freunden *Dr. Anna-Lena J. Halbritter*, *Dr. Christoph R. Habiger*, *Dr. Corinna C. Pleintinger*, *Dr. Felix M. Müller* und *Simon D. Dresbach* danken.

Als Letztes möchte ich meinen Freunden, meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern danken. Ohne euren Beistand über die letzten Jahre wäre diese Dissertation nicht zu Stande gekommen.

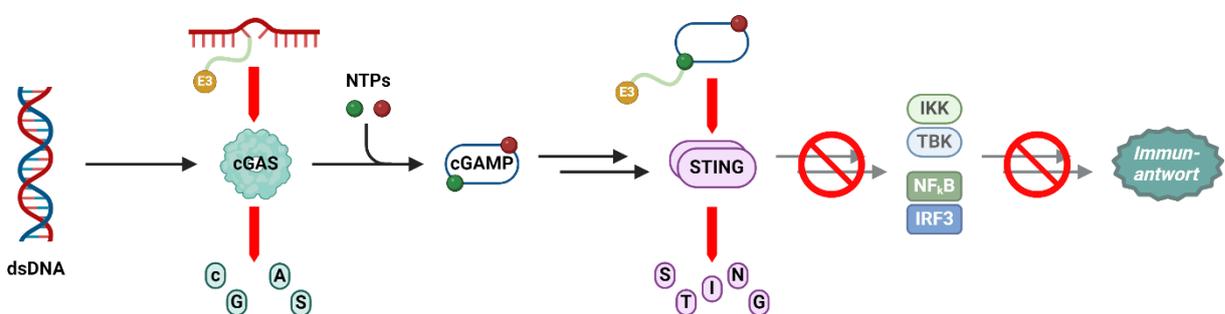


## Summary

In higher organisms, the immune system has evolved to protect against external influences, pathogens and defective cells. The cGAS-STING pathway plays an important key role within the innate immune response. It detects cytosolic dsDNA independent of its source and initiates inflammatory responses through the production of type I interferons and cytokines. cGAS is the detector that synthesizes the second messenger 2',3'-cGAMP in the presence of dsDNA, which then activates the protein STING localized in the ER. The activation of STING starts a reaction cascade which is responsible for the production of interferons and cytokines and triggers an immune response. Many diseases are associated with dysregulation of the cGAS-STING pathway, and chronic inflammatory diseases are increasingly associated with this pathway. To treat these diseases, new molecules are steadily being synthesized that act as agonists or antagonists of STING.

Instead of simply inhibiting proteins, a technology was devised in the early 2000s that would remove proteins from the cellular environment. A variant of this *targeted protein degradation* (TPD) are proteolysis-targeting chimeras (PROTACs); these molecules use the body's own machinery to degrade proteins via the proteasome. PROTACs are designed to simultaneously bind to both the protein to be degraded and an E3 ligase, which marks a protein for degradation by the proteasome via polyubiquitination.

The aim of this dissertation was to downregulate the cGAS-STING pathway using PROTACs. PROTACs against STING were designed based on cyclic dinucleotides, and those against cGAS were based on oligonucleotides. The modification to PROTACs was achieved by end-stage modification of the nucleobases *via* click chemistry; in the case of cyclic dinucleotides, this modification was introduced at positions O<sup>6</sup> and C<sup>8</sup>. Physicochemical studies have shown that one of the most used motifs for the E3 ligase CRBN, based on thalidomide and its derivatives, does not appear to be stable at pH > 5 under our tested cell culture conditions – a problem that has not been discussed well enough regarding the use of this technology.

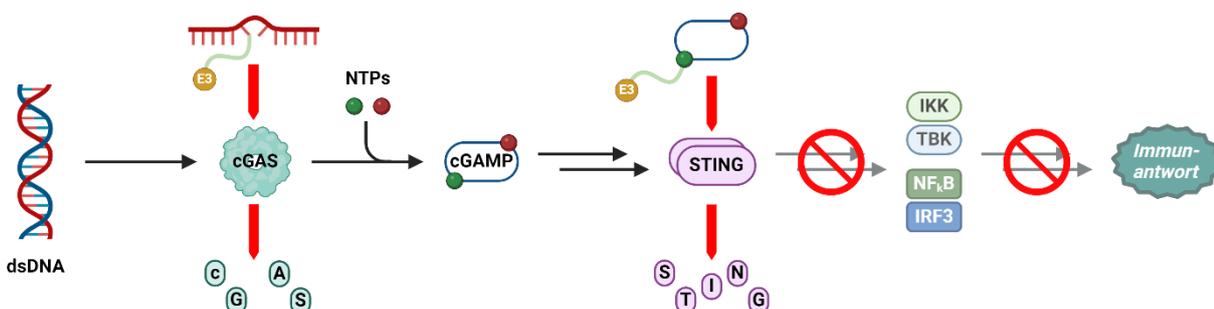


## Zusammenfassung

In höheren Lebewesen hat sich ein Immunsystem zum Schutz vor äußeren Einflüssen, Pathogenen und defekten Zellen entwickelt. Dabei nimmt die cGAS-STING-Kaskade innerhalb der angeborenen Immunantwort eine wichtige Schlüsselrolle ein. Sie detektiert cytosolische dsDNA unabhängig von ihrer Quelle und startet inflammatorische Reaktionen durch die Produktion von Typ-I Interferonen und Zytokinen. cGAS detektiert die dsDNA und synthetisiert den *second messenger* 2',3'-cGAMP, welcher daraufhin das im ER lokalisierte Protein STING aktiviert. Die Aktivierung von STING startet eine Reaktionskaskade, welche für die Produktion der Interferone und Zytokine verantwortlich ist und nachfolgend eine Immunantwort auslöst. Viele Krankheitsbilder scheinen mit einer Fehlregulierung der cGAS-STING-Kaskade einherzugehen, vor allem chronisch-inflammatorische Erkrankungen werden mehr und mehr mit dieser Kaskade in Verbindung gebracht. Um diese Krankheiten zu behandeln, werden stetig neue potenzielle Wirkstoffe synthetisiert, die als Agonisten oder Antagonisten von STING agieren sollen.

Anstatt Proteine nur zu inhibieren wurde Anfang der 2000er eine Technologie etabliert, welche Proteine aus dem zellulären Gleichgewicht entfernen sollen. Eine Variante dieser *Targeted Protein Degradation* (TPD) stellen Proteolyse-induzierende Chimären dar (PROTACs). Diese Moleküle nutzen die körpereigene Maschinerie zum Abbau von Proteinen über das Proteasom. PROTACs sind so entworfen, dass diese gleichzeitig sowohl an das abzubauen Protein als auch an E3-Ligasen binden, welche mittels Polyubiquitinierung ein Protein zum Abbau durch das Proteasom markieren.

Ziel dieser Dissertation war es, die cGAS-STING-Kaskade durch PROTACs herunterzuregulieren. Dabei wurden potenzielle PROTACs gegen STING auf Basis von zyklischen Dinukleotiden und PROTACs gegen cGAS auf Basis von Oligonukleotiden entworfen. Für die Modifikation zu den PROTACs wurde eine Endstufenmodifikation der Nukleobasen über Click-Chemie durchgeführt; bei den zyklischen Dinukleotiden wurde diese Modifikation in den Positionen O<sup>6</sup> und C<sup>8</sup> eingeführt. In physikochemischen Untersuchungen musste leider festgestellt werden, dass eines der meistgenutzten Motive für die E3-Ligase CRBN, auf Basis von Thalidomid und seinen Derivaten, unter unseren getesteten Zellkultur-bedingungen bei pH > 5 nicht stabil zu sein scheint – ein Problem, was bisher in Hinblick auf die Nutzung dieser Technologie nicht gut genug diskutiert wurde.



## Inhaltsverzeichnis

Summary .....	I
Zusammenfassung.....	II
Inhaltsverzeichnis .....	III
1 Einleitung in die Thematik.....	1
1.1 Die Rolle der cGAS-STING-Kaskade in Erkrankungen .....	1
1.1.1 Das Immunsystem und die Rolle der angeborenen Immunantwort .....	1
1.1.2 Die cGAS-STING-Kaskade in der Detailbetrachtung .....	3
1.1.3 Die cGAS-STING-Kaskade als therapeutisches Ziel.....	5
1.1.4 Chemischer Zugang zu zyklischen Dinukleotiden .....	8
1.2 Die PROTAC-Technologie als neues therapeutisches Mittel .....	11
1.2.1 <i>Targeted Protein Degradation</i> in der modernen Medizin .....	11
1.2.2 Die Funktionsweise von Proteolyse-induzierenden Chimären .....	12
1.2.3 Evolution der TPD und Durchbrüche von PROTACs als Therapeutika.....	14
1.3 Die cGAS-STING-Kaskade als Ziel der PROTAC-Technologie.....	16
2 Zielsetzung dieser Dissertation .....	17
3 Ergebnisse und Diskussion.....	18
3.1 PROTACs gegen STING auf Basis von CDNs .....	18
3.1.1 Synthesepipeline für STING-PROTACs.....	18
3.1.2 PROTACs auf Basis von 3',3'-c-di-GMP, modifiziert an O <sup>6</sup> G .....	23
3.1.3 PROTACs auf Basis von 3',3'-c-di-GMP, modifiziert an C <sup>8</sup> G.....	34
3.1.4 PROTACs auf Basis von 2',3'-cGAMP, modifiziert an C <sup>8</sup> G .....	42
3.2 PROTACs gegen cGAS .....	46
3.2.1 cGAS-PROTACs auf Basis von <i>small molecule inhibitors</i> .....	47
3.2.2 cGAS-PROTACs auf Basis von G-Quadruplexen .....	54
3.3 Untersuchung der Stabilität von CRBN-basierten PROTACs .....	61
4 Fazit und Ausblick .....	74
5 Experimenteller Teil.....	77
5.1 Chemische Materialien und Methoden .....	77
5.2 Experimentelle Vorschriften zu PROTAC-Bausteinen .....	82
5.3 Experimentelle Vorschriften zu STING-PROTACs .....	86
5.3.1 Synthese von O <sup>6</sup> -modifiziertem 3',3'-c-di-GMP .....	86
5.3.2 Synthese von C <sup>8</sup> -modifiziertem 3',3'-c-di-GMP .....	96
5.3.3 Synthese von C <sup>8</sup> -modifiziertem 2',3'-cGAMP.....	111
5.4 Experimentelle Vorschriften zu cGAS-PROTACs.....	125
5.4.1 Synthese der Oligonukleotide.....	125
5.4.2 Endstufenmodifikation der Oligonukleotide.....	127
5.5 Untersuchung der hydrolytischen Stabilität.....	130
6 Quellenverzeichnis .....	133
7 Abkürzungsverzeichnis .....	144



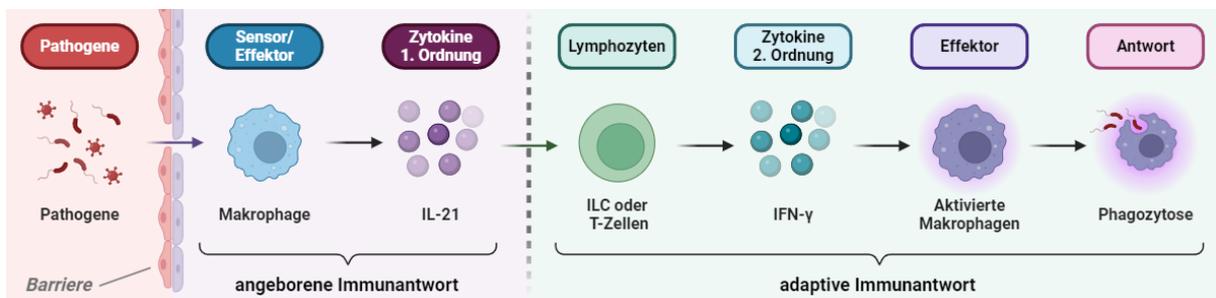
# 1 Einleitung in die Thematik

## 1.1 Die Rolle der cGAS-STING-Kaskade in Erkrankungen

### 1.1.1 Das Immunsystem und die Rolle der angeborenen Immunantwort

Komplexes Leben wie wir es kennen ist ein fein abgestimmtes Gleichgewicht aus abertausenden Prozessen zwischen Billionen von Zellen, die beim Menschen über 400 verschiedenen Zelltypen zugeordnet werden können.<sup>[1]</sup> Weiterhin liegt dieses Leben oft symbiontisch vor, nicht nur zwischen höheren Lebewesen, sondern auch zwischen Mikroorganismen und höheren Lebewesen.<sup>[2]</sup> Ein Beispiel dafür ist die Darmflora, welche nachweislich Einfluss auf unseren Metabolismus<sup>[3]</sup> und die Aktivität unseres Gehirns haben kann.<sup>[4]</sup> Das Immunsystem ist ein essenzieller Bestandteil, um dieses Gleichgewicht in der Balance zu halten und uns vor schädlichen Einflüssen zu schützen.<sup>[5]</sup>

Das Immunsystem lässt sich neben physischen Barrieren<sup>[6]</sup> in zwei Funktionskategorien einteilen, welche aufeinander aufbauen: die angeborene Immunantwort<sup>[7]</sup> und die erworbene, adaptive Immunantwort (**Abbildung 1.1**).<sup>[8]</sup> Dabei ist die angeborene Immunantwort eine schnelle, weitreichende und vergleichsweise unspezifische Reaktion des Körpers. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Prävention vor oder als Erstreaktion auf mögliche Pathogene und Krankheitserreger, falls die physischen Barrieren überwunden worden sind. Zu den Wirkmechanismen zählen unter anderem die Phagozytose durch Makrophagen und das Ausschütten von Botenstoffen als Reaktion auf bestimmte Pathogene.<sup>[7, 9]</sup> Dagegen agiert die erworbene Immunantwort langsamer, hochspezifisch und meist im Anschluss an die angeborene Immunantwort.<sup>[9, 10]</sup> Hierbei wird im Anschluss spezifisch auf Antigene der Erreger reagiert und daraufhin verschiedene Signalwege aktiviert. Unter anderem werden so Lymphozyten sowie B- und T-Zellen, aktiviert bzw. Stammzellen zu diesen differenziert, und Antikörper gebildet, um eine pathogen-spezifische Immunantwort auszulösen und ein immunologisches Gedächtnis und somit auch langfristigen Schutz gegen diese Pathogene aufzubauen.<sup>[8, 11]</sup>



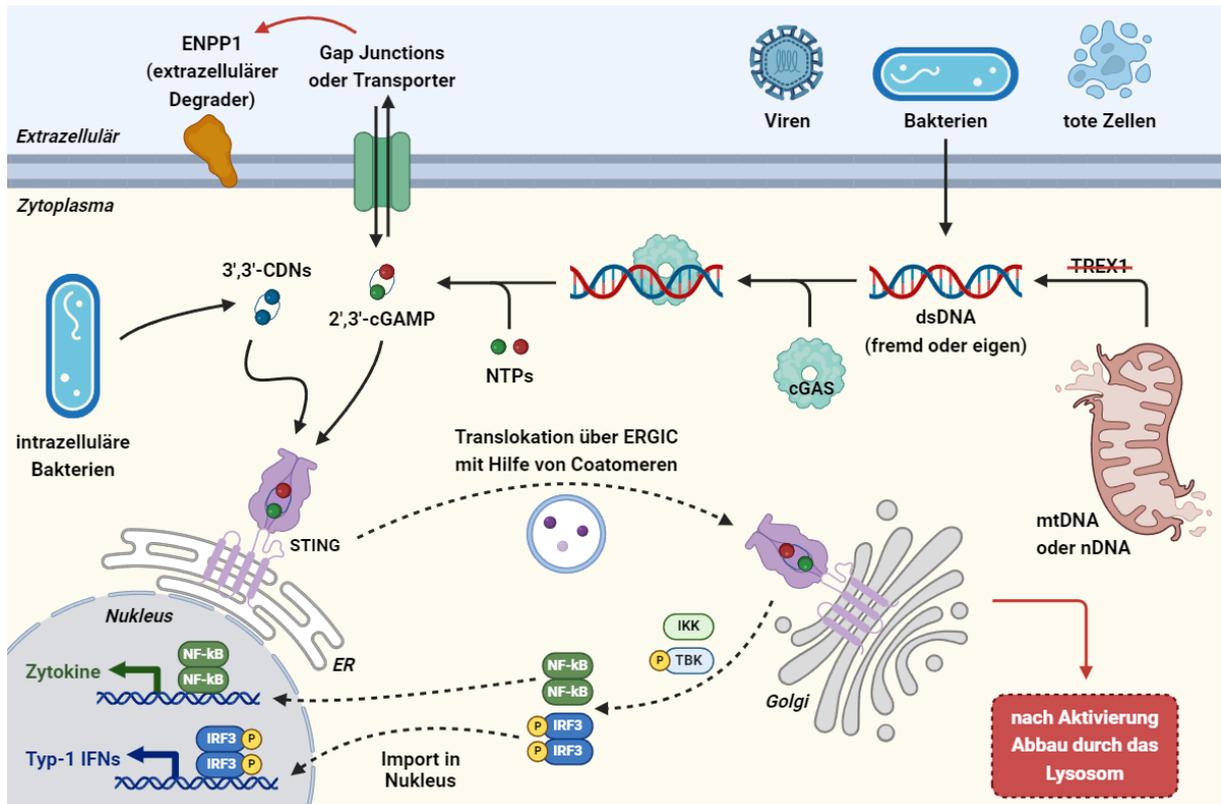
**Abbildung 1.1.** Vereinfachte schematische Darstellung der Funktionsweise des Immunsystems. Falls Pathogene die physischen Barrieren des Körpers überwinden sollten, wird die angeborene Immunantwort aktiviert. Dabei werden je nach Art des Pathogens bestimmte Botenstoffe wie Interferone und Zytokine erster Ordnung produziert und Signalwechselwege wie beispielsweise Entzündungsreaktionen gestartet. Diese Botenstoffe aktivieren dann darauf aufbauend weitere Signalwege innerhalb der adaptiven Immunantwort, welche abschließend in der Produktion von spezialisierten Lymphozyten endet. Diese können eine Infektion bzw. davon betroffene körpereigene Zellen effektiv angreifen und eine Erinnerung gegen die Pathogene erstellen. Abbildung erstellt mit *BioRender*.

Die angeborene Immunantwort nimmt dabei eine wichtige Rolle in der Erstreaktion gegen Infektionen und ausbrechende Krankheiten ein. Zur Bekämpfung von Pathogenen nimmt der Körper sowohl Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl. *damage-associated molecular pattern*, DAMP)<sup>[12]</sup> als auch als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMP)<sup>[13]</sup> als Gefahrensignale mit Hilfe spezifischer Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptor*, PRR)<sup>[14]</sup> wahr und reagiert auf diese. Die Anwesenheit doppelsträngiger DNA (dsDNA) im Zytosol stellt ein solches Gefahrensignal dar. In der Regel lässt sich dsDNA kaum im Zytosol auffinden. Fremde dsDNA kann von einer bakteriellen oder viralen Infektion herrühren. Erhöhte Konzentrationen von körpereigener dsDNA im Zytosol sind nur bei einer Absorption toter Zellen oder durch Schäden innerhalb der Zelle wie zum Beispiel am Mitochondrium oder am Zellkern denkbar.<sup>[15]</sup> Zytosolische dsDNA wird jedoch in der Regel von der *three prime repair exonuclease 1* (TREX1) schnell erkannt und abgebaut, sodass sich diese nicht im Zytosol akkumulieren kann.<sup>[16]</sup>

dsDNA lässt sich damit sowohl als DAMP als auch als PAMP klassifizieren. Zur Erkennung von dsDNA als Gefahrensignal gibt es in Abhängigkeit von der Basenpaarlänge mehrere redundante PRRs, welche sich nach ihrer Aktivierung auch gegenseitig beeinflussen können.<sup>[17, 18]</sup> Beispielsweise werden Fragmente von dsDNA mit Basenpaarlängen von über 100 hauptsächlich von AIM2 (*absent in melanoma 2*) erkannt, welches daraufhin das sogenannte AIM2-Inflammasom aktiviert.<sup>[19]</sup> Bei kürzeren Fragmenten mit einer Basenpaarlänge ab 20 und einer optimalen Länge von 40–70 bp wird jedoch die cGAS-STING-Kaskade wirksam.<sup>[20]</sup> Dabei fungiert die zyklische Guanosinmonophosphat-Adenosin-monophosphat-Synthase (cGAS) als PRR für dsDNA. Das Enzym katalysiert die Synthese von zyklischem 2',5'-Guanosinmonophosphat-3',5'-Adenosinmonophosphat (2',3'-cGAMP, im Weiteren nur als cGAMP betitelt) aus den entsprechenden Nukleosidtriphosphaten (NTPs). cGAMP ist ein zyklisches Dinukleotid (CDN) mit einer nicht-kanonischen 2',5'-Phosphodiesterbindung und fungiert als hochspezifischer *second messenger* für den *stimulator of interferon genes* (STING).<sup>[21-23]</sup>

Bei der Bindung von cGAMP oder anderen CDNs bakteriellen Ursprungs (welche ausschließlich kanonische 3',5'-Verknüpfungen aufweisen) an STING wird letzteres aktiviert. Es löst nach einer Translokation vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat eine Signalkaskade aus. Dabei werden verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert und die Transkription von Genen induziert, welche für Zytokine und Interferone vom Typ I kodieren. Diese Botenstoffe können im Anschluss Entzündungsreaktionen starten und bestimmte Wege der adaptiven Immunantwort aktivieren. Nach Aktivierung dieser Signalkaskade wird STING lysosomal abgebaut oder zurück zum ER transportiert.<sup>[24, 25]</sup> cGAMP kann auch in benachbarten Zellen diese Signalkaskade aktivieren, nachdem es über *gap junctions* oder aktive Transporter in andere Zellen gelangt ist. Im Normalfall wird es durch die Ectonukleotid-Pyrophosphatase / Phosphodiesterase 1 (ENPP1) extrazellulär wieder abgebaut (**Abbildung 1.2**).<sup>[26]</sup>

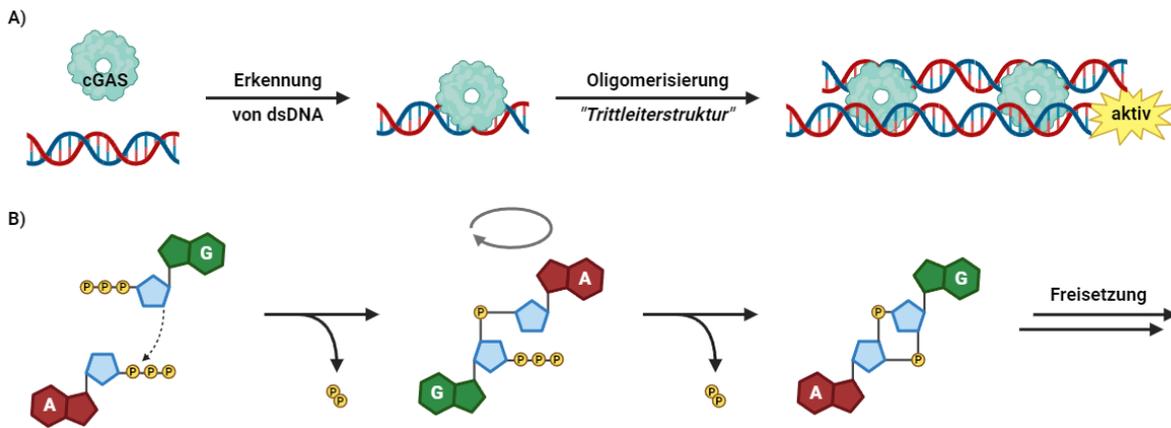
## 1.1.2 Die cGAS-STING-Kaskade in der Detailbetrachtung



**Abbildung 1.2.** Schematische Darstellung der Wirkweise der cGAS-STING-Kaskade. Zytosolische dsDNA fremden oder körpereigenen Ursprungs wird von cGAS erkannt und gebunden. Daraufhin wird aus den entsprechenden Triphosphaten der *second messenger* cGAMP hergestellt. Nach der Aktivierung von STING durch cGAMP und der Translokation vom ER zum Golgi-Apparat werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche daraufhin in den Nucleus transportiert werden und dort die Transkription von Interferonen und Zytokinen starten. STING wird dabei nach der Signaltransduktion lysosomal abgebaut. cGAMP kann aktiv oder passiv zwischen Zellen hin- und hertransportiert werden, extrazellulär wird es durch ENPP1 abgebaut. Abbildung erstellt mit *BioRender*.

### 1.1.2 Die cGAS-STING-Kaskade in der Detailbetrachtung

Der nähere Blick auf die cGAS-STING-Kaskade verrät die lineare Wirkweise von zytosolischer dsDNA als Gefahrensignal zur Aktivierung von STING und der darauffolgenden Induktion einer Signalkaskade zur Produktion von Zytokinen und Interferonen.<sup>[27]</sup> Im Folgenden soll genauer auf die Mechanismen zur Aktivierung von cGAS und STING sowie deren Wirkweise eingegangen werden. cGAS besitzt insgesamt drei Bindungsdomänen, davon dienen zwei der Erkennung von dsDNA und eine der Synthese von cGAMP aus den NTPs.<sup>[28]</sup> Nachdem dsDNA als Gefahrensignal von cGAS detektiert wurde, entstehen Trittlerstrukturen und Kondensate aus mehreren cGAS-dsDNA-Komplexen (**Abbildung 1.3A**).<sup>[29, 30]</sup> Anschließend wird die NTP-Domäne aktiv. Sie bindet sowohl Guanosintriphosphat (GTP) als auch Adenosintriphosphat (ATP). Dabei wird erst die nicht-kanonische 2',5'-Bindung ausgehend von der 2'-Hydroxygruppe von Guanosin (G) zum Adenosin (A) geknüpft. Anschließend verlässt das lineare Dinukleotid die katalytische Domäne und wird in einer verdrehten Orientierung wieder eingesetzt, um ausgehend vom A-Teil die 3',5'-Bindung zum G-Teil aufzubauen. Schlussendlich wird das zyklische Dinukleotid cGAMP freigesetzt (**Abbildung 1.3B**).<sup>[31-34]</sup>

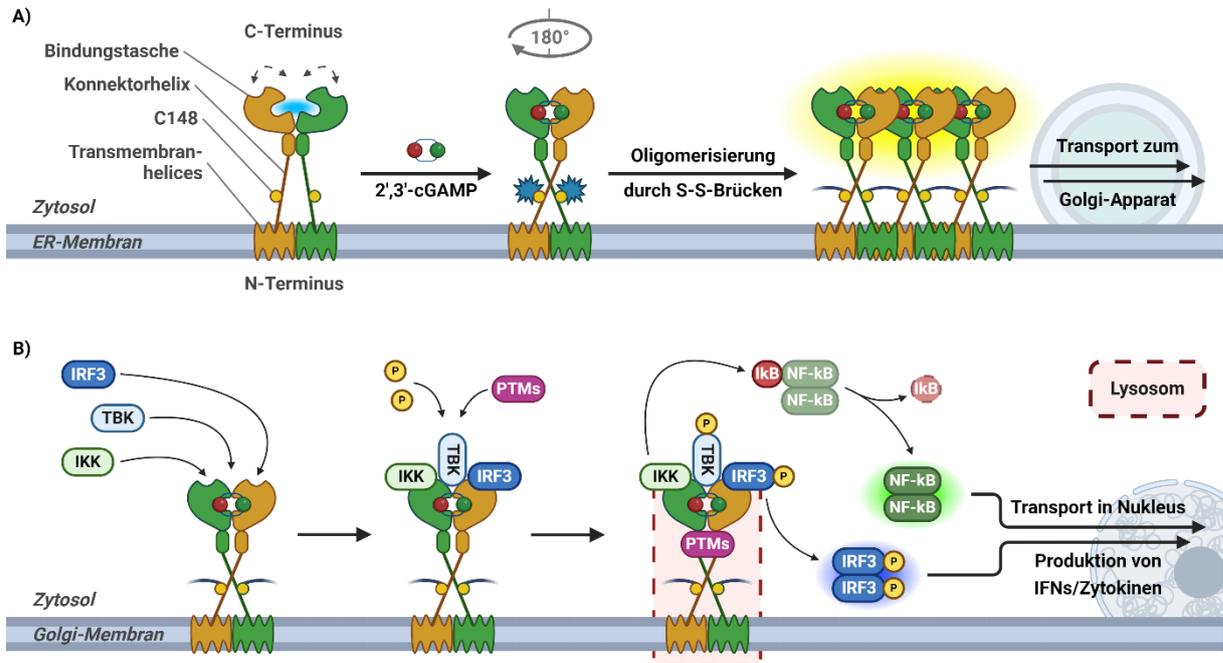


**Abbildung 1.3.** Detaillierte schematische Darstellung der Wirkweise von cGAS in Gegenwart von dsDNA. **A)** cGAS detektiert dsDNA, bildet daraufhin Tritleiterstrukturen aus mehreren cGAS und dsDNA aus und wird aktiviert. **B)** In der katalytischen Domäne wird die Synthese vom *second messenger* cGAMP aus den jeweiligen NTPs katalysiert. Dabei wird zuerst die 2',5'-Bindung ausgehend vom G gebildet. Anschließend wird das lineare Dinucleotid innerhalb der katalytischen Domäne umorientiert und die 3',5'-Bindung wird ausgehend vom A geknüpft. Abbildung erstellt mit *BioRender*.

cGAMP ist der *second messenger* für STING, ein Transmembranprotein, welches in der Membran des ER lokalisiert ist.<sup>[35]</sup> STING besteht aus 379 Aminosäuren (engl. *amino acids*, aa) und liegt dort im inaktiven Zustand als Homodimer vor.<sup>[36]</sup> Es sind mehrere Isoformen von STING bekannt, welche sich hauptsächlich in ihrer Sensitivität gegenüber CDNs bakteriellen Ursprungs unterscheiden.<sup>[37]</sup> Die einzelnen Monomere von STING sind am N-Terminus mit jeweils vier Transmembranhelices in der Membran verankert und weisen neben den Konnektorhelices als Homodimer eine trichterförmige Bindungstasche für CDNs am C-Terminus auf. Bei Interaktion mit cGAMP oder anderen CDNs rotiert die Bindungsdomäne, schließt diese ab und wird dabei aktiviert.<sup>[38, 39]</sup> Dieser Prozess führt anschließend zu einer Oligomerisierung von mehreren Homodimeren über Disulfidbrücken an den Konnektorhelices.<sup>[40]</sup> Nach der Oligomerisierung wird STING über COP-II-Vesikel (engl. *coat protein complex*) vom ER zum Golgi-Apparat transportiert (**Abbildung 1.4A**).<sup>[41, 42]</sup>

Einmal am Golgi-Apparat angelangt findet eine Signalkaskade statt, welche durch die Anwesenheit von STING ausgelöst wird. Dabei wird STING an Cys88 bzw. Cys91 palmitoyliert, TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) daraufhin rekrutiert und eine Reihe an Phosphorylierungen finden anschließend statt.<sup>[43, 44]</sup> Dabei wird TBK1 als Erstes phosphoryliert, welches wiederum STING phosphoryliert. Daraufhin werden weitere Proteine rekrutiert und phosphoryliert, in manchen Fällen wird auch IKKe (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon) aktiviert. Letztendlich führt diese Signalkaskade zu aktivierten Homodimeren der phosphorylierten Transkriptionsfaktoren IRF3 (engl. *interferon regulatory factor 3*) und NF-κB (engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), die in den Nukleus transportiert werden und so die Transkription von Genen starten, welche für Typ-I Interferone (IFNs) und Zytokine kodieren.<sup>[45-50]</sup> IFNs und Zytokine aktivieren daraufhin beispielsweise inflammatorische und auch pathogen-spezifische Immunantworten, mitunter durch die adaptive Immunantwort.<sup>[51, 52]</sup> Nach der Aktivierung und der Produktion der Interferone und Zytokine wird STING endolysosomal abgebaut. Alternativ kann STING auch durch COP-I-Vesikel zum ER zurücktransportiert werden (**Abbildung 1.4B**).<sup>[42]</sup>

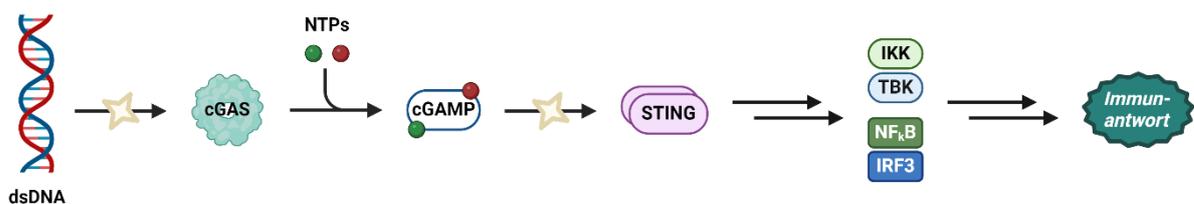
### 1.1.3 Die cGAS-STING-Kaskade als therapeutisches Ziel



**Abbildung 1.4.** Detaillierte schematische Darstellung der Wirkweise von STING in Gegenwart von CDNs. **A)** STING-Homodimere werden von CDNs, vorrangig cGAMP, aktiviert. Dabei ändert sich die Geometrie der Bindungstasche und eine Oligomerisierung findet über Disulfidbrücken an den Konnektorhelices statt. Anschließend werden die STING-Oligomere über COP-II-Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert. **B)** Transkriptionsfaktoren bzw. deren Vorläufer interagieren mit STING, dabei werden sowohl diese als auch STING posttranslational modifiziert (meist phosphoryliert). Dies führt zu aktiven Transkriptionsfaktoren, welche anschließend in den Nukleus transportiert werden und so die Produktion von Interferonen und Zytokinen auslösen. Abbildung erstellt mit *BioRender*.

### 1.1.3 Die cGAS-STING-Kaskade als therapeutisches Ziel

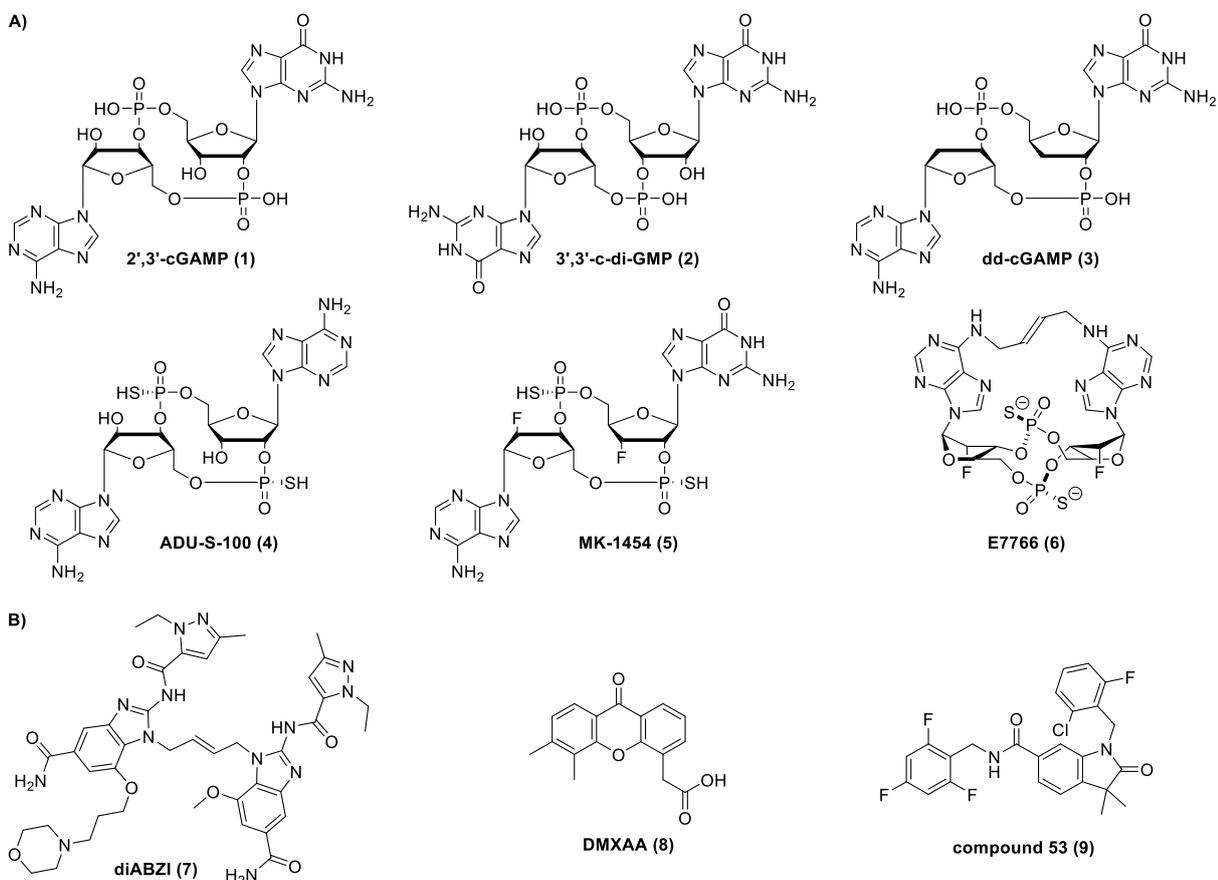
Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Fehlregulierung der cGAS-STING-Kaskade maßgeblich mit vielerlei Arten von Erkrankungen in Verbindung gebracht werden kann. Dabei spielt in erster Linie nicht nur STING, sondern auch cGAS eine wichtige Rolle. Aber, auch die mit diesem Signalweg assoziierten Proteine, die mit den Namensgebern auf direkte oder indirekte Weise interagieren, sind an diesen Erkrankungen beteiligt. Aufgrund dieser Erkenntnisse und ihrer sehr linearen Wirkweise ist die cGAS-STING-Kaskade als wissenschaftliches Thema und mögliches therapeutisches Ziel zur potenziellen Behandlung bestimmter Krankheiten ins Blickfeld gerückt (**Abbildung 1.5**). Dabei lassen sich die Ursachen der zuvor genannten Krankheitsbilder generell in zwei Kategorien einteilen: eine Überregulierung oder eine Unterregulierung der cGAS-STING-Kaskade.<sup>[53]</sup>



**Abbildung 1.5.** Vereinfachte Darstellung der Wirkweise der cGAS-STING-Kaskade. dsDNA aktiviert cGAS, welches daraufhin cGAMP, den *second messenger* für STING, produziert. Nach der Aktivierung von STING durch cGAMP (oder andere CDNs) startet eine Immunantwort. Abbildung erstellt mit *BioRender*.

Die Entstehung von Krebs, zelluläre Seneszenz oder ein erhöhtes Infektionsrisiko wird unter anderem mit einer Runterregulierung der cGAS-STING-Kaskade in Verbindung gebracht.<sup>[54-57]</sup> Durch die nur begrenzt produzierten Interferone und Zytokine bei einer Unterregulierung wird eine nachfolgende Immunantwort nicht oder nur schwach aktiviert. Unter anderem scheint die Aktivierung der cGAS-STING-Kaskade und die Freisetzung von Typ-I Interferonen essenziell für die Regulation von verschiedenen Typen von T-Zellen und damit zur effektiven Bekämpfung einer beginnenden Krebserkrankung zu sein.<sup>[58-60]</sup>

Deshalb wurden Aktivatoren als Therapeutika bei einer Unterregulierung von STING entwickelt und viele dieser Substanzen wurden auf der Basis von CDNen entwickelt (**Abbildung 1.6A**). Neben dem endogenen *second messenger* cGAMP (**1**) und bakteriellen Vertretern wie 3',3'-c-di-GMP (**2**)<sup>[61]</sup>, wurden auch viele Analoga synthetisiert. Diese Substanzen weisen meist Modifikationen zur Verbesserung von physikochemischen Eigenschaften auf, beispielsweise an den Zuckern wie bei dd-cGAMP (**3**)<sup>[62, 63]</sup>, am Phosphatrückgrat (**4**)<sup>[64]</sup> oder sogar an beiden (**5**)<sup>[65]</sup>. In manchen Fällen sind auch Modifikationen an den Nukleinbasen vorzufinden, wie im Falle des verbrückten CDNen E7766 (**6**).<sup>[66]</sup> Des Weiteren wurden auch *small molecules* mit potenziell besseren pharmakokinetischen Eigenschaften als Aktivatoren synthetisiert, welche ebenfalls mit der CDN-Bindungstasche interagieren können (**Abbildung 1.6B**).<sup>[67-69]</sup> Allerdings konnte in einigen Fällen eine starke Diskrepanz der Aktivität zwischen humanem und tierischen STING festgestellt werden.<sup>[70]</sup>

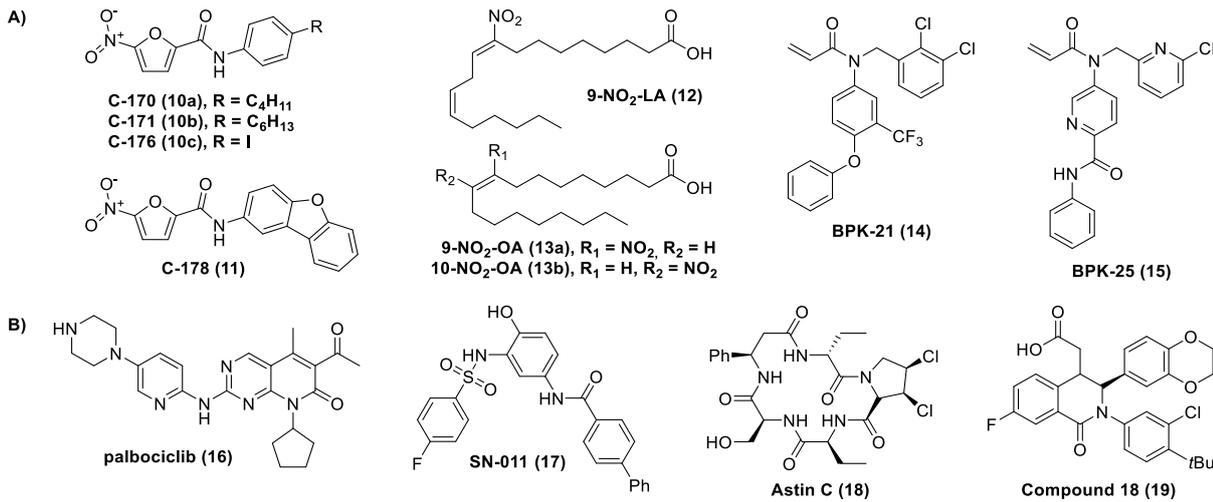


**Abbildung 1.6.** Übersicht über eine Auswahl von bekannten Aktivatoren von STING.<sup>[62-69]</sup> **A)** Einige Vertreter auf Basis von CDNen. **B)** Einige Vertreter auf Basis von *small molecules*.

Eine Überregulierung der cGAS-STING-Kaskade führt zu einer starken, permanent auftretenden Immunantwort und damit zu einer andauernden Produktion von Interferonen und Zytokinen, was chronisch-inflammatorischen Erkrankungen zur Folge hat. Je nach Art der Dysfunktion in und um die cGAS-STING-Kaskade können diese inflammatorischen Erkrankungen auf bestimmte Organe begrenzt oder systemisch auftreten. Dabei liegt der Kern dieser Erkrankungen nicht unbedingt in der Fehlfunktion von cGAS oder STING selbst, denn ein Großteil wird mit einer Fehlfunktion der Proteine in Verbindung gebracht, welche an der Regulation von cGAS oder STING beteiligt sind.<sup>[71]</sup>

Die STING-assoziierte Vaskulopathie mit Beginn in der Kindheit (engl. *STING-associated vasculopathy with onset in infancy*, SAVI) ist eine der wenigen Fälle, bei der STING durch funktionsgewinnende Mutationen (engl. *gain-of-function mutation*, mGOF) in Abwesenheit von cGAMP aktiv ist.<sup>[72]</sup> Ein beeinträchtigter Rücktransport von STING zum ER durch die gestörte Funktion von COP-I hat jedoch ähnliche Auswirkungen auf die Aktivität von STING, was sich in dem sogenannten COPA-Syndrom äußert.<sup>[73, 74]</sup> Beiden Erkrankungen gemein ist eine Erkrankung der Lunge und der Gelenke. Die Abwesenheit bzw. Mutationen von TREX1 führen beispielsweise zu einer Akkumulation von dsDNA im Zytosol, was zu einer dauerhaft erhöhten Aktivität von cGAS und somit auch STING führt und mit verschiedenen Formen der Erkrankung *Lupus* (SLE) und dem *Aicardi-Goutieres-Syndrom* (AGS, eine Art der Enzephalopathie) in Verbindung gebracht wird.<sup>[16, 75, 76]</sup> Außerdem scheint die Aktivierung der cGAS-STING-Kaskade durch mitochondriale Schäden und einer damit verbundenen Freisetzung von mitochondrialer DNA (mtDNA) auch im Zusammenhang mit verschiedenen Arten von *Arthritis* und neurodegenerativen Erkrankungen wie *Amyotrophe Lateralsklerose* (ALS) oder *Parkinson* zu stehen.<sup>[74, 77, 78]</sup> Des Weiteren scheinen schwere Fälle von COVID-19 in Verbindung mit einer verzögerten Aktivierung der cGAS-STING-Kaskade und einer Akkumulation der IFNs zu stehen.<sup>[79]</sup>

Vieler dieser Erkrankungen könnten durch die Entwicklung von Inhibitoren gegen die cGAS-STING-Kaskade behandelt werden (**Abbildung 1.7**). Zwar sind viele andere Proteine an der Regulation der Kaskade beteiligt, jedoch führt die übermäßige Produktion der IFNs durch die Aktivierung von STING zu den chronisch-inflammatorischen Erkrankungen. Die Produktion der Interferone erfolgt erst nach dem Transport von STING zum Golgi-Apparat und der Interaktion von STING mit TBK1. Dafür sind bestimmte weitere Vorgänge nötig, wie die Oligomerisierung für den Transport vom ER zum Golgi-Apparat und die Palmitoylierung für die Interaktion zwischen STING und TBK1.<sup>[40-44]</sup> Deshalb wurden viele Inhibitoren entwickelt, welche diese Prozesse unterbinden oder stören sollen, indem sie entweder kovalent mit den Konnektorhelices (**Abbildung 1.7A**)<sup>[80-82]</sup> oder nicht-kovalent mit der CDN-Bindungstasche (**Abbildung 1.7B**)<sup>[83, 84]</sup> interagieren.

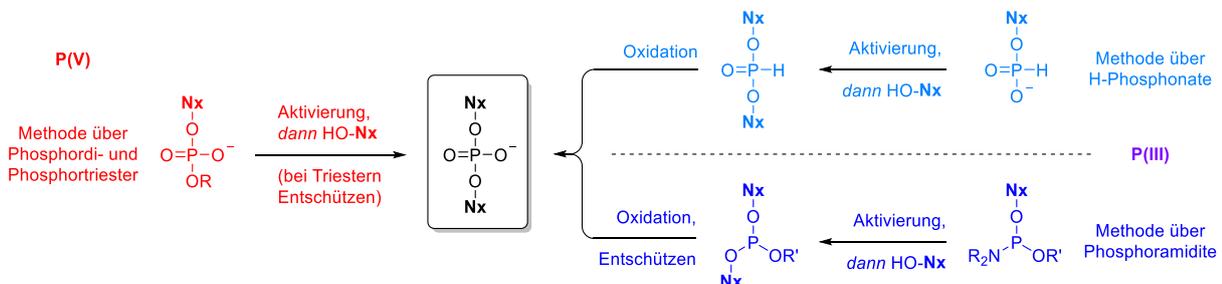


**Abbildung 1.7.** Auswahl einiger Inhibitoren von STING.<sup>[80-84]</sup> **A)** Inhibitoren, die kovalent im Bereich der Konnektorhelices an STING binden und so die Palmitoylierung oder Oligomerisierung stören. **B)** Inhibitoren, welche nicht-kovalent mit der CDN-Bindungstasche und somit als kompetitive Inhibitoren von STING agieren.

### 1.1.4 Chemischer Zugang zu zyklischen Dinukleotiden

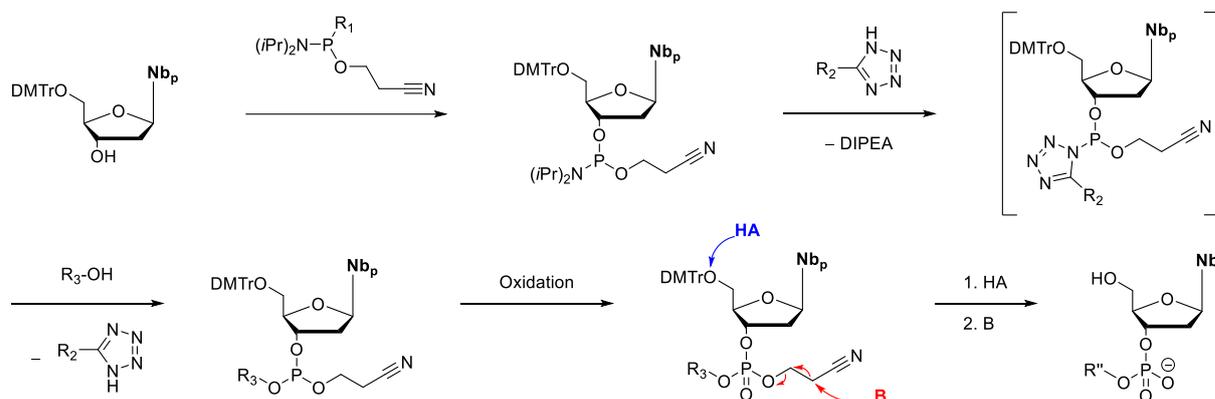
Modifizierte zyklische Dinukleotide (CDNs) sind wahrscheinlich die größte Stoffklasse von STING-Aktivatoren, die bisher von Forschenden untersucht und synthetisiert worden ist.<sup>[85, 86]</sup> Dieses Kapitel soll sich dem synthetischen Zugang zu Molekülen dieser Stoffklasse widmen.

Im Laufe der Jahre haben sich viele verschiedene chemische Methoden etabliert, um Phosphordiester zu synthetisieren. Der Hauptunterschied lässt sich dabei in der Oxidationsstufe des Phosphors zum Zeitpunkt der Verknüpfung finden. Zum einen können Di- bzw. Oligonukleotide direkt über deren Monophosphate mit der Oxidationsstufe +V hergestellt werden, zum anderen können diese aber auch aus Vorläufern mit der Oxidationsstufe +III, wie H-Phosphonaten oder Phosphoramiditen, hergestellt werden (**Abbildung 1.8**). Erste Synthesen ausgehend von freien 5'- oder 3'-Phosphaten führten zwar in wenigen Schritten, aber nur meist sehr unspezifisch und in sehr geringen Ausbeuten zu CDNs. In manchen Fällen konnten auch Oligomerisierung beobachtet werden. Zwar konnten Ausbeuten mit Hilfe von Aktivatoren erhöht werden, jedoch haben sich die Synthesemethoden über Zeit hin zu Ansätzen entwickelt, welche meist über die Oxidationsstufe +III und linearen Dinukleotiden zu CDNs führen.<sup>[86]</sup>



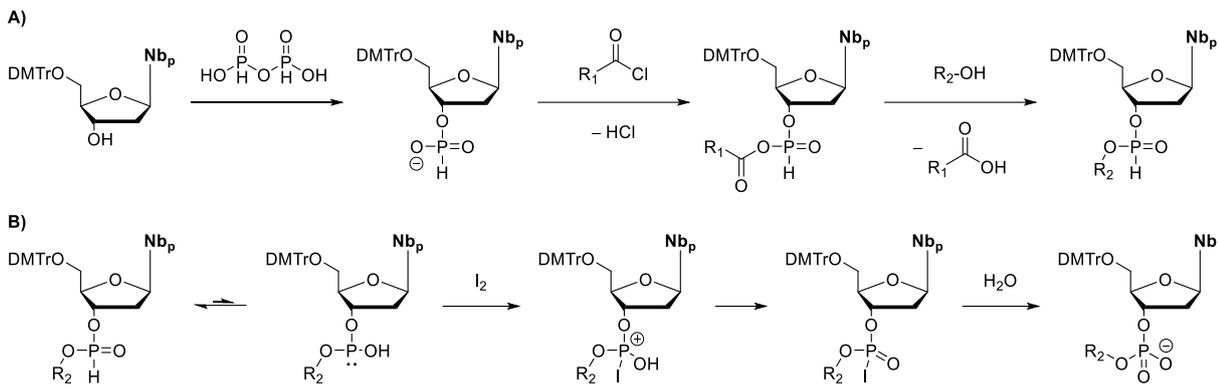
**Abbildung 1.8.** Chemische Möglichkeiten zum Aufbau von Phosphordiesterbindungen zwischen zwei Nucleosiden bzw. Nucleotiden, ausgehend von der Oxidationsstufe +V (rot) oder der Oxidationsstufe +III (blau) der Phosphorspezies.<sup>[86]</sup>

Die Phosphoramidit-Chemie wurde Ende des 20. Jahrhunderts entwickelt<sup>[87-89]</sup> und hat sich mittlerweile als die Methode der Wahl für die großtechnische Synthese von Oligonukleotiden durchgesetzt (**Abbildung 1.9**).<sup>[90, 91]</sup> Klassischerweise wird das jeweilige Phosphoramidit eines Nucleosids durch dessen Umsetzung mit einer reaktiven Phosphoramidit-Spezies erhalten. Die Regioselektivität am Nucleosid ergibt sich dabei aus der Position der Schutzgruppen und des freien umzusetzenden Alkohols.<sup>[92, 93]</sup> Die nachfolgende Reaktion zum jeweiligen Phosphordiester verläuft in der Regel in 3 Schritten: Als Erstes wird die Diisopropylamino-Gruppe am Phosphoramidit zeitweilig durch eine aktivierende Spezies, meist ein Tetrazolderivat, ersetzt, um so den Phosphor für einen nukleophilen Angriff, beispielsweise durch einen Alkohol, zu aktivieren. Wird hier ein 5'-freies Nucleosid oder Nucleotid als Alkohol verwendet, kommt es zu einer Kettenverlängerung und ermöglicht so die Synthese von Oligonukleotiden. Bei diesem nukleophilen Angriff entsteht ein Phosphit(III)-triester, welcher anschließend zum stabileren Phosphor(V)-triester oxidiert wird. Um zu den gewünschten Phosphordiestern zu gelangen, kann die Cyanoethyl-Schutzgruppe nach einem E1<sub>cb</sub>-Mechanismus durch eine nicht-nukleophile Base entfernt werden.<sup>[92-94]</sup>



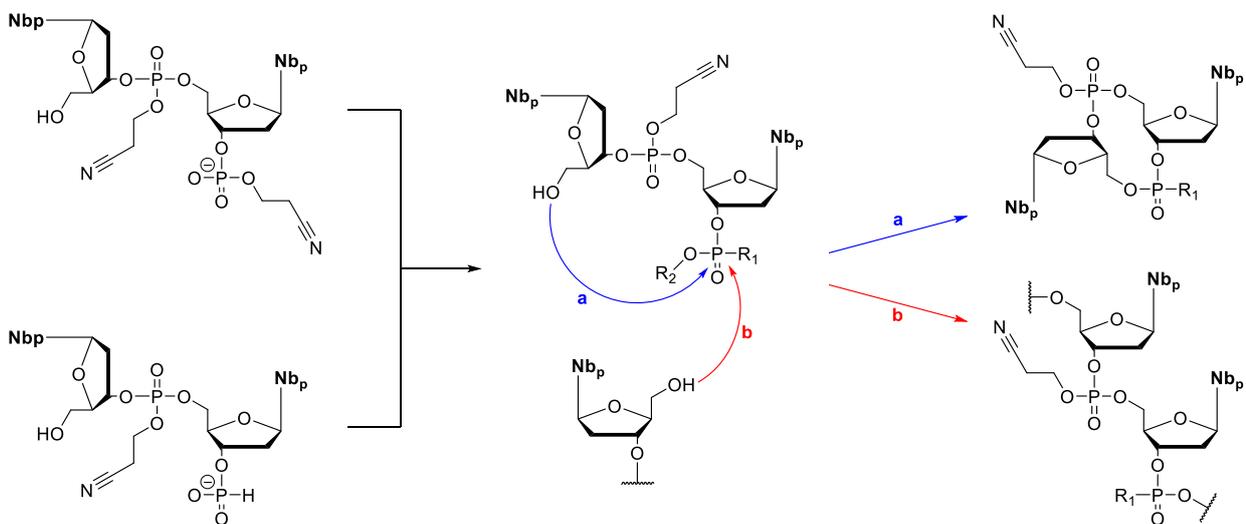
**Abbildung 1.9.** Vereinfachte Darstellung der Phosphoramidit-Chemie, ausgehend von einem geschützten Desoxyribonucleosid. Nach Einführen des Phosphoramidits am Nucleosid wird über einen Aktivator eine Kopplung mit einem Alkohol durchgeführt. Der so erhaltene Phosphit(III)-triester wird anschließend zum Phosphor(V)-triester oxidiert und die Schutzgruppen werden abgespalten. Nb<sub>p</sub> = geschützte Nucleobase, R<sub>1</sub> = N(*i*Pr)<sub>2</sub> / Cl, R<sub>2</sub> = aliphatisch / aromatisch, R<sub>3</sub> = primärer Alkohol.

Die H-Phosphonat-Chemie kann als Vorläufer der Phosphoramidit-Chemie betrachtet werden und wurde in den 1950er Jahren entwickelt (**Abbildung 1.10**).<sup>[95, 96]</sup> Sie kommt ohne Cyanoethyl-Schutzgruppe aus, stattdessen wird das freie H-Phosphonat meist direkt durch die Umsetzung eines entsprechenden Nucleosids mit einer reaktiven Phosphorspezies erhalten.<sup>[97, 98]</sup> Um das H-Phosphonat für einen nukleophilen Angriff zu aktivieren, wird es zu einem gemischten Säureanhydrid umgesetzt.<sup>[99]</sup> Durch den nukleophilen Angriff eines Alkohols wird dann eine Carbonsäure oder ein Phosphat freigesetzt (**Abbildung 1.10A**) und der erhaltene Phosphonsäureester wird anschließend oftmals über eine Iodophosphonium-Spezies unter wässrigen Bedingungen zum Phosphordiester oxidiert.<sup>[100]</sup> Dabei entsteht zugleich, aufgrund der fehlenden Cyanoethyl-Schutzgruppe, eine Ladung am Phosphordiester (**Abbildung 1.10B**). Auch dieses Verfahren kann zur Synthese von Oligonukleotiden verwendet werden.<sup>[101-103]</sup>



**Abbildung 1.10.** Vereinfachte Darstellung der H-Phosphonat-Chemie, ausgehend von einem geschützten Desoxyribonucleosid. **A)** Nach Einführen des freien H-Phosphonates wird unter Aktivierung eine Kopplung durchgeführt. **B)** Das H-Phosphonat wird über eine Iodophosphoniumspezies zum Phosphat oxidiert. Nb<sub>p</sub> = geschützte Nucleobase, R<sub>1</sub> = aliphatisch / aromatisch, R<sub>2</sub> = primärer Alkohol.

Der Schlüsselschritt zum Zugang zu CDN ist jedoch die Zyklisierung des linearen Dinucleotids (**Abbildung 1.11**). Bei einem Verfahren rein auf Basis der Phosphoramidit-Chemie wird das erste Phosphat gezielt orthogonal geschützt, um die so eingeführte Schutzgruppe nach der linearen Kupplung selektiv entfernen zu können und das Molekül zur Zyklisierung vorzubereiten.<sup>[104, 105]</sup> Bei einem Verfahren über H-Phosphonat-Chemie ist dies nicht notwendig; hier kann nach einer Linearisierung mit einem Phosphoramidit direkte eine Zyklisierung stattfinden, stattdessen muss hier noch eine anschließende Oxidation erfolgen.<sup>[106-108]</sup> In beiden Fällen wird die jeweilige negativ geladene Spezies für einen nukleophilen Angriff aktiviert. Bei diesem Schlüsselschritt können jedoch zwei untereinander konkurrierende Reaktionen auftreten. Zum einen kann die gewünschte intramolekulare Zyklisierung zum CDN erfolgen (Weg **a**), zum anderen kann eine intermolekulare Oligomerisierung stattfinden (Weg **b**). Obwohl man mit der Wahl optimaler Reaktionsparameter eine intermolekulare Reaktion weitestgehend unterbinden kann, erfolgt die intramolekulare Zyklisierung aufgrund vieler Faktoren langsam. Einer der Hauptgründe dafür ist die notwendige korrekte räumliche Orientierung bei der Makrozyklisierung.<sup>[109]</sup>



**Abbildung 1.11.** Vereinfachte Darstellung der Konkurrenz zwischen intramolekularer Zyklisierung (**a**) und intermolekularer Oligomerisierung (**b**) eines aktivierten linearen Dinucleotids. R<sub>1</sub> = H oder O-Cyanoethyl, R<sub>2</sub> = Aktivator.

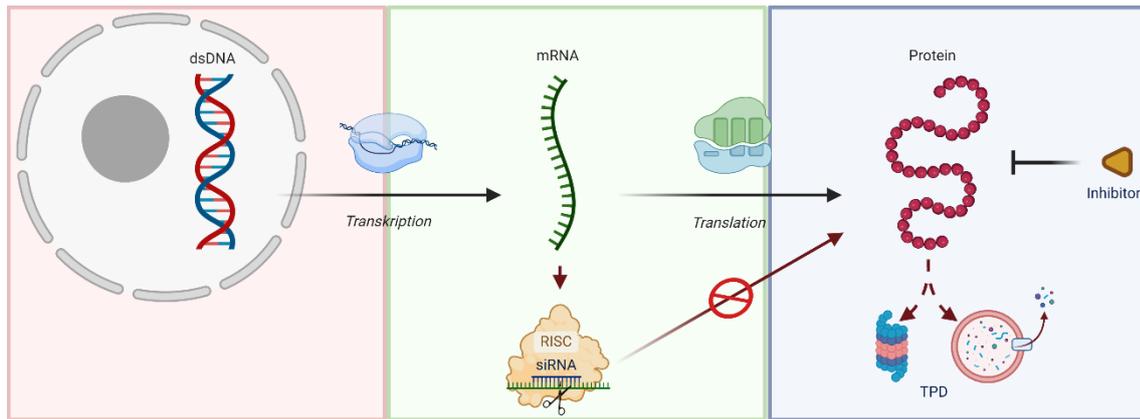
## 1.2 Die PROTAC-Technologie als neues therapeutisches Mittel

### 1.2.1 Targeted Protein Degradation in der modernen Medizin

Während sich die Grundsteine der Medizin bis in die Antike datieren lassen, liegt die Entstehung der modernen Medizin, so wie wir sie kennen, noch keine 200 Jahre zurück. Sowohl moderne Methoden zur Diagnostik als auch die Prävention und Behandlung von Krankheiten mit Hilfe von Impfungen, Antibiotika und somit auch die Entwicklung von essenziellen Medikamenten lassen sich auf die Zeit des 19. und 20. Jahrhundert zurückführen.<sup>[110-112]</sup> Bis heute sind unentwegt Durchbrüche und Entdeckungen gemacht worden, welche neue Behandlungsmöglichkeiten von Krankheiten eröffnen können. Einige Beispiele dafür sind Antikörper<sup>[113]</sup>, Virostatika auf Basis modifizierter Nukleoside<sup>[114, 115]</sup> oder die Revolution von Impfstoffen durch mRNA-Vakzine<sup>[116]</sup>.

Den Großteil der heute verwendeten Medikamente machen aber immer noch niedermolekulare Verbindung (engl. *small molecules*) chemisch-synthetischen Ursprungs aus. Diese Substanzen dringen in Zellen ein und interagieren mit bestimmten Proteinen als Agonisten (beispielsweise als Co-Enzym) oder Antagonisten (beispielsweise als allosterische oder kompetitive Inhibitoren).<sup>[117]</sup> Vor allem oral verabreichte Medikamente, welche einen Großteil der verfügbaren Medikamente ausmacht, sind meist *small molecules* und folgen der 5er-Regel (engl. *Lipinski's rule of five*).<sup>[118, 119]</sup> Während diese Substanzen aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts gute pharmakokinetische Eigenschaften besitzen und synthetisch meist verhältnismäßig leicht zugänglich sind, kann jedoch die Art ihrer Interaktion mit den Zielproteinen problematisch sein. Prinzipiell entfalten diese Substanzen ihre Wirkung durch eine direkte Interaktion mit einem katalytischen Zentrum des Zielproteins. Ein weiterer Nachteil ist, dass eine hohe intrazelluläre Konzentration dauerhaft benötigt wird, um Proteine über längere Zeit zu aktivieren oder zu inhibieren. Jedoch besitzen nur ein Bruchteil der bekannten Proteine solche Bindungstaschen, der Großteil aller Proteine ist nicht durch solche Substanzen angreifbar.<sup>[120-122]</sup>

Proteolyse-induzierende Chimären (engl. *proteolysis targeting chimeras*, PROTACs) agieren auf derselben Ebene wie traditionelle Medikamente, also post-translatorisch, senken jedoch die intrazellulären Level eines Zielproteins, anstatt ihre Funktion zu verhindern. Sie gehören damit zu einer neuartigen und recht jungen Substanzklasse zum gezielten Proteinabbau (engl. *targeted protein degradation*, TPD), die sich dafür aktiv an zellulären Funktionen bedienen, welche an der Balance des Proteinhaushaltes mitwirken. Substanzen dieser Stoffklasse manipulieren körpereigene Mechanismen, um hochspezifisch Zielproteine zum Abbau zu markieren.<sup>[123-125]</sup> Damit haben sie insgesamt einen ähnlichen Effekt auf den Organismus wie *small interference RNA* (siRNA), denn beide Technologien halten die zellulären Mengen eines bestimmten Proteins niedrig. Jedoch agieren siRNAs auf Translationsebene agieren und verhindern so die Expression eines bestimmten Proteins von Vornherein<sup>[126, 127]</sup>, während PROTACs die Expressionsmuster nicht beeinflussen, sondern regulieren die Proteinlevel erst nach der Proteinbiosynthese (**Abbildung 1.12**).



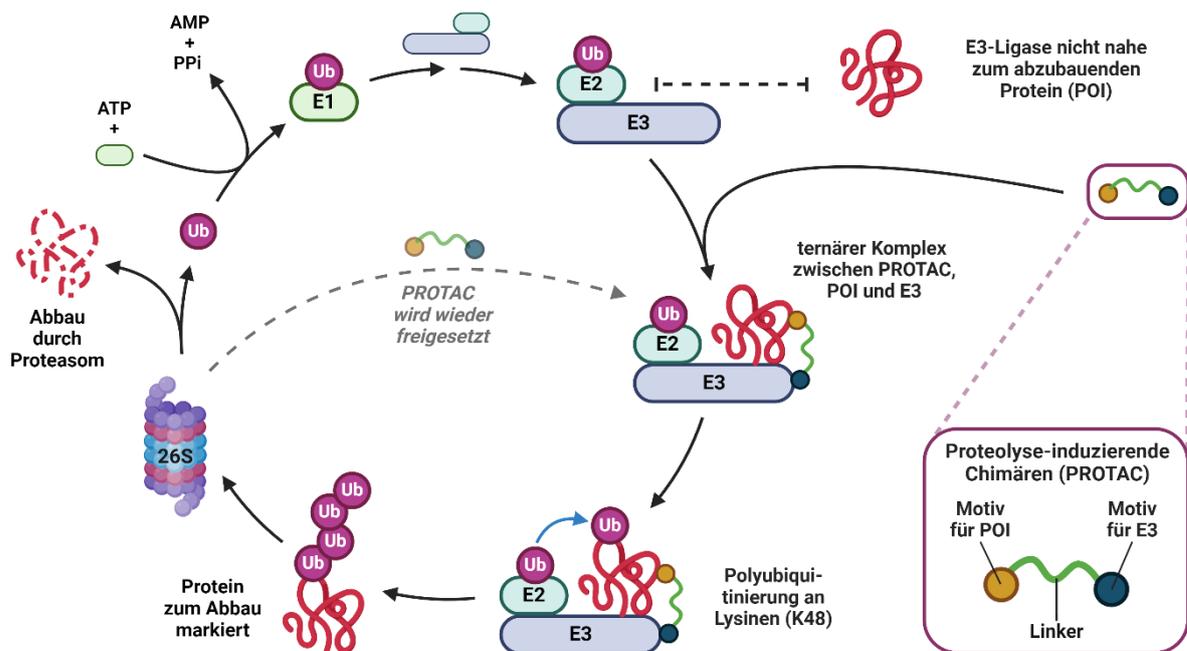
**Abbildung 1.12.** Überblick über verschiedenen Klassen moderner Therapeutika innerhalb des zentralen Dogmas der Molekularbiologie. Das zentrale Dogma besagt, dass genetische Information in Form von dsDNA in mRNA transkribiert wird und anschließend Proteine anhand der Kodierung mittels Translation synthetisiert werden.<sup>[128]</sup> Während klassische Inhibitoren auf Proteinebene (blau) agieren und deren Aktivität negativ beeinflussen, zielt TPD darauf ab, die Proteinlevel selbst negativ zu beeinflussen. Andere Methoden wie RNA-Interferenz (RNAi) zielen auf die mRNA-Ebene (grün) und verhindern so die Translation eines Proteins. Abbildung erstellt mit *BioRender*.

## 1.2.2 Die Funktionsweise von Proteolyse-induzierenden Chimären

Zum Erhalt von Proteinkonzentration und Proteinaktivität greift als intrazellulärer Mechanismus die Proteostase – die Erhaltung des zellulären Gleichgewichts von exprimierten Proteinen. Durch verschiedene Signalwege kann die Menge oder die Aktivität eines bestimmten Proteins, je nach Bedarf und Funktionsweise, herauf- oder herunterreguliert werden. Während ersteres immer dann eintritt, wenn das Protein seine Funktion entfalten soll oder noch nicht in ausreichender Menge vorhanden ist, werden die letzteren Maßnahmen immer dann ergriffen, wenn das Protein nicht mehr gebraucht wird, seine Funktionen bereits entfaltet hat oder es diese beispielsweise durch eine Beeinträchtigung nicht mehr entfalten kann.<sup>[123, 129-132]</sup>

Das Entfernen von problematischen Proteinen aus dem zellulären Gleichgewicht mittels TPD wurde schon um die Jahrtausendwende als potenzielles Konzept zur medizinischen Anwendung diskutiert. Die erste gezielt dafür synthetisierte Substanz, ein PROTAC, wurde 2001 publiziert und bedient sich hierfür an der Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS).<sup>[133]</sup> Das UPS ist ein Mechanismus, welcher zunächst ein abzubauenendes Protein (engl. *protein of interest*, POI) über verzweigte Ubiquitinketten zum Abbau markiert und dieses daraufhin über das 26S-Proteasom abbaut. Ubiquitin (Ub) ist ein 76 aa langes Polypeptid, welches als posttranslationale Modifikation (PTM) meist in verzweigten Ketten auftritt. Die Polyubiquitinierung eines Proteins geschieht durch eine Kaskade von Ligasen, namentlich E1- (Ubiquitin-konjugierendes Enzym), E2- (Ubiquitin-aktivierendes Enzym) und E3-Ligasen (Ubiquitin-transferierendes Enzym), welche diese PTM an das Protein anheften. Nach der Polyubiquitinierung wird das markierte Protein durch das 26S-Proteasom als abzubauenendes Protein erkannt und anschließend in seine Aminosäuren zerlegt, dabei wird Ubiquitin wieder freigesetzt.<sup>[134-136]</sup>

PROTACs greifen in diese Maschinerie ein, indem sie natürliche Markierungsprozesse zum Proteinabbau umgehen und stattdessen ein intaktes POI und eine E3-Ligase in spatio-temporale Nähe zueinander bringen und auf diese Weise den Abbau des POI aktiv induzieren. Ein PROTAC ist ein hochspezifisches, heterobifunktionales Molekül und besteht aus einer Untereinheit, die spezifisch an ein POI bindet, und einer weiteren, die spezifisch an eine E3-Ligase bindet. Diese beiden Motive werden kovalent miteinander verknüpft.<sup>[133]</sup> Der PROTAC bildet dabei in einem ternären Komplex die Brücke zwischen dem POI und der E3-Ligase, was im Idealfall zur erzwungenen Ubiquitinierung des POI führt. Nach Polyubiquitinierung und Abbau des POI wird der PROTAC wieder freigesetzt und kann somit auf eine katalytische Art und Weise mehrere POIs von E3-Ligasen zum Abbau markieren lassen.<sup>[137]</sup> Dabei muss ein PROTAC nicht an die aktiven Zentren von Proteinen binden, denn eine spezifische Interaktion ist vollkommen ausreichend.<sup>[138]</sup> Dies sind große Vorteile zu den typisch verwendeten Medikamenten und eröffnet als Technologie eine viel größere Bandbreite an Proteinen, welche auf diese Weise bei geringerer Dosis adressiert werden könnten (**Abbildung 1.13**).

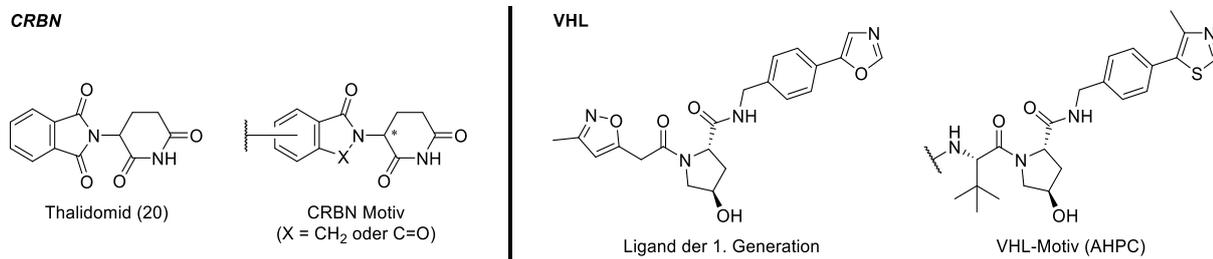


**Abbildung 1.13.** Funktionsweise des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) und von Proteolyse-induzierenden Chimären (PROTACs). PROTACs bedienen sich dafür an natürlichen zellulären Funktionen zum Abbau von Proteinen. Unter normalen Bedingungen werden Proteine im Rahmen des UPS mithilfe von E1-, E2- und E3-Ligasen durch Polyubiquitinierung zum Abbau über das 26S-Proteasom markiert. PROTACs induzieren dieses Verhalten, indem sie zeitgleich das abzubauenende Protein (POI) und eine E3-Ligase binden. Die räumliche Nähe erlaubt es der E3-Ligase die Polyubiquitinierung dann zielgerichtet am POI durchzuführen. Nach Abbau des POI durch das 26S-Proteasom werden sowohl Ubiquitin als auch PROTAC wieder freigesetzt. Auf diese Weise können PROTACs im Gegensatz zu klassischen Inhibitoren ihre Wirkung auf katalytische Weise entfalten. Abbildung erstellt mit *BioRender*.

### 1.2.3 Evolution der TPD und Durchbrüche von PROTACs als Therapeutika

Seit der Geburtsstunde von PROTACs als erste Modalität der TPD sind vielerlei Weiterentwicklungen dazugekommen. Zunächst wäre da einmal die Bandbreite nutzbarer E3-Ligasen. Während von den E3-Ligasen mittlerweile mehrere Hunderte bekannt sind und damit theoretisch die Auswahl für PROTACs stetig wächst<sup>[139]</sup>, kamen bis vor kurzem aufgrund der geringen Anzahl hochspezifischer chemischer Motive nur wenige in Frage.<sup>[140]</sup> Die bisher am meisten verwendeten und am besten untersuchten E3-Ligasen für PROTACs sind wohl von *Hippel-Lindau* (VHL) und *cereblon* (CRBN).<sup>[141]</sup>

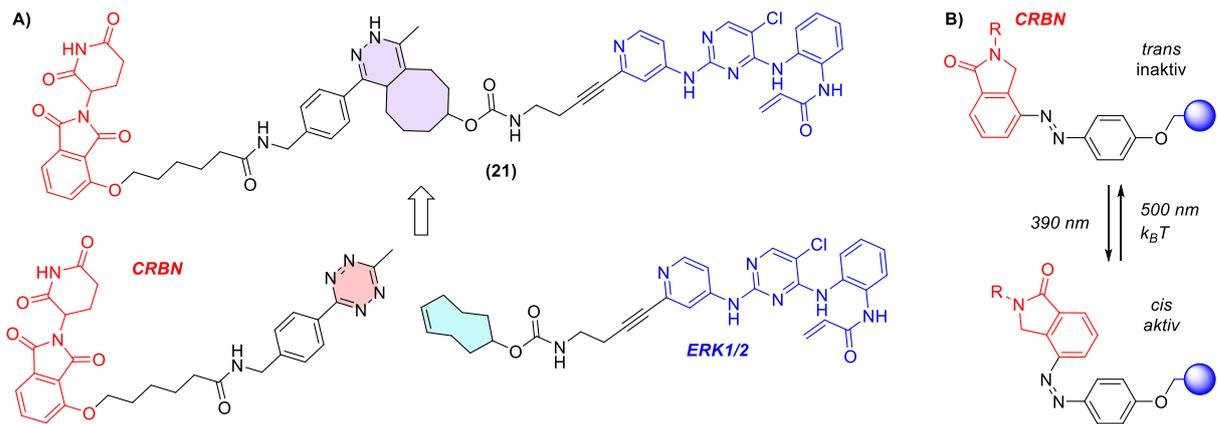
VHL ist ein Tumorsuppressor und baut unter anderem Hypoxie-induzierte Faktoren (HIF) ab. Diese Transkriptionsfaktoren sind mit für Gewebereparatur, Regeneration und Angiogenese zuständig, jedoch wurden auch bestimmte Krankheitsmuster wie inflammatorische Erkrankungen, bestimmte Arten von Krebs und in manchen Fällen auch Anämie und neurologische Defizite mit diesen in Verbindung gebracht.<sup>[142-144]</sup> CRBN ist außerdem an der Regulation von verschiedenen Proteinen beteiligt und ist in Verbindung mit Thalidomid (besser bekannt als *Contergan*) und dessen Derivaten verantwortlich für die Missbildungen von Embryos.<sup>[145-147]</sup> Während sich AHPC, ein VHL-bindender Ligand, von einem Peptidfragment aus dem endogenen Substrat von VHL, nämlich HIF-1 $\alpha$  (engl. *hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ) ableitet<sup>[148, 149]</sup>, basieren Motive für CRBN vorrangig auf Substanzen, welche sich von der in dem Medikament Contergan aktiven Substanz Thalidomid, herleiten lassen (**Abbildung 1.14**).



**Abbildung 1.14.** Strukturen der meistverwendeten Motive für die E3-Ligasen CRBN und VHL und wovon sie sich ableiten.

Während die für die kovalente Verknüpfung verwendeten Linker anfangs nur eine Rolle für die korrekte Distanz zwischen den Motiven für E3 und POI und damit auch für die korrekte Funktionsweise eines PROTACs spielten, können heute durch neue Linkerkonstruktionen weitere Eigenschaften modifiziert oder zusätzlich eingebracht werden. Darunter fallen beispielsweise bessere Löslichkeiten, höhere Zellpermeabilität, oder versteifte Geometrien, um den ternären Komplex stärker zu induzieren.<sup>[150, 151]</sup> Auch können auf diese Art und Weise die aktiven Eigenschaften von PROTACs und ihre Spezifität verbessert werden. Beispielsweise kann PROTACs eine bessere Permeabilität durch Zellmembranen gegeben werden, indem diese in zwei Bausteine aufgeteilt werden, welche sich innerhalb der Zelle von selbst miteinander verknüpfen (sog. CLIPTACs, **Abbildung 1.15A**).<sup>[152]</sup> PROTACs können auch basierend auf der Linkerkonstruktion mit Hilfe von Licht angesteuert werden, wenn innerhalb des Linkers eine photoschaltbare Verknüpfung integriert ist (sog. PHOTACs, **Abbildung 1.15B**).<sup>[153, 154]</sup>

### 1.2.3 Evolution der TPD und Durchbrüche von PROTACs als Therapeutika

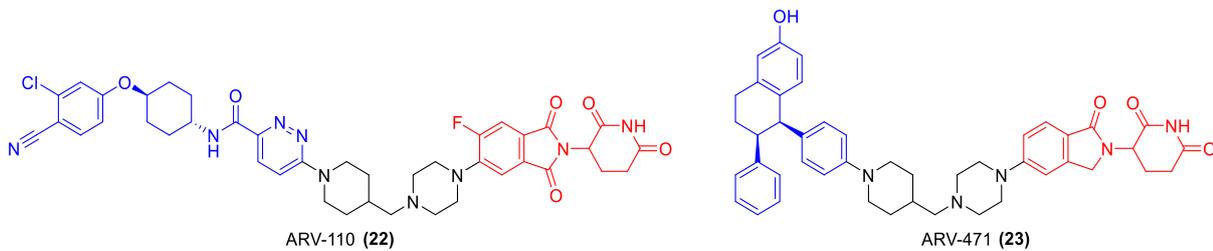


**Abbildung 1.15.** Beispiele der Weiterentwicklung von PROTACs. **A)** Vertreter eines CLIPTACs (**21**), welcher sich aus den beiden Bausteinen selbst verknüpft.<sup>[152]</sup> **B)** Vertreter eines PHOTACs, welcher photochemisch angesteuert werden kann.<sup>[153, 154]</sup> Dabei ist eines der cis-/trans-Konfigurationsisomer aktiv und das andere inaktiv. Rot: Motiv für E3-Ligase, hier CRBN. Blau: Motiv für POI. R = Glutarimid.

Auch die Wirkungsweise der TPD wurde ausgeweitet, sodass anstelle des UPS auch die Autophagie oder ein lysosomaler Abbau induziert werden kann (bekannt als AUTACs oder LyTACs).<sup>[155-158]</sup> Zudem hat sich vor Kurzem die Stoffklasse der molekularen Kleber (engl. *molecular glue*) als Alternative zu PROTACs eröffnet, welche ausschließlich mit einer E3-Ligase interagieren, aber deren Substratspezifität und damit die Bandbreite abzubauen Proteine erweitern können.<sup>[141, 159]</sup>

Das größte Problem besteht jedoch immer noch in der empirisch-iterativen Entwicklung von PROTACs. Für einen produktiven ternären Komplex reicht die reine Anwesenheit der Komponenten nicht aus, sondern neben der hohen Spezifität der Motive zu den Proteinen ist auch die Positionierung der einzelnen Proteine zueinander von hoher Wichtigkeit.<sup>[160]</sup> Zwar sind hier Kristallstrukturanalysen und computergestützte Vorhersagen über die Interaktion zwischen den Proteinen und PROTACs bei deren Entwicklung von Vorteil<sup>[111, 161]</sup>, abschließende Kenntnis über die Effektivität, die Struktur-/Wirkungsbeziehung (engl. *structure-activity-relationship*, SAR) und darauf iterativ aufbauende Struktur- und Syntheseoptimierungen lassen sich aber nur durch biologische Untersuchungen ermitteln.<sup>[162, 163]</sup> Dabei liegt die Herausforderung meist in der Verknüpfung der Motive durch einen geeigneten Linker, da oft Motive für sowohl das POI als auch die E3-Ligase bereits existieren.<sup>[163, 164]</sup>

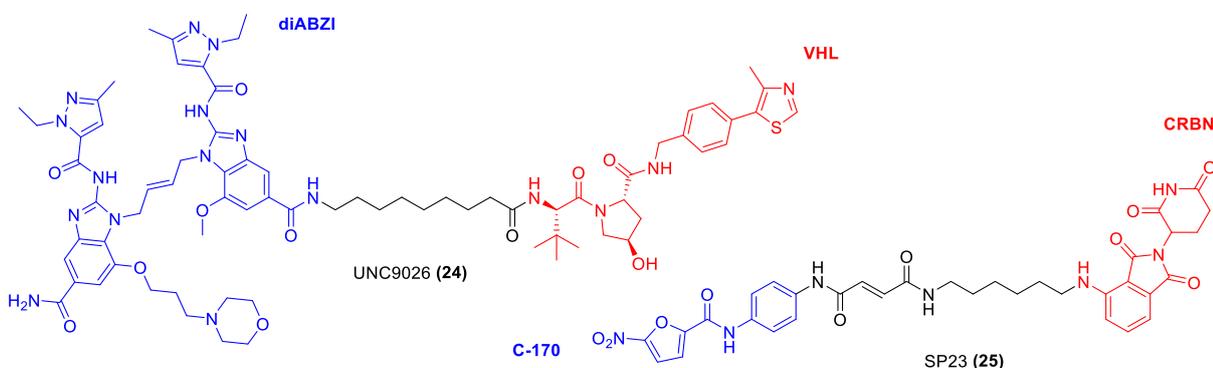
Mittlerweile werden bereits einige PROTACs als potenzielle Medikamente in klinischen Phasen untersucht. Dabei weisen die meisten von ihnen Motive für die E3-Ligase CRBN auf, wohingegen die Mehrheit der in Fachzeitschriften publizierten PROTACs Motive für VHL aufweisen.<sup>[165, 166]</sup> Die bisher am weitesten in klinischen Phasen vorangeschrittenen Substanzen sind von der Firma *Arvinas* entwickelt worden und sollen gezielt den Androgenrezeptor (ARV-110, **22**) bzw. den Östrogenrezeptor (ARV-471, **23**) zum Abbau markieren. Falls die Studien weiterhin positiv ausfallen sollten, könnten diese Substanzen als neue Therapeutika gegen Prostatakrebs bzw. Brustkrebs zugelassen werden (**Abbildung 1.16**).<sup>[167-170]</sup>



**Abbildung 1.16.** Einige der wenigen PROTACs, welche in der klinischen Phase II bzw. III getestet werden. ARV-110 (**22**) wirkt gegen den Androgenrezeptor, während ARV-471 (**23**) gegen den Östrogenrezeptor wirkt. Beide PROTACs weisen Motive für CRBN (rot) und Linker basierend auf Heterozyklen (blau) auf.<sup>[167-170]</sup>

### 1.3 Die cGAS-STING-Kaskade als Ziel der PROTAC-Technologie

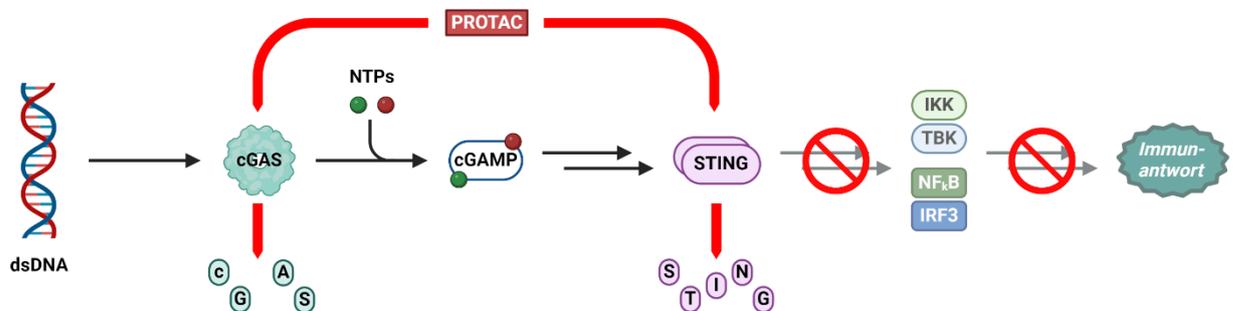
Bislang sind nur zwei STING-PROTACs publiziert worden, welche STING als Ziel von TPD vorsehen. Die Veröffentlichungen geschahen parallel zur Erarbeitung dieser Forschungsarbeit. Im Jahr 2023 konnten ZHU *et al.* eine Substanzklasse präsentieren, welche mit der Bindungstasche für die CDNs interagiert und VHL als E3-Ligase rekrutiert. Dabei wurde das Molekül diABZI (**7**, **Abbildung 1.6b**) als Motiv für STING verwendet und UNC9036 (**24**) kristallisierte sich als die Substanz mit dem höchsten Potential heraus. In Caki-1-Zellen konnte bei dieser Substanz mit Hilfe von Immunoblots eine DC<sub>50</sub> (halb-maximale Abbaukonzentration, engl. *half-maximal degradation concentration*) von unter 250 nM und eine maximale Reduktion von STING um fast 92% ermittelt werden.<sup>[171]</sup> Ein Jahr zuvor konnten LIU *et al.* den STING-PROTAC SP23 (**25**) herstellen, welches CRBN als E3-Ligase rekrutiert und C-170 (**10a**, **Abbildung 1.10a**) als Motiv für STING verwendet. Dieser PROTAC interagiert jedoch nicht wie UNC9036 (**24**) mit der CDN-Bindungstasche, sondern auf eine kovalente Art und Weise im Bereich der Konnektorhelices. Hier liegt die DC<sub>50</sub> in THP-1-Zellen bei etwa 3.2 μM und die Proteinlevel konnten so um etwa 80% reduziert werden.<sup>[172]</sup> Beide Substanzen wurden dabei hauptsächlich hinsichtlich der Linkerlänge optimiert, um die höchstmögliche Effektivität bei niedrigster Konzentration zu erreichen. Dabei kristallisierten sich jedoch insgesamt mehr aktive Substanzen auf Basis von diABZI heraus, was eventuell mit einer größeren Zahl an zugänglichen, ubiquitinierbaren Positionen im Bereich der CDN-Bindungstasche im Vergleich zur Konnektorhelix einhergehen könnte (**Abbildung 1.17**).



**Abbildung 1.17.** Von anderen Forschungsgruppen publizierte STING-PROTACs.<sup>[171, 172]</sup> UNC9036 (**24**) interagiert mit STING durch die CDN-Bindungstasche und rekrutiert VHL, während SP23 (**25**) kovalent an die Konnektorhelices bindet und CRBN rekrutiert. Rot: Motive für E3-Ligasen. Blau: Motive für STING, welche sich aus bekannten *small molecules* ableiten lassen.

## 2 Zielsetzung dieser Dissertation

Ziel dieser Dissertation war es ein Konzept für PROTACs gegen die cGAS-STING-Kaskade zu entwickeln, diese Substanzen zu synthetisieren und auf ihre Aktivität hin zu untersuchen und diese gegebenenfalls zu optimieren. Diese Substanzklasse zeichnet sich sowohl durch ihre katalytische Aktivität als auch ihrer theoretisch breiteren Anwendbarkeit im Vergleich zu *small molecules* aus. Durch die Beeinflussung der zellulären Level von Proteinen innerhalb dieser Kaskade könnte sich ein neuer Weg zur Behandlung von Autoimmun- und autoinflammatorischen Erkrankungen öffnen. Hierbei lag aufgrund der sehr linearen Wirkweise dieser Kaskade innerhalb der angeborenen Immunantwort der Fokus auf den jeweils namensgebenden Proteinen cGAS und, vor allem, STING. Inspiriert von der Natur werden als Grundbausteine dieser PROTACs primär natürliche biologische Substrate der jeweiligen POIs verwendet.



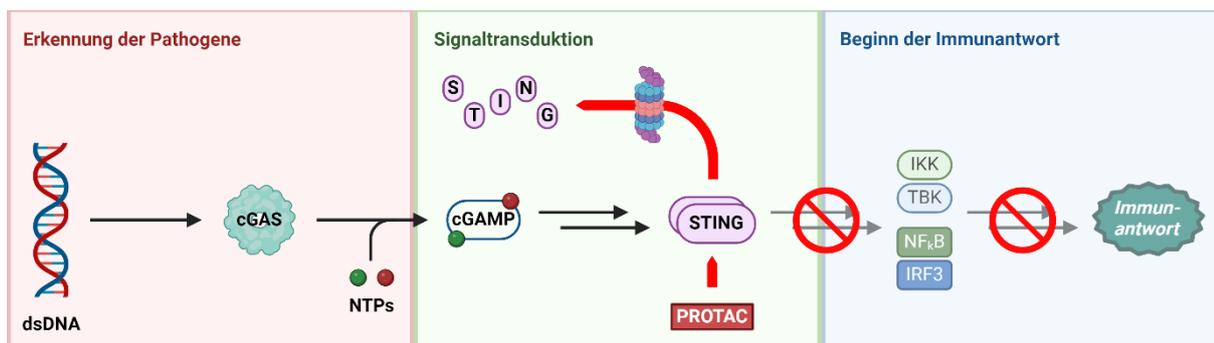
**Abbildung 2.1.** Theoretische Deaktivierung der cGAS-STING-Kaskade durch PROTACs, welche spezifisch cGAS oder STING zum Abbau markieren sollen. So könnte die nachfolgende Signaltransduktion zum Auslösen einer Immunantwort unterbunden werden. Abbildung erstellt mit *Biorender*.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 PROTACs gegen STING auf Basis von CDNs

##### 3.1.1 Syntheseplanung für STING-PROTACs

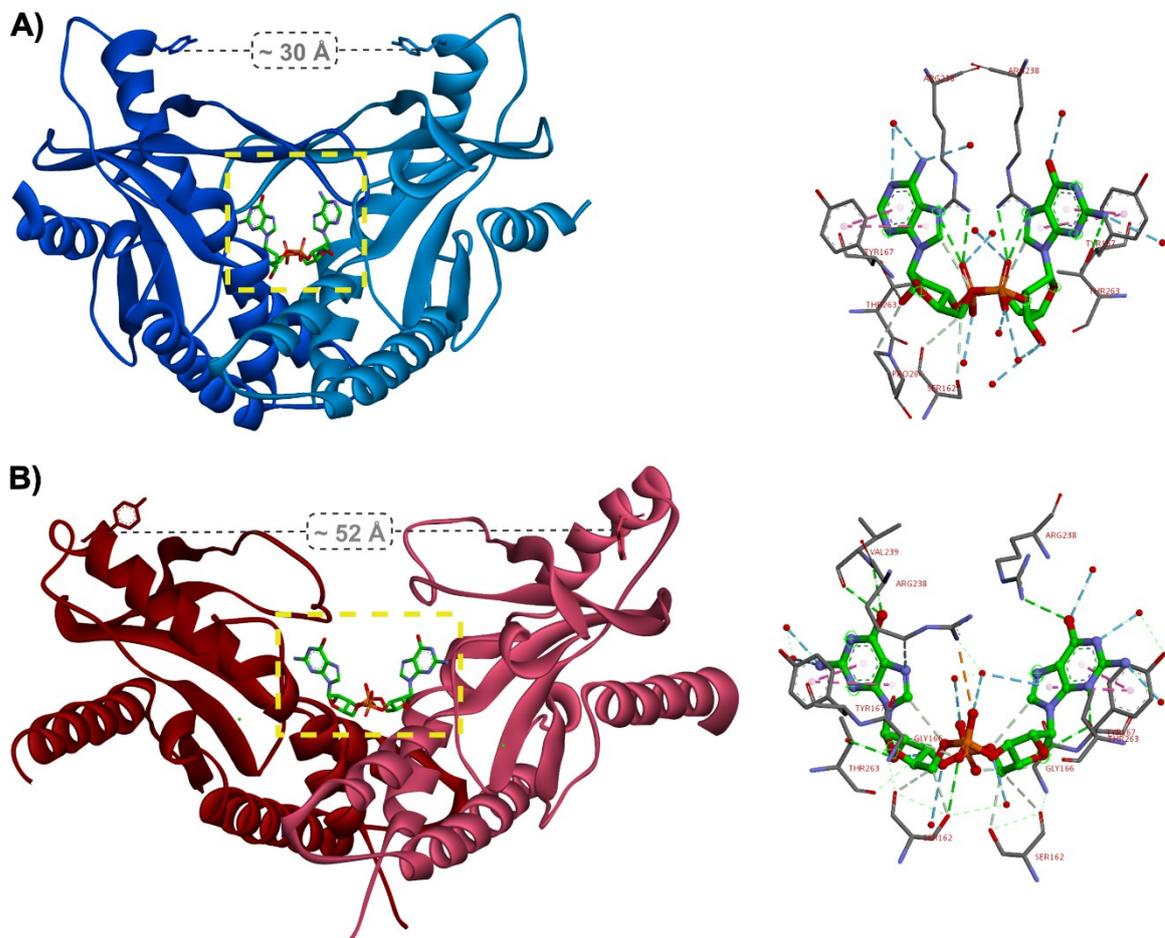
Für die Synthese potenzieller PROTACs gegen STING fiel der Blick auf natürlich vorkommende Moleküle, welche hochspezifisch an STING binden – die zyklischen Dinukleotide (CDNs). Ziel ist es, CDNs auf einer Art und Weise zu modifizieren, sodass diese immer noch hochspezifisch und mit guter Affinität an STING binden und dieses so zum Abbau markieren. So könnte eine aus der Aktivierung von cGAS und STING folgenden Immunantwort unterbunden werden (**Abbildung 3.1**).



**Abbildung 3.1.** Darstellung der negativen Regulation der cGAS-STING-Kaskade mithilfe eines auf STING abzielenden PROTAC. Dieser PROTAC soll anstelle von cGAMP, welches von cGAS bei Detektion von dsDNA synthetisiert wird (links), an STING binden und das Protein somit zum Abbau markieren (Mitte); dadurch wird die nachfolgende Signalkaskade unterbrochen und die angeborene Immunantwort unterbunden (rechts). Abbildung erstellt mit *BioRender*.

Um eine Synthesestrategie hin zu solchen STING-PROTACs zu erarbeiten, musste zunächst festgestellt werden, welche Vertreter der CDNs in Frage kommen und wo die Verknüpfungspunkte zu einem PROTAC eingeführt werden sollen. Dabei muss die mögliche Bildung eines produktiven ternären Komplexes zwischen den beiden Proteinen und dem PROTAC stets priorisiert werden. Während die Länge des Linkers in erster Linie die räumliche Nähe zwischen dem abzubauenen Protein und der E3-Ligase gewährleisten muss, sind die Motive zur Bindung an das abzubauenen Protein und der jeweiligen E3-Ligase von höherer Priorität für die Spezifität des PROTAC. Um die besten Vertreter der CDNs und die besten Positionen für eine Modifikation abschätzen zu können, wurden kristallographische Daten von STING mit CDNs zu Rate gezogen.<sup>[38, 39, 68]</sup> Kristallstrukturanalysen von STING mit verschiedenen CDNs zeigen die Konformationsänderung des Homodimers in Abhängigkeit des anwesenden CDN und zwischen welchen Gruppen bzw. Seitenketten die Interaktion stattfindet (**Abbildung 3.2**). Hierbei fällt auf, dass das Zucker-Phosphat-Rückgrat der CDNs tief in der Bindungstasche liegt und eigentlich nur die Nukleinbasen zugänglich sind. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass weitgehende, teils unnatürliche Modifikationen des Zucker-Phosphat-Rückgrats die Bindungsaffinität stark reduzieren oder gar zum Verlust dieser führen.<sup>[173, 174]</sup> Somit verbleiben die Nukleinbasen als die einzig sinnvoll zu modifizierenden Bestandteile, welche durch  $\pi$ -stacking und Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein interagieren.

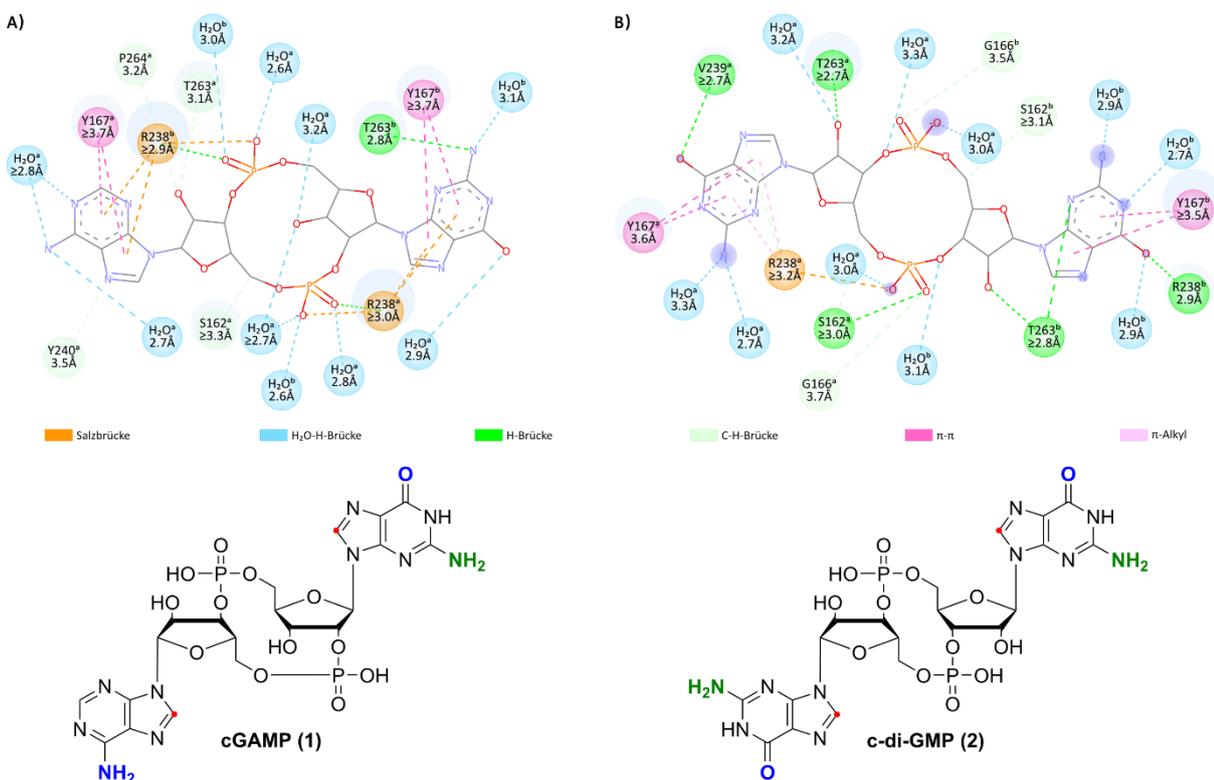
Auf die Frage, welche CDNs zur Auswahl stehen und an welchen Positionen diese modifiziert werden sollen, haben sich zwei Vertreter herauskristallisiert: 2',3'-cGAMP (**1**) und 3',3'-c-di-GMP (**2**). Obwohl cGAMP als natürlicher *second Messenger* eine sehr hohe Bindungsaffinität ( $K_d = 9.23 \text{ nM}$ ) zu STING besitzt,<sup>[175]</sup> und somit Konzentration und Interaktionszeit für die Aktivität eines darauf basierenden PROTACs relativ gering sein müssten, besitzt der aktivierte Komplex eine geschlossene Konformation (**Abbildung 3.2A**).<sup>[68]</sup> Deshalb ist cGAMP im gebundenen Zustand räumlich betrachtet nur schwer zugänglich, was die Bindungsaffinität eines PROTACs aufgrund des benötigten *Linkers* und des E3-Rekruturs und den damit einhergehenden sterischen Ansprüchen stark vermindern könnte. Dagegen weist der Komplex mit c-di-GMP, ein CDN bakteriellen Ursprungs<sup>[176]</sup>, trotz seiner im Vergleich zu cGAMP schlechten Bindungsaffinität ( $K_d = 5 \mu\text{M}$ )<sup>[177]</sup> eine offene Konformation auf (**Abbildung 3.2B**).<sup>[39]</sup> Die offene Konformation könnte eine bessere Interaktion der beiden Proteine innerhalb des ternären Komplexes zulassen.



**Abbildung 3.2. A)** Kristallstruktur des C-Terminus von hSTING<sup>H232</sup> im Komplex mit cGAMP (PDB: 4LOH)<sup>[68]</sup> mit Vergrößerung der mit cGAMP interagierenden Aminosäuren (rechts). **B)** Kristallstruktur des C-Terminus von hSTING im Komplex mit c-di-GMP (PDB: 4F5Y)<sup>[39]</sup> mit Vergrößerung der mit cGAMP interagierenden Aminosäuren (rechts). Distanzen wurden jeweils über den  $\beta$ -Kohlenstoff von Y186 bestimmt. cGAMP bildet eine geschlossene Konformation aus, dagegen bindet bakterielles c-di-GMP in einer offenen Konformation, welche der von apo-STING sehr ähnelt.<sup>[38]</sup> Abbildung erstellt mit *Biovia Discovery Studio Visualizer 2024*.

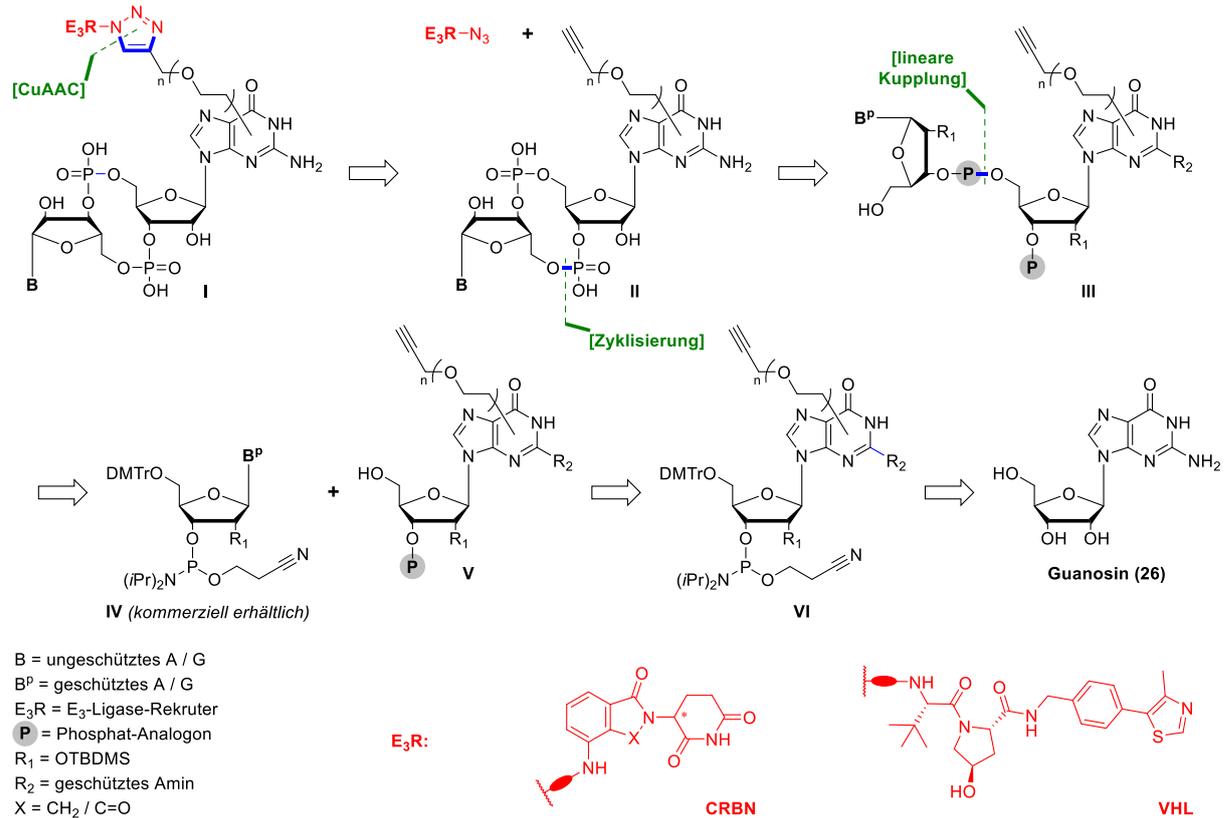
Die Positionierung einer Modifikation an den Nukleinbasen zur Synthese eines produktiven PROTACs ist jedoch nicht trivial, denn neben dem  $\pi$ -stacking der Purine sind auch viele der Heteroatome an Wasserstoffbrückenbindungen zum STING-Homodimer beteiligt (**Abbildung 3.3**). Um die Bindungsaffinität so wenig wie möglich einzuschränken, haben wir uns entschieden die Modifikationen der Nukleinbasen an gezielten ausgewählten Positionen zu untersuchen. Dabei lag der Fokus auf den Heteroatomen in den Positionen N<sup>2</sup>, N<sup>6</sup> / O<sup>6</sup> und dem Kohlenstoff in Position C<sup>8</sup>.

Während sich die N<sup>6</sup>- bzw. O<sup>6</sup>-Position durch ihre Lage und Nähe zum C-terminalen Ende von STING – und damit letztendlich auch zum Zytosol – anbieten, erweist sich die C<sup>8</sup>-Position in den Purinbasen als besonders interessant. Bei einer Substitution an dieser Position sollten sowohl die Aromatizität der Purine für  $\pi$ -stacking als auch alle natürlichen Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren gewährleistet bleiben. Im Falle einer Modifikation an den anderen genannten Positionen werden zwar Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren zu einem gewissen Grad eingeschränkt, bei einer Monosubstitution der exozyklischen Aminogruppen sollten diese Eigenschaften aber immer noch zumindest partiell erhalten bleiben. Des Weiteren sollte eine Monosubstitution am Molekül die Bindungsaffinität nicht in solch einem Maße beeinträchtigen, dass eine Interaktion mit dem Protein nicht mehr gewährleistet werden kann. In den nachfolgenden Kapiteln wird ausschließlich die Modifikation an Guanosin untersucht; die Modifikation von Adenosin an Position N<sup>6</sup> wurde von Dr. Giacomo Ganazzoli im Laufe seiner Dissertation untersucht.<sup>[178]</sup>



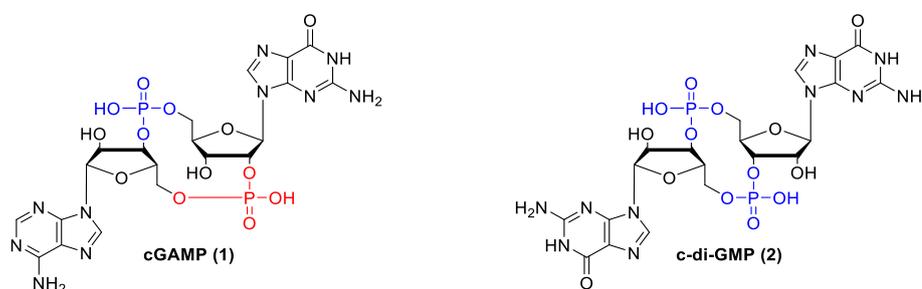
**Abbildung 3.3.** Zweidimensionalen Darstellung der Interaktion von hSTING-Homodimer zu cGAMP (**A**, PDB: 4LOH)<sup>[68]</sup> und zu c-di-GMP (**B**, PDB: 4F5Y)<sup>[39]</sup>. Die hochgestellten Buchstaben geben das jeweilige Monomer von STING an. Distanzen sind jeweils abgerundet in Angström angegeben, dabei ist immer die kürzeste Distanz angegeben, wenn eine Aminosäure an mehrere Positionen des CDNs koordiniert. Abbildung erstellt mit *Biovia Discovery Studio Visualizer 2024*. Darunter jeweils die chemische Darstellung von cGAMP (**1**) bzw. c-di-GMP (**2**) mit den zu modifizierenden Positionen in rot, blau und grün.

Mit den zuvor gesammelten Informationen und den zu berücksichtigenden Designelementen wurde eine generalisierte retrosynthetische Analyse durchgeführt (**Abbildung 3.4**). Um eine einfache sowie zeit- und kosteneffiziente Derivatisierung der CDNs zu potenziellen PROTACs (**I**) zu ermöglichen, sollen die Motive für die E3-Ligasen als Letztes durch eine Endstufenmodifikation mittels Click-Chemie eingeführt werden.<sup>[179-182]</sup> Die CDNs selbst (**II**) sollten sich durch verschiedenste bekannte Methoden der Nukleosid- und Oligonukleotidchemie aufbauen lassen können (siehe **Kapitel 1.1.4**). Nach der Zyklisierung eines linearen Dinukleotids (**III**) sollten sich die Bausteine auf kommerziell erhältliche Phosphoramidite (**IV**) und eine modifizierte Guanosin-Spezies (**V**) zurückführen lassen können. Mit einer sinnvoll gewählten Schutzgruppenstrategie lassen sich die benötigten Guanosin-Phosphoramidite (**VI**) wiederum auf Guanosin (**VII**) oder sogar noch weiter in Ribose und Nukleobase zerlegen. Bei den E3-Ligasen haben wir uns für die zwei bisher bestuntersuchten im Bereich der PROTACs entschieden.<sup>[183]</sup> Dabei lag der Schwerpunkt jedoch auf CRBN, da Liganden für diese E3-Ligase synthetisch einfacher zugänglich sind. Als *Linker* zwischen den Motiven fiel die Wahl auf Polyethylenglykol-Bausteine (PEG) aufgrund niedriger Toxizität<sup>[184]</sup>, breiter pharmazeutischen Anwendung,<sup>[185]</sup> sowie Polarität, synthetischer Zugänglichkeit und Konformationsflexibilität.



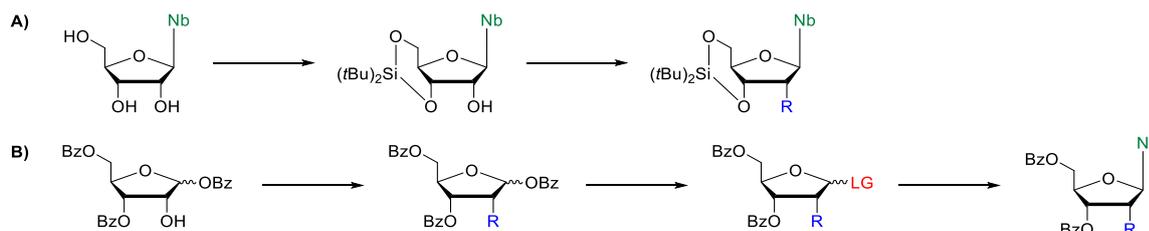
**Abbildung 3.4.** Retrosynthetische Analyse angestrebter STING-PROTACs auf Basis von CDNs. Rot: Motiv für E3-Ligase. Blau: in dem jeweiligen Schritt aufgebaute Bindung. Grün: Schlüsselschritte. Die Verknüpfung der jeweiligen Phosphordiester (hier dargestellt symmetrisch 3',3'-) ergibt sich aus der Regiochemie der jeweiligen reaktiven Phosphor-Spezies des Guanosin-derivats **VI** (2'- oder 3'-).

Es muss an dieser Stelle betont werden, dass die unterschiedliche Verknüpfung von cGAMP (**1**) und c-di-GMP (**2**) sich nur über unterschiedliche Regioisomere der jeweiligen zu verwendenden Phosphoramidite bzw. H-Phosphonate ermöglichen lässt. Während c-di-GMP (**2**) nur kanonische 3',5'-Verknüpfungen zwischen Phosphor und Ribose besitzt, wie sie in genetischem Material zu finden sind, weist cGAMP eine kanonische 3',5'- und eine ungewöhnliche 2',5'-Verknüpfung auf (**Abbildung 3.5**). Da in vielen Synthesestrategien zur linearen Kupplung eine freie 5'-Hydroxy-gruppe der Ribose als Nukleophil genutzt wird, muss somit die Regiochemie und die dadurch entstehenden Verknüpfungen über die Phosphoramidite eingeführt werden. Durch die etablierte Nukleosid- und Oligonukleotidchemie sind auch die Schutzgruppen am Phosphoramidit bzw. H-Phosphonat größtenteils vorgegeben, welche für eine erfolgreiche Inkorporation sowie abschließende Entschützung notwendig sind. Somit ist diese zuvor gezeigte retrosynthetische Analyse (**Abbildung 3.4**) nur als Leitlinie anzuwenden.



**Abbildung 3.5.** Darstellung der unterschiedlichen Verknüpfung der Phosphordiester in cGAMP (**1**) und c-di-GMP (**2**).

Zur Synthese modifizierter Nucleoside gibt es verschiedene Herangehensweisen, die grob in zwei Gruppen eingeteilt werden können: linear und zusammenführend (**Abbildung 3.6**). Beim linearen Ansatz werden gewünschte Modifikationen oftmals unter Zuhilfenahme von Schutzgruppenchemie regioselektiv eingeführt (**Abbildung 3.6A**). Bei einer zusammenführenden Herangehensweise werden Zucker und Nucleobase separat synthetisiert, dann wird die glykosidische Bindung in einem Schlüsselschritt aufgebaut (**Abbildung 3.6B**).<sup>[186]</sup> Dabei bietet sich die zusammen-führende Herangehensweise besonders bei Substanzen ein, bei denen das Rückgrat der Nucleobase oder des Zuckers stark modifiziert sind.<sup>[187, 188]</sup> Die größte Tücke bei dieser Herangehensweise ist die potenzielle Entstehung von Isomeren; darunter fallen sowohl  $\alpha$ - /  $\beta$ - als auch Regioisomere.<sup>[189, 190]</sup> Da unsere Moleküle so wenig wie möglich von cGAMP (**1**) und c-di-GMP (**2**) abweichen sollen, haben wir uns für einen linearen Ansatz entschieden.

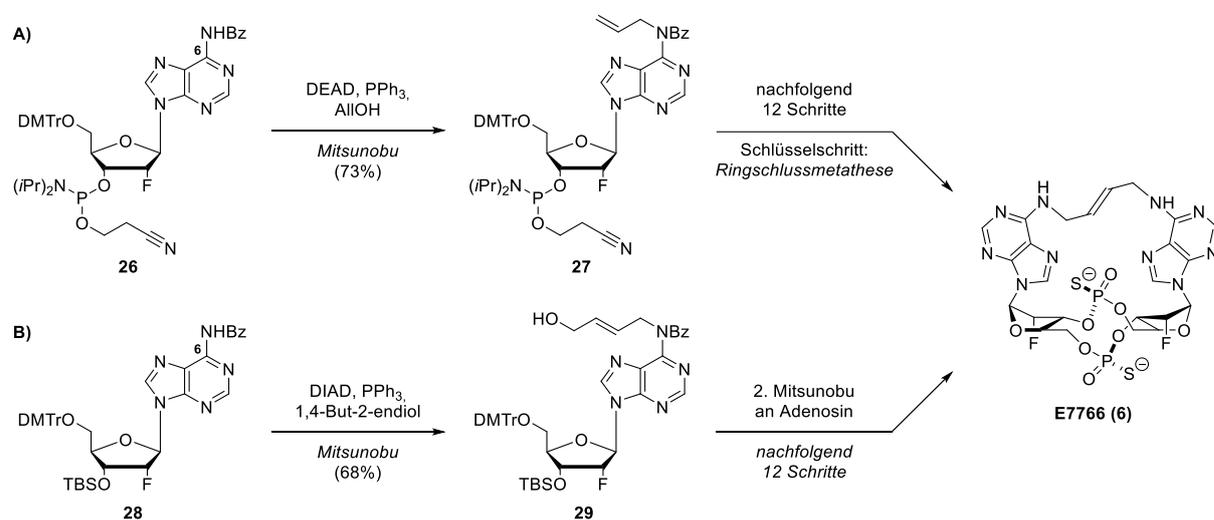


**Abbildung 3.6.** Darstellung von möglichen Herangehensweisen zum Aufbau modifizierter Nucleoside, hier gezeigt an der 2'-Modifikation. **A)** Linearer Ansatz. **B)** Zusammenführender Ansatz.

### 3.1.2 PROTACs auf Basis von 3',3'-c-di-GMP, modifiziert an O<sup>6</sup>G

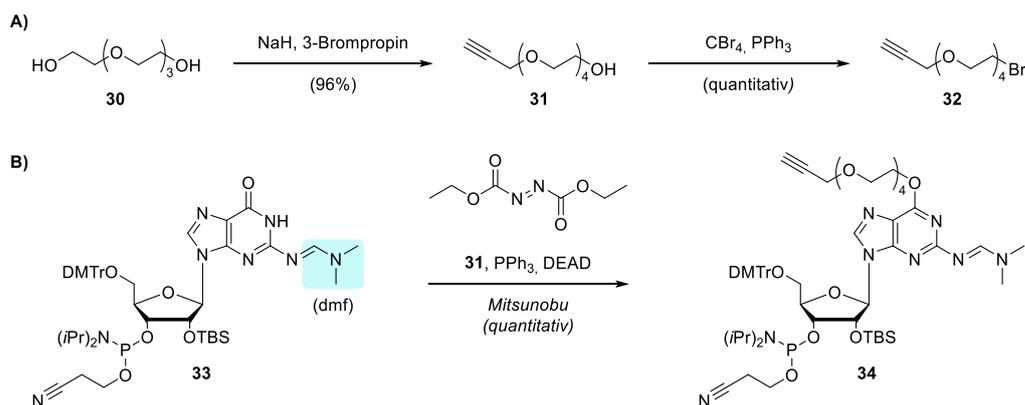
Mit dem grundlegenden Syntheseansatz im Blick wird sich nun der Synthese der PROTACs gewidmet. In diesem Kapitel wird die Modifikation an der O<sup>6</sup>-Position von Guanosin und der damit einhergehenden Synthese zu den darauf aufbauenden CDNs genauer betrachtet.

2021 konnten KIM *et al.* E7766 (**6**) herstellen. E7766 ist ein Derivat von 3',3'-c-di-AMP, welches über die N<sup>6</sup>-Position beider Adenosine verbrückt ist und dadurch dem Molekül eine insgesamt höhere Konformationsstabilität gibt (**Abbildung 3.7**). Um dieses Molekül zu realisieren haben sie gezielt Reste mithilfe einer Mitsunobu-Reaktion an der N<sup>6</sup>-Position von Derivaten des Adenosins (**26** bzw. **28**) eingeführt.<sup>[66]</sup> Diese Reste konnten dann im Laufe der jeweiligen Synthese über unterschiedliche Verfahren (Weg **A** oder Weg **B**) weiter verknüpft und modifiziert werden. Eine ähnliche Methodik konnte Dr. Giacomo Ganazzoli etablieren, um die N<sup>6</sup>-Position von Adenosin zu modifizieren.<sup>[178]</sup>



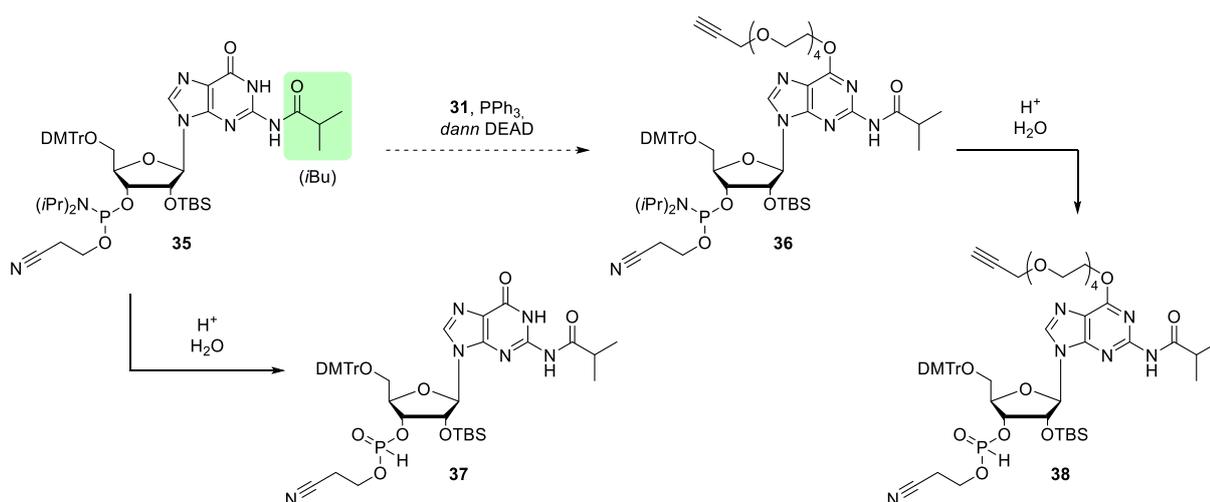
**Abbildung 3.7.** Synthese des verbrückten E7766 (**6**), ausgehend Derivaten des Adenosins (**26** und **28**), welche jeweils am exozyklischen Amin in Position 6 über eine Mitsunobu-Reaktion als Schlüsselschritt modifiziert worden sind (**27** und **29**).<sup>[66]</sup> Während bei Weg **A** das CDN über **27** aufgebaut wurde und die beiden Adenosine im letzten Schritt mit Hilfe einer Ringschlussmetathese verknüpft worden sind, wurden bei Weg **B** die beiden Nucleoside erst miteinander verbrückt und dann zum CDN überführt.

Um herauszufinden, ob sich eine ähnliche Herangehensweise auch für Guanosin (**6**) mit Linkern auf Basis von PEG anbieten könnte, wurden die Mitsunobu-Reaktion sowohl an Derivaten von Guanosin als auch dessen Phosphoramiditen untersucht. Da sich im Mittel Linkerlängen von bis zu 15 Atomen für PROTACs bewährt haben<sup>[191]</sup>, wurde hier Tetraethylenglykol (**30**) verwendet und modifiziert. Unter stark basischen Bedingungen konnte **31** unter Verwendung von 3-Brompropin hergestellt werden.<sup>[192]</sup> Alkohol **31** konnte dann nach Mechanismus einer Appel-Reaktion zum Bromid **32** umgesetzt werden, welches für andere Reaktionen in späteren Kapiteln verwendet wird (**Abbildung 3.8A**).<sup>[193]</sup> Die Untersuchungen zeigten, dass die Mitsunobu-Reaktion bei Nucleosiden und Phosphoramiditen (**33**) von Guanosin mit Alkohol **31** unter Verwendung von Triphenylphosphin und Diethylazodicarboxylat (DEAD) gut funktionieren, wenn das exozyklische Amin in Position 2 als Dimethylformamidin (dmf) geschützt ist (**34**, **Abbildung 3.8B**).



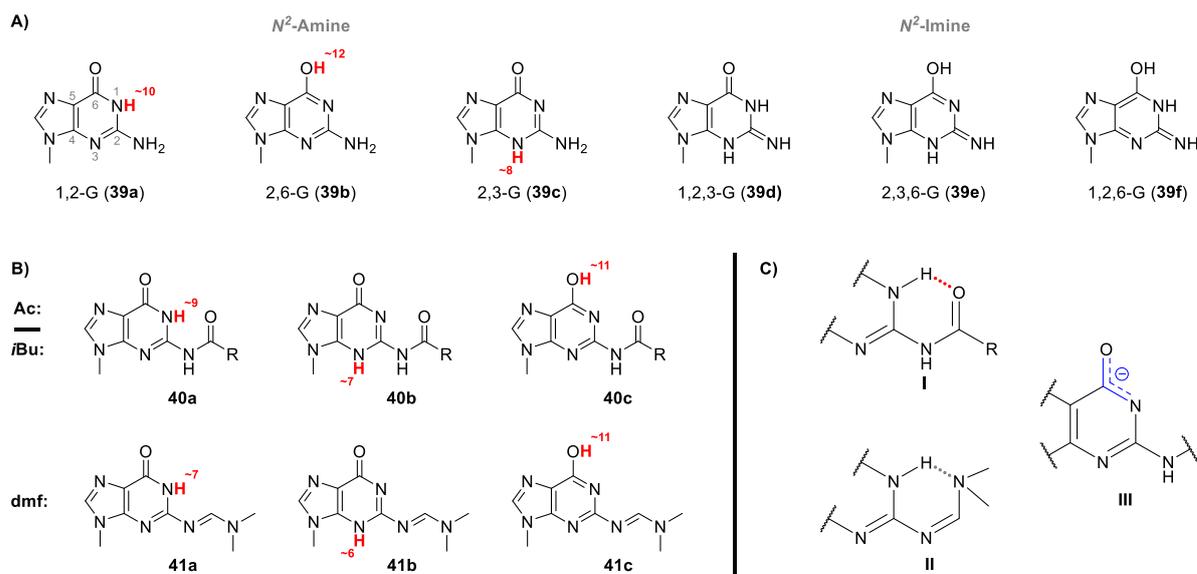
**Abbildung 3.8.** A) Synthese des PEG-basierten Linker **31** und **32** und B) Mitsunobu-Reaktion am dmf-geschützten Guanosin-Phosphoramidit **33**, um modifiziertes Phosphoramidit **34** zu erhalten.

Auffallend ist jedoch, dass eine Modifikation in Position N<sup>2</sup> als Isobutyryl-derivat (*i*Bu) die Reaktivität deutlich verringert. Unter klassischen Reaktionsbedingungen für eine Mitsunobu-Reaktion lassen sich meist Umsatz von unter 10% zum gewünschten Produkt feststellen, zum Großteil bleibt Startmaterial zurück. Eine ähnliche Reaktionskinetik lässt sich an kommerziell erhältlichem rG<sup>*i*Bu</sup>-Phosphoramidit **35** feststellen (**Abbildung 3.9**) – mit dem Unterschied, dass sowohl erwünschtes Produkt **36** als auch Ausgangsmaterial mit der Zeit zu den entsprechenden geschützten H-Phosphonaten **37** und **38** hydrolysieren. Des Weiteren konnten am Phosphoramidit in identischen Reaktionsansätzen Schwankungen des zuvor beobachteten Verhaltens hinsichtlich der Produktverhältnisse mittels RP-LCMS festgestellt werden. Anhand dieser Beobachtungen liegt der Schluss nahe, dass die *i*Bu-Schutzgruppe in Position N<sup>2</sup> für die Modifikation an der O<sup>6</sup>-Position über eine Mitsunobu-Reaktion deaktivierend wirkt. Nachfolgend wurden einige theoretische Untersuchungen durchgeführt, um mehr Klarheit über dieses unterschiedliche Reaktionsverhalten zu bekommen (**Abbildung 3.10**).



**Abbildung 3.9.** Mitsunobu-Reaktion am *i*Bu-geschützten Guanosin-Phosphoramidit **35**. Dabei konnten neben geringen Umsatz zum gewünschten Produkt **36** die Hydrolyse zu den geschützten H-Phosphonaten **37**, ausgehend vom Startmaterial **35**, und **38**, ausgehend vom gewünschten Produkt **36**, beobachtet werden.

Das unterschiedliche Reaktionsverhalten zwischen den respektiven Derivaten mit dmf- und *i*Bu-Schutzgruppen lässt sich eventuell über mehrere, in diesem Fall sogar potenziell synergistisch wirkende, Effekte erklären. Zum einen wäre da die Tautomerie innerhalb der Purinbase, und zum anderen – neben dem Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion und den damit verbundenen Feinheiten – die potenzielle Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem endozyklischen Amin in Position N<sup>1</sup> und den Schutzgruppen am exozyklischen Amin. Um die theoretischen Untersuchungen an dieser Stelle etwas zu vereinfachen, wurden die nachfolgenden theoretischen Berechnungen und die daraus folgenden Betrachtungen an 9-Methylguanin (m<sup>9</sup>G, **39**), dessen Tautomeren und den entsprechenden modifizierten Analoga durchgeführt (**Abbildung 3.10**). Grundsätzlich kann m<sup>9</sup>G (**39**) in insgesamt 6 Tautomeren vorliegen<sup>[194]</sup>, welche sich in der Verteilung der an Heteroatomen gebundenen aziden Protonen und damit der Reaktivität und der Eigenschaft zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen unterscheiden (**Abbildung 3.10A**). Dabei sind die Amin-Formen in N<sup>2</sup>-Position (**39a-c**) energetisch weitaus günstiger als die Imin-Formen (**39d-f**), und zu über 99% liegt die Form 1,2-G (**39a**) vor. Da die Imin-Formen nicht mit allen zu betrachtenden Schutzgruppen kompatibel sind, werden die Untersuchungen im Folgenden ausschließlich an den Amin-Formen durchgeführt.

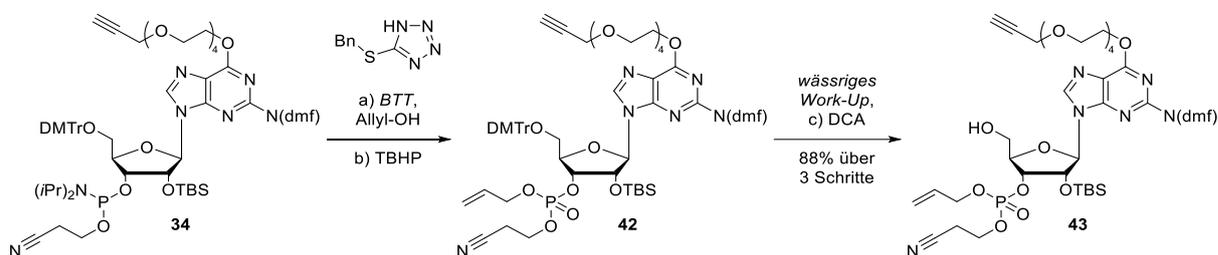


**Abbildung 3.10.** Übersicht über die theoretischen Studien an den Tautomeren von 9-Methylguanin (m<sup>9</sup>G, **39**) und dessen Derivaten. **A)** alle 6 Tautomere **39a-f** von m<sup>9</sup>G mit pK<sub>a</sub>-Werten der jeweils aziden Protonen (rot) der Amin-Formen. **B)** N<sup>2</sup>-geschützte Derivate von m<sup>9</sup>G in den Amin-Formen mit *i*Bu-Schutzgruppe (**40a-c**) bzw. dmf-Schutzgruppe (**41a-c**) und mit pK<sub>a</sub>-Werten der jeweils aziden Protonen (rot), sortiert nach absteigender Stabilität. **C)** Starke (rot, **II**) bzw. schwache (grau, **I**) intramolekulare Wechselwirkung zwischen der jeweiligen Schutzgruppe und dem aziden Proton in Position N<sup>1</sup> und beispielhafte Delokalisierung der negativen Ladung bei Verlust eines Protons an Position N<sup>1</sup> bzw. O<sup>6</sup> (blau, **III**). R = CH<sub>3</sub> oder CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Ermittelt mit *MarvinSketch*, v14.9.15.0 (Krauffeldsimulation MMFF94, sehr strikt).

Verglichen mit den entsprechenden Tautomeren von ungeschütztem m<sup>9</sup>G (**39a-c**, **Abbildung 3.10A**) fällt auf, dass die berechneten pK<sub>a</sub>-Werte der jeweiligen aziden Protonen acyl-geschützter Tautomeren denen sehr ähnlich sind (**40a-c**) und durch diese Modifikation kaum beeinflusst werden. Dies lässt sich jedoch nicht für die Imin-geschützten Tautomere **41a-c** feststellen: hier sinkt der pK<sub>a</sub>-Wert für das azide Proton des 1,2-Tautomers um bis zu drei Stufen auf einen pK<sub>a</sub>-Wert von ~7 für **41b**, was die Reaktivität hinsichtlich Säure-Base-Reaktionen weitaus erhöht (**Abbildung 3.10B**). Des Weiteren kann in Kraftfeldsimulationen beobachtet werden, dass der Carbonyl-Sauerstoff an den Acyl-Schutzgruppen intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu den aziden Protonen in den 1,2- und 2,3-Tautomeren aufbaut, während diese bei der dmf-Schutzgruppe nicht gegeben sind (**Abbildung 3.10C**). Dies kann Auswirkungen auf die Reaktivität haben, da sowohl die Wasserstoffbrückenbindung einer möglichen Tautomerie entgegenwirkt und zugleich diese Seite des Moleküls für andere Reaktanden aufgrund des sterischen Anspruchs der Acyl-Schutzgruppen abgeschirmt wird. Zudem ist die Mitsunobu-Reaktion stark abhängig von sowohl der Säure-Base-Reaktivität der Reaktanden und Intermediaten als auch der räumlichen Zugänglichkeit.<sup>[195, 196]</sup> Jedoch kann sich dieses Verhalten bis zu einem gewissen Grad durch Variation der Reaktionsparameter oder anderen Kombinationen von Phosphanen und Azodicarboxylaten steuern lassen.<sup>[197, 198]</sup> Die unterschiedlichen Reaktivitäten der getesteten Phosphoramidite **33** und **35** und die Schwankungen in den Ausbeuten unter Verwendung der *i*Bu-Schutzgruppe bei gleichbleibenden Reaktionsparametern weisen auf ein reduziertes Tautomerieverhalten und einem eventuell bestehenden sterischen Problem hin. In Anbetracht dieser Ergebnisse sollte auf die Verwendung von Acyl-Schutzgruppen in diesem Fall verzichtet und stattdessen die dmf-Schutzgruppe verwendet werden. Bei Verwendung der *i*Bu-Schutzgruppe konnten im Laufe der Reaktionssequenz an anderer Stelle noch weitere Auffälligkeiten in der Reaktivität, verglichen mit ihren dmf-Analoga, festgestellt werden. Diese Unterschiede in der Reaktivität zwischen dmf- und *i*Bu-geschützten Derivaten werden an entsprechender Stelle (siehe **Kapitel 3.1.3**) noch näher erläutert.

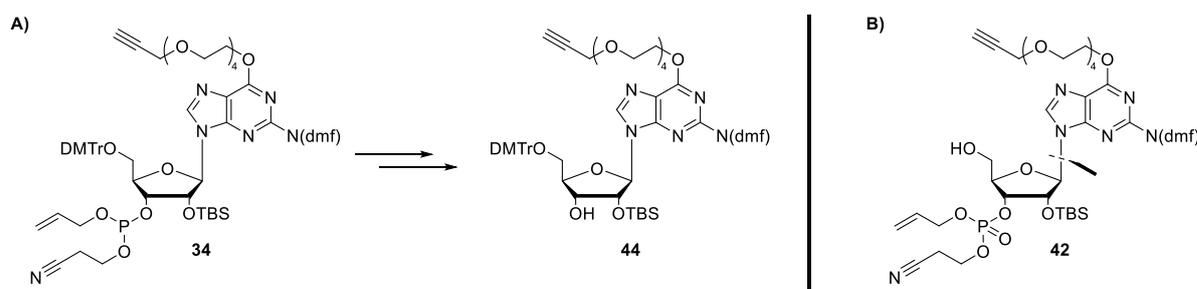
Mit Erhalt der entsprechenden modifizierten Phosphoramidite musste nun das weitere Vorgehen zur Synthese der modifizierten CDNs abgewogen werden. Zur Synthese von Oligonukleotiden haben sich mittlerweile nämlich mehrere Verfahren etabliert, sowohl rein chemischer als auch biochemischer Natur. Diese Methoden wurden schon vielfach für die Synthese von CDNs in abgewandelter Form angewandt – allen voran Ansätze auf Basis der Phosphoramidit-Chemie oder H-Phosphonat-Chemie (siehe **Kapitel 1.1.4**). Im Rahmen dieser Arbeit wurden rein chemische Ansätze zur Synthese von CDNs auf Basis von Phosphoramidit- und H-Phosphonat-Chemie verfolgt. Beide Ansätze arbeiten mit einer Phosphor(III)-Spezies, unterscheiden sich jedoch in ihren reaktiven Zwischenstufen und in der Art ihrer Aktivierung. Im Folgenden wird zunächst eine Syntheseroute nach Phosphoramidit-Chemie verfolgt.

Als Erstes wurde eine Synthese von modifiziertem c-di-GMP nach dem Phosphoramidit-Verfahren durchgeführt.<sup>[104, 105]</sup> Wie zuvor dargestellt, konnte Linker **31** mittels Mitsunobu-Reaktion in fast quantitativen Ausbeuten an der O<sup>6</sup>-Position von dmf-geschützten Guanosin-Phosphoramidit **33** eingeführt werden, um Produkt **34** zu erhalten (**Abbildung 3.8**). Anschließend wurde das so erhaltene Phosphoramidit **34** mit Allylkohol und 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (BTT) zum Phosphit(III)-triester umgesetzt. Dies lässt sich gut über eine relative Verschiebung des Signals im <sup>31</sup>P-NMR<sup>[199, 200]</sup> (P(NR)(OR)<sub>2</sub>: ~140-150 ppm, P(OR)<sub>2</sub>: ~130-140 ppm) oder mittels RP-LCMS erkennen. Der so erhaltene Phosphit(III)-triester wurde anschließend ohne Aufreinigung unter Verwendung von *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) direkt zum stabileren Phosphor(V)-triester **42** oxidiert (<sup>31</sup>P-NMR: ~0 ppm). Nach wässriger Aufarbeitung wurde die Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr) an der 5'-Position unter sauren Bedingungen mit verdünnter Dichloressigsäure (DCA) entfernt und der Phosphortriester **43** wurde in Ausbeuten von bis zu 88% über 3 Schritte erhalten (**Abbildung 3.11**).



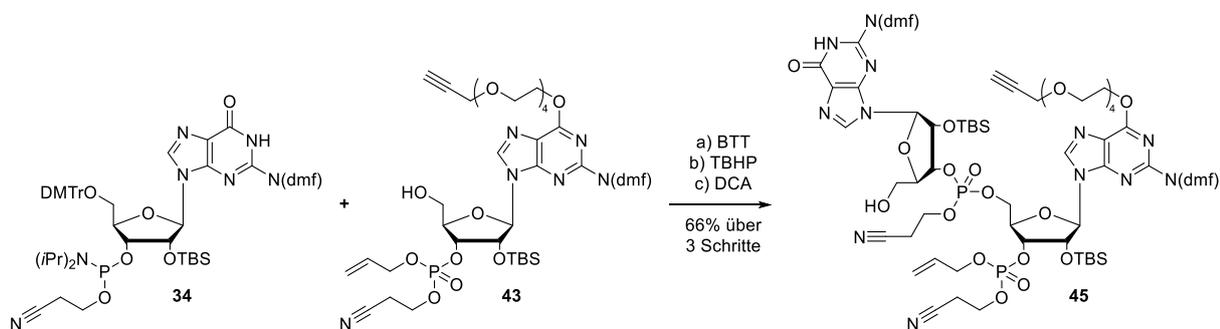
**Abbildung 3.11.** Synthese von Phosphortriester **43**, ausgehend von modifiziertem Phosphoramidit **34** über 3 Schritte. a) Synthese eines Phosphit(III)-triesters, b) Oxidation zum Phosphor(V)-triester **42**, c) Entfernen der 5'-DMTr-Gruppe.

An dieser Stelle muss jedoch auf einige Eigenheiten dieser Reaktionssequenz hingewiesen werden: neben der hohen Empfindlichkeit von Phosphoramiditen gegenüber Wasser, darf nicht mit allzu großen Überschüssen gearbeitet werden. Erfahrungswerte zeigen, dass 5–10 Äquivalente des Alkohols ausreichend sein sollten, um eine Kupplung zu erreichen. Bei nicht absolut trockenen Bedingungen bzw. zu großen Überschüssen scheint die Phosphorspezies sogar komplett abspaltbar zu sein und so das Nucleosid **44** zu produzieren (detektiert mittels RP-LCMS). Deshalb sollten alle Reagenzien zuvor getrocknet werden, und der Aktivator bestenfalls als Reinsubstanz in absolut trockenem, frischem Lösemittel gelöst werden. Außerdem kann es beim Entfernen der DMTr-Gruppe unter stark sauren Bedingungen zu Zersetzungen kommen – allen voran ein Bruch der *N*-glykosidischen Bindung (**Abbildung 3.12**).<sup>[201, 202]</sup>



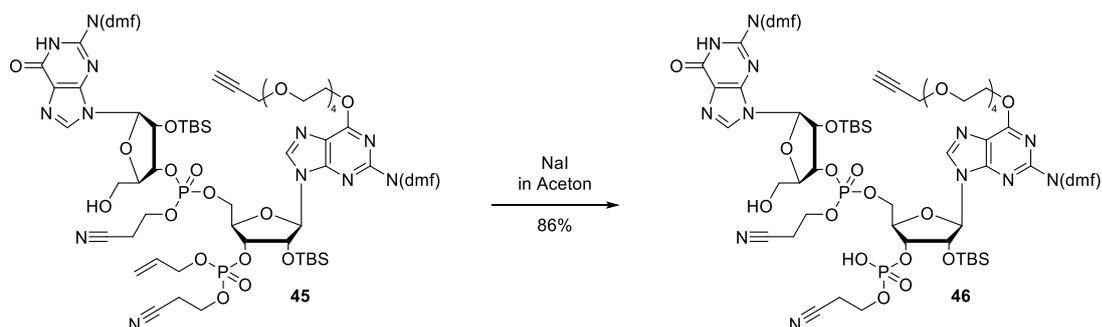
**Abbildung 3.12.** A) Umsatz von Phosphit(III)-triester **34** zum Nucleosid **44**. B) Spaltung der *N*-glykosidischen Bindung in **42** unter stark sauren Bedingungen.

Anschließend wurde die lineare Kupplung mit einem zweiten dmf-geschützten Guanosin-Phosphoramidit **34** durchgeführt (**Abbildung 3.13**). Die Reaktionsschritte verlaufen dabei identisch zu den zuvor gezeigten und dementsprechend gelten auch hier die zuvor diskutierten Hinweise. Als nukleophiler Alkohol fungiert jedoch der zuvor generierte Phosphortriester **43**, welcher nach vorausgehender Aktivierung des Phosphoramidits **34** mittels BTT gekuppelt wurde. Die daran anknüpfende Oxidation wurde wieder mit TBHP eingeleitet und die 5'-DMTr-Gruppe mit DCA entfernt. Die Ausbeuten sind bei der linearen Kupplung tendenziell niedriger und liegen für das lineare Dinukleotid **45** bei maximal 66% über 3 Schritte. Hauptgrund hierfür ist die Größe des nukleophilen Alkohols und der verhältnismäßig geringen Menge an Äquivalenten. Des Weiteren ist die Löslichkeit der Reaktanden und die Wahl eines optimalen Lösemittels oder eines Lösemittelgemisches bei dieser Reaktion eine gewisse Herausforderung. Die Menge und Art des Lösemittels muss ggf. für jedes modifizierte Dinukleotid neu optimiert werden.



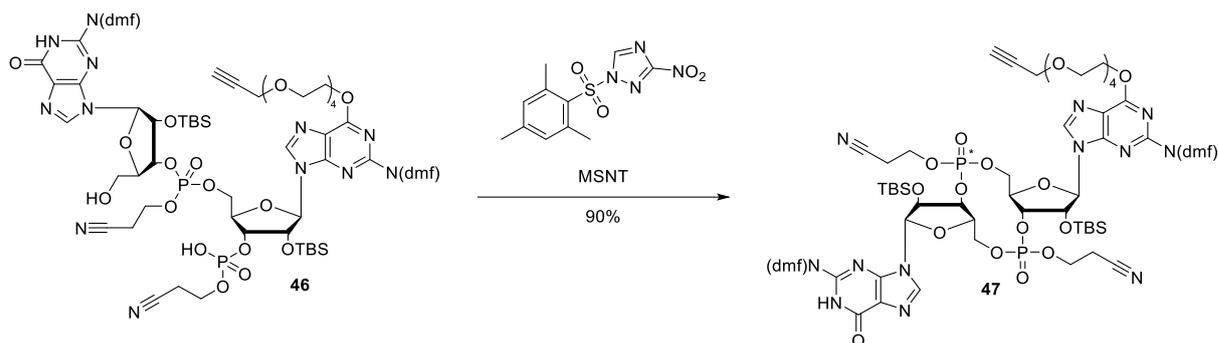
**Abbildung 3.13.** Lineare Kupplung zwischen Phosphortriester **43** und kommerziell erhältlichem Phosphoramidit **34** über 3 Schritte. a) Lineare Kupplung, b) Oxidation zum Phosphor(V)-triester, c) Entfernen der DMTr-Gruppe.

Im nächsten Schritt wurde das lineare Dinukleotid zur Zyklisierung vorbereitet (**Abbildung 3.14**). Hierfür wurde die zuvor eingeführte Allyl-Gruppe orthogonal von **45** abgespalten. Dies ist mit Natriumiodid in Aceton unter Reflux möglich. Während einige Protokolle zu einer Fällung in kaltem Wasser oder Aceton raten<sup>[104, 203]</sup>, um einen Großteil von entstehenden Verunreinigungen und des Natriumiodids zu entfernen, ist dies durch die entstehende negative Ladung am Phosphordiester und einer damit einhergehenden guten Löslichkeit in Wasser jedoch sehr schwierig umzusetzen. Außerdem stellte sich eine chromatographische Aufreinigung aufgrund der Polarität der erhaltenen Substanz **46** unter Normalphasenbedingungen als recht schwierig heraus. Ausbeuten verliefen sich hier auf bis zu 86%.



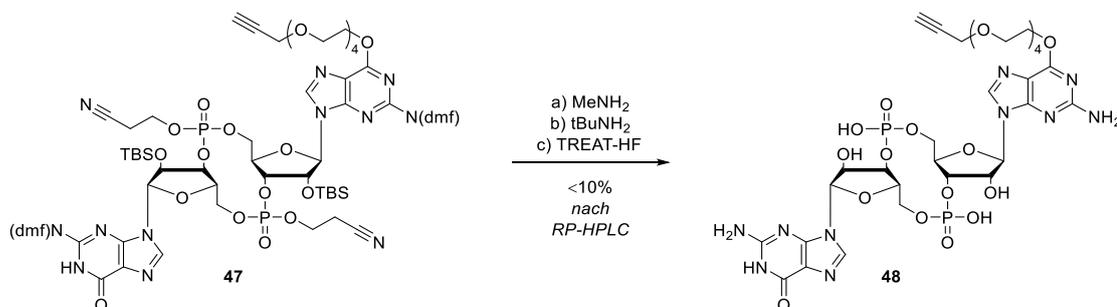
**Abbildung 3.14.** Entfernen des Allylalkohol vom endständigen Phosphortriester **45** unter Erhalt des Dinukleotids **46**.

Anschließend wurde die intramolekulare Zyklisierung durchgeführt (**Abbildung 3.15**). Hierfür gibt es verschiedene Reagenzien, wovon die meisten allerdings wohl auf der Generierung eines gemischten Säureanhydrids am Phosphordiester beruhen. Laut Literatur hat sich hierfür 1-(2-Mesitylsulfonyl)-3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol (MSNT) vielfach bewährt.<sup>[86]</sup> Je nach Verdünnung und Reinheit der Vorstufe **46** konnten bei der Zyklisierung Ausbeuten von bis zu 90% für **47** erzielt werden, diese schwankten aber stark. Eine beliebte Alternative zur Zyklisierung ist eine Kombination aus 2,4,6-Triisopropylbenzenesulfonylchlorid (TPSCl) mit *N*-Methylimidazol (NMI), welche hier jedoch nicht untersucht wurde.<sup>[204]</sup>



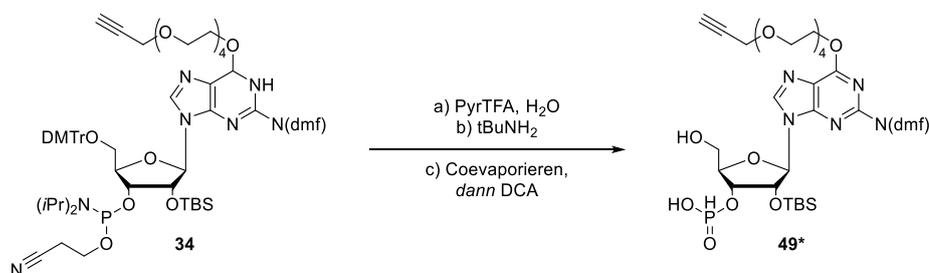
**Abbildung 3.15.** Intramolekulare Zyklisierung des linearen Dinucleotids **46** zum geschützten CDN **47** mittels MSNT.

Die finale Entschützung wurde in einer Eintopfreaktion durchgeführt (**Abbildung 3.16**). Dabei werden zuerst die Cyanoethyl-Schutzgruppen von **47** mit *tert*-Butylamin nach einem E1<sub>cb</sub>-Mechanismus abgespalten und anschließend die dmf-Schutzgruppen mit Methylamin entfernt. Anschließend erfolgte die Entfernung der Silyl-Schutzgruppen mit Triethylamin-trihydrofluorid (TREAT-HF) bei erhöhten Temperaturen, um das modifizierte c-di-GMP-Derivat **48** zu erhalten. Sowie die TBS-Schutzgruppen vollständig entfernt worden sind, wurde verbliebenes HF mit Methoxytrimethylsilan (TMSOMe) gequentscht. Nach einer Fällung aus Aceton und anschließender Aufreinigung mittels RP-HPLC konnte **48** leider nur in Ausbeuten von unter 10% isoliert werden. Diese niedrige Ausbeute könnte sich, neben Verlusten bei der chromatographischen Aufreinigung, eventuell durch eine verbliebene Verunreinigung aus den beiden vorangegangenen Reaktionsschritten erklären lassen. Die Ausbeuten sind weitaus niedriger als die von natürlichem c-di-GMP (**2**), was sich eventuell auf die Modifikation selbst zurückführen lässt.<sup>[104, 105]</sup>



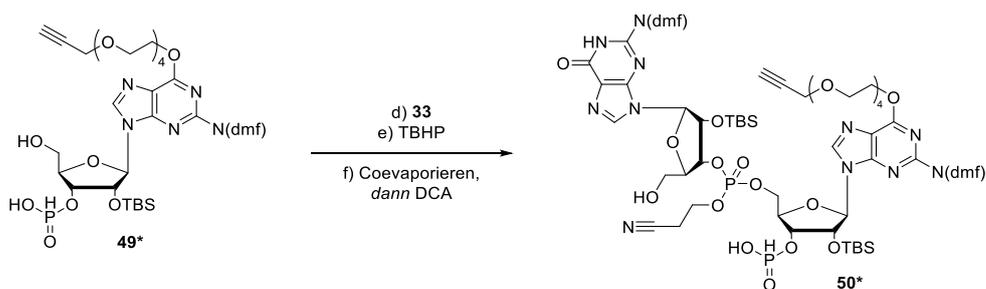
**Abbildung 3.16.** Entfernen aller Schutzgruppen von **47**, um **48** zu erhalten. Die basenlabilen Schutzgruppen (dmf- und Cyanoethyl-) wurden in Anwesenheit primärer Amine entfernt, während die Silyl-Schutzgruppen in Anwesenheit einer Fluoridquelle entfernt wurden.

GAFFNEY *et al.* haben 2010 eine Methodik etabliert, wie man in einem hybriden Verfahren aus Phosphoramidit- und H-Phosphonat-Chemie kanonisch verknüpfte CDNs in einer Eintopf-Synthese über 12 Stufen herstellen kann.<sup>[106]</sup> WANG *et al.* haben daraufhin diese Methodik verfeinern und so in einer nochmals größeren Bandbreite unmodifizierte, kanonisch verknüpfte CDNs synthetisieren können.<sup>[108]</sup> Die nachfolgende Synthese ist stark an die zuvor genannten Verfahren angelehnt, mit dem Unterschied, dass die Reaktionszeiten tendenziell länger sind. Jede Reaktion wurde mittels RP-LCMS auf ihre Vollständigkeit – oder ihren Stillstand – nachverfolgt, bevor der nächste Reaktionsschritt eingeleitet worden ist. Zum besseren Verständnis ist diese Eintopf-Synthese in mehrere Schlüsselschritte aufgeteilt worden. Die Reaktionsschritte wurden fortlaufen aufgelistet und die nicht isolierten Zwischenstufen wurden mit \* markiert (**Abbildungen 3.17-3.20**). Phosphoramidit **34** wurde in 3 Schritten zum freien H-Phosphonat **49\*** umgesetzt (**Abbildung 3.17**). Dafür wurde die Diisopropylamin-Gruppe mit Hilfe von Pyridiniumtrifluoroacetat (PyrTFA) in Anwesenheit von Wasser abgespalten und die Cyanoethyl-Gruppe anschließend mit *tert*-Butylamin entfernt. Schlussendlich wurde die DMTr-Gruppe an der 5'-Position mit DCA entfernt.



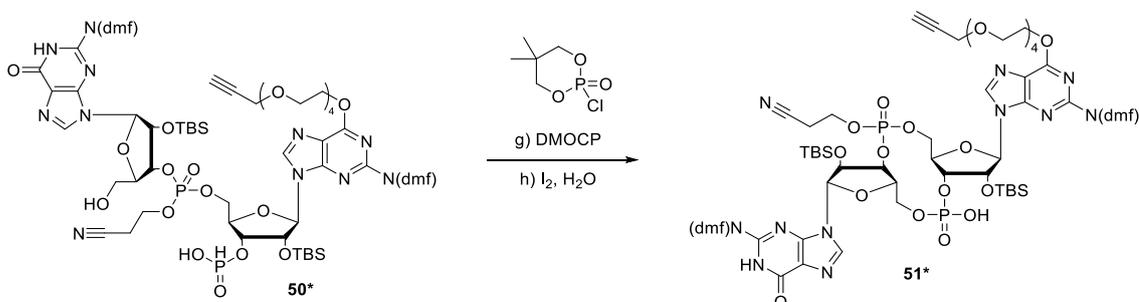
**Abbildung 3.17.** Synthese von freiem H-Phosphonat **49\*** aus Phosphoramidit **34** in 3 Schritten. a) Hydrolyse des Phosphoramidits unter sauren Bedingungen, b) Entfernen der Cyanoethyl-Gruppe am geschützten H-Phosphonat unter basischen Bedingungen, c) Entfernen der DMTr-Gruppe unter sauren Bedingungen.

Bei der linearen Kupplung von **49\*** mit dem Phosphoramidit **33** wurde kein Aktivator zugesetzt (**Abbildung 3.18**). Dies hat den Grund, dass die Aufreinigung zwischen den einzelnen Schritten lediglich aus Co-Evaporieren besteht und die Aktivatoren nicht flüchtig genug sind, um sie auf diese Weise zu entfernen. Nach der Kopplung wurde der erhaltene Phosphit(III)-triester mit TBHP oxidiert und überschüssiges TBHP mit NaHSO<sub>3</sub> gequentscht. Die DMTr-Gruppe an der 5'-Position wurde anschließend mit DCA entfernt und überschüssiges DCA wurde mit Pyridin gequentscht. So konnte das lineare Dinukleotid **50\*** erhalten werden, welches mehrfach mit Pyridin co-evaporiert wurde.



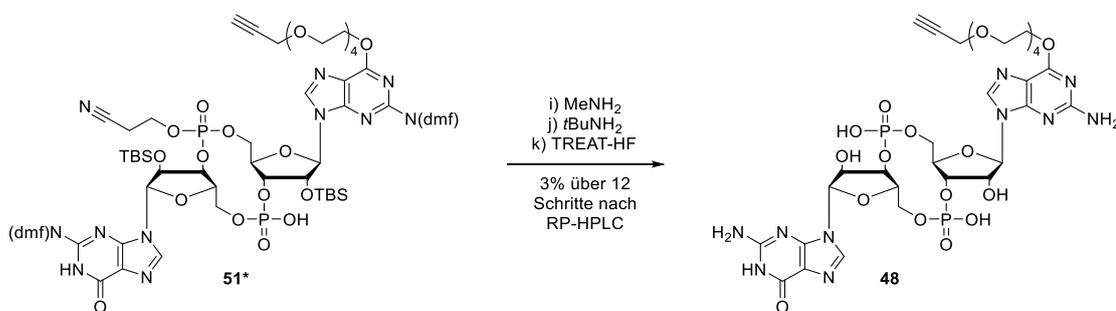
**Abbildung 3.18.** Lineare Kupplung von H-Phosphonat **49\*** an Phosphoramidit **33** unter Erhalt von **50\*** in 3 Schritten. d) Umsetzen mit Phosphoramidit **33**, e) Oxidation zum Phosphor(V)-triester, f) Entfernen der DMTr-Schutzgruppe.

Für die nachfolgende intramolekulare Zyklisierung von linearem Dinukleotid **50\*** wurde unter schwach basischen Bedingungen 2-Chlor-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxid (DMOCP) eingesetzt (**Abbildung 3.19**). Hierbei entsteht vermutlich intermediär ein gemischtes Anhydrid aus einem Phosphat und einem Phosphonat,<sup>[99]</sup> welches durch den nukleophilen Angriff der freien 5'-Hydroxygruppe zu einem zyklischen Zwischenprodukt führt. Eine nachfolgende Oxidation mit Iod unter wässrigen Bedingungen führt zum geschützten CDN **51\***.



**Abbildung 3.19.** Zyklisierung und Oxidation von linearem Dinukleotid **50\*** zum geschützten CDN **51\***. g) Intramolekulare Zyklisierung mit DMOCP, h) Oxidation zum Phosphordiester mit  $I_2/H_2O$ .

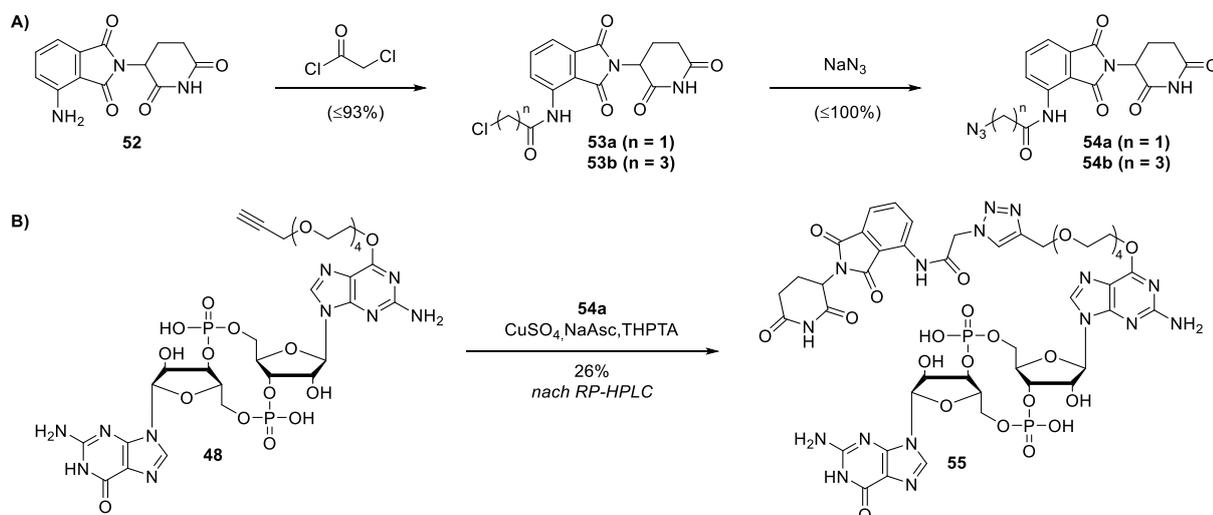
Im letzten Schritt wird das CDN **51\*** von allen Schutzgruppen befreit (**Abbildung 3.20**). Nach Umsetzen mit primären Aminen und einer Fluoridquelle, wurde **48** nach einer Fällung aus Aceton und einer Aufreinigung mittels RP-HPLC in einer Ausbeute von insgesamt etwa 3% über 12 Schritte erhalten. Diese Ausbeute ist zwar deutlich höher als bei der anderen Herangehensweise über die Phosphoramidit-Chemie, mit einer Ausbeute im niedrigen, einstelligen Prozentbereich jedoch trotzdem ernüchternd und deutlich niedriger als in der Literatur für unmodifizierte CDNs postuliert.



**Abbildung 3.20.** Entschützen von **51\*** zum freien CDN **48** über 3 Schritte.

Die Synthese von modifizierten CDNs bleibt somit nicht trivial. Zwar besticht dieses Verfahren durch die besonders hohe Zeiteffizienz, jedoch kann der Reaktionsprozess aufgrund der rudimentären Aufreinigung zwischen den einzelnen Reaktionsschritten nur sehr schwierig nachverfolgt werden. Des Weiteren ist die Aufreinigung mittels RP-HPLC aufgrund der vielen potenziell verschleppten Verunreinigungen über die vielen Reaktionsschritte hinweg sehr schwierig und die erhaltene Ausbeute nach diesem Verfahren im direkten Vergleich zu den Literaturquellen sehr niedrig.<sup>[106-108]</sup> Die Synthese eines 2',2'-Dideoxy-Analogons von **48** nach diesem Verfahren wurde auch untersucht, jedoch war eine Aufreinigung des Rohproduktes (detektiert mittels RP-LCMS) durch Fällung nicht möglich und das Produkt konnte selbst mittels RP-HPLC nicht sauber isoliert werden.

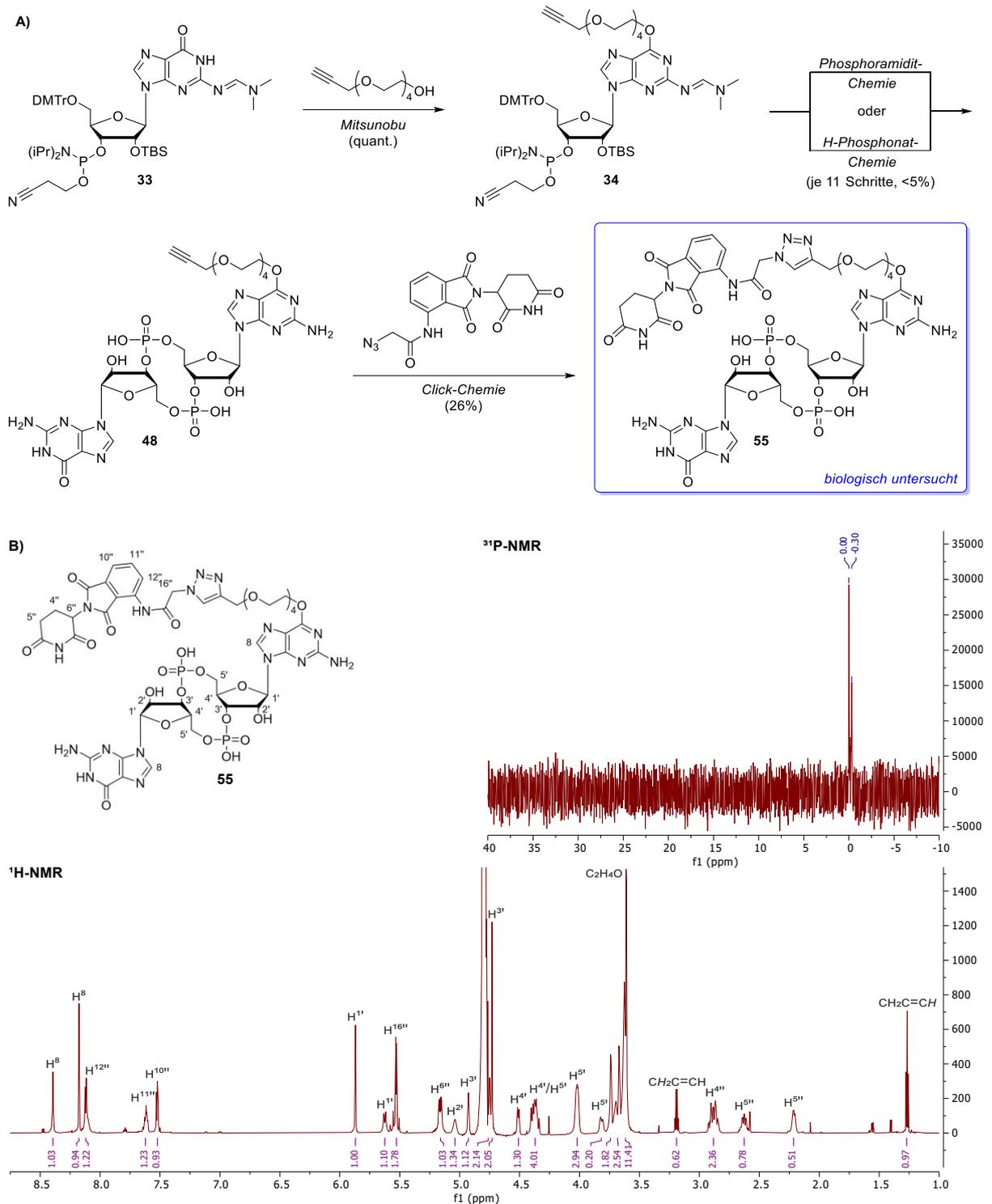
Um einen potenziellen PROTAC aus **48** zu generieren, wurde als letzter Schritt eine Endstufenmodifikation per Click-Chemie durchgeführt (**Abbildung 3.21**). Hierbei entsteht in einem durch Kupfer(I)-katalysierten Prozess aus einem Azid und einem endständigen Alkin ein 1,4-modifiziertes Triazol. Dafür wurde unter Sauerstoffausschluss das benötigte Kupfer(I) *in situ* aus  $\text{CuSO}_4$  mit Natriumascorbat ( $\text{NaAsc}$ ) als Reduktionsmittel hergestellt, was sich durch einen Farbumschlag von blau zu gelb bemerkbar macht. Zusätzlich wird für Click-Reaktionen dieses Typs oft ein Komplexierungsreagenz zum Stabilisieren der Kupfer(I)-Spezies zugesetzt. Hier fiel die Wahl auf Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA).<sup>[205]</sup> Als E3-Rekruter für CRBN wurde zunächst Pomalidomid (**52**) in 2 Schritten in das benötigte Azid **54a** überführt. (**Abbildung 3.21A**). Nach Aufreinigung mittels RP-HPLC wurde **55** in einer Ausbeute von etwa 26% Produkt erhalten (**Abbildung 3.21B**). Bei der Click-Reaktion erwies sich hier die Gesamtlöslichkeit aller Komponenten und das Finden eines geeigneten Lösemittelgemisches aus Wasser und DMSO als besondere Hürde, da vor allem **54a** generell sehr schlecht löslich ist. Um das DMSO vor der RP-HPLC auf eine milde Art und Weise zu entfernen, wurde eine Lyophilisation über Nacht durchgeführt. Nach diesem Schritt konnte jedoch eine blaue Verfärbung des zurückgebliebenen Feststoffes festgestellt werden, was auf eine zweiwertige Kupfer-Spezies hindeutet. Daher kann eine wohl mögliche Spaltung der Phosphate während der Lyophilisierung als weitere Quelle für die sehr niedrige Ausbeute nicht ausgeschlossen werden.<sup>[206-209]</sup>



**Abbildung 3.21. A)** Synthese von azido-POM **54a** und **54b** in 2 Schritten, ausgehend von Pomalidomid **52**. **B)** Synthese von potenziellem PROTAC **55** aus dem CDN **48** und azido-POM **54a** in einer Endstufenmodifikation mittels Click-Chemie.

Insgesamt konnte in diesem Kapitel der potenzielle STING-PROTAC **55** auf Basis von c-di-GMP in insgesamt 13 Reaktionsschritten hergestellt werden (**Abbildung 3.22**). Zunächst wurde eine Alkin-Funktionalität an der Position  $\text{O}^6$  des Guanosin-Phosphoramidits **33** über eine Mitsunobu-Reaktion eingeführt, Anschließend konnte ausgehend vom modifizierten Phosphoramidit **34** die Synthese zum CDN **54** auf zwei unterschiedlichen Synthesewegen mit jeweils 11 Reaktionsschritten etabliert werden. Mittels Click-Chemie konnte **54** schlussendlich zum potenziellen STING-PROTAC **55** umgesetzt werden.

### 3.1.2 PROTACs auf Basis von 3',3'-c-di-GMP, modifiziert an O6G



**Abbildung 3.22. A)** Übersicht über die Synthese des potenziellen c-di-GMP-basierten STING-PROTAC **55** in 13 Schritten über zwei verschiedene Syntheserouten, welcher von *Yasmin V. Gärtner* auf seine biologische Aktivität hin untersucht wurde. **B)**  $^1\text{H}$  und  $^{31}\text{P}$ -NMR von STING-PROTAC **55**.

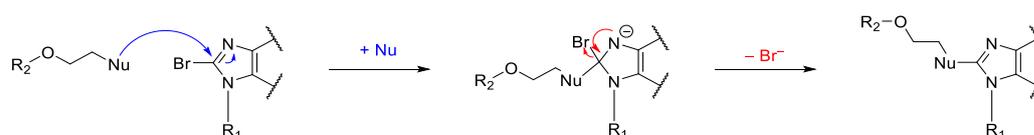
Die Substanz **55** wurde anschließend von *Yasmin V. Gärtner* auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Jedoch konnte anhand der durchgeführten *in vitro* Studien keine Reduktion der zellulären Mengen von STING durch **55** oder anderen Substanzen nachgewiesen werden. Die Details dieser biochemischen Untersuchungen und die Ergebnisse der darauf aufbauenden physikochemischen Untersuchungen an **55** und anderen Substanzen sind in **Kapitel 3.3** dargelegt.

### 3.1.3 PROTACs auf Basis von 3',3'-c-di-GMP, modifiziert an C<sup>8</sup>G

Dieses Kapitel wurde der Etablierung einer Modifikation in der C<sup>8</sup>-Position von Guanosin und der Verwendung in potenziellen STING-PROTACs auf Basis von c-di-GMP gewidmet. Diese Modifikation steht hier im Vordergrund, da bei dieser von keiner negativen Beeinflussung der kanonischen Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren und somit auch keiner negativen Beeinflussung der Bindungsaffinität zu STING auszugehen sein sollte.

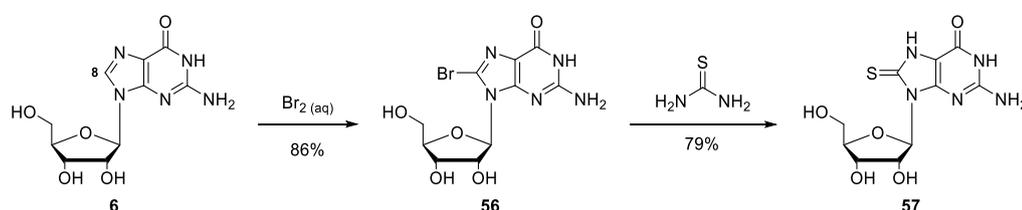
In der Fachliteratur lassen sich viele Methoden finden, um Modifikationen in der C<sup>8</sup>-Position an Purinbasen und ihren Nucleosiden einzuführen; die mit Abstand beliebteste Methode hierfür ist aber wohl die Kreuzkupplung.<sup>[210, 211]</sup> Dabei kann auf verschiedene Methoden eine Kohlenstoff-Kohlenstoff- (beispielsweise über Sonogashira-Kupplung<sup>[212]</sup> oder Suzuki-Miyaura-Kupplung<sup>[213]</sup> oder eine Kohlenstoff-Heteroatom-Bindung (siehe Buchwald-Hartwig-Reaktion<sup>[214]</sup>) aufgebaut werden. Jedoch sind diese Reaktionen meist auf aromatische Systeme für beide Reste limitiert. Da die Bindungsaffinität zum Protein eine hohe Priorität für dieses Projekt hat und die Einführung eines aromatischen Systems und eine damit eventuell verbundene räumliche Orientierung des Linkers einen negativen Einfluss auf die Bindungsaffinität haben kann, verblieb der Fokus vorerst auf den PEG-basierten flexiblen Linkern. Des Weiteren haben Xie *et al.* zeigen können, dass eine ähnliche Photoreaktion an unmodifizierten Nucleosiden in C<sup>8</sup>-Position mit Alkoholen durch eine direkte C-H-Aktivierung zwar möglich ist<sup>[215]</sup>, jedoch sinken die Ausbeuten mit zunehmender Polarität und Länge des Linkers, weswegen diese Herangehensweise hier nicht weiter untersucht wurde.

Da die zuvor genannten Reaktionen aufgrund ihrer Unzulänglichkeiten, vor allem aufgrund der Limitation der zu verwendenden aromatischen Reste, vorerst nicht weiter in Betracht gezogen wurden und alternative Syntheserouten mussten verfolgt werden. Dabei lag der Fokus auf der Etablierung einer Syntheseroute zur gezielten Synthese eines C<sup>8</sup>-modifizierten 3'-Phosphoramidits von Guanosin. Die so erhaltenen Informationen und Erfahrungen sollten sich später auch für die Synthese eines 2'-Phosphoramidits übertragen lassen. Als Erstes wurde eine nukleophile Substitution<sup>[216]</sup> nach einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus an der C<sup>8</sup>-Position in Erwägung gezogen: hier soll das Halogenid als Abgangsgruppe nach dem Angriff durch einen nukleophilen Linker dienen (**Abbildung 3.23**). Als Nucleophile wurden Alkohole, primäre Amine und auch Thiole unter basischen Bedingungen getestet, wobei hier nur letztere zu einer annehmbaren Ausbeute unter basischen Bedingungen geführt haben. Jedoch erwies sich die gezielte Synthese eines Linkers auf Basis von PEG mit einer Thiol-Gruppe als schwierig.



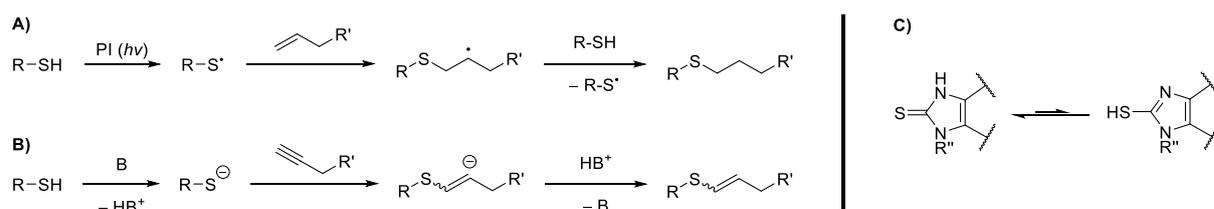
**Abbildung 3.23.** Gescheitertes Modifizieren von C<sup>8</sup>-bromiertem Guanosin nach einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus. Untersucht wurden hierbei O-, N- und S-Nucleophile, wobei nur bei Letzteren geringe Ausbeute detektierbar war. R<sub>1</sub> = geschützte oder ungeschützte Ribose, R<sub>2</sub> = PEG<sub>3</sub>-Alkin.

Um die Reaktivität zu erhöhen, wurde eine Art der Umpolung in Betracht gezogen – anstelle eines nukleophilen Linkers sollte das Nukleosid selbst an der C<sup>8</sup>-Position zum Nukleophil werden. Dabei bot sich wieder die Natur als Vorbild an: 8-Oxoguanosin ist eine Base, welche bei Oxidationsschäden durch reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) im Genom entstehen – aber mittlerweile auch als ein epigenetisches Motiv diskutiert wird.<sup>[217]</sup> Das schwerere Analogon 8-Thioguanosin wurde bereits in den 1960ern hergestellt<sup>[218]</sup> und die von Natur aus höhere Nucleophilie des Schwefels könnte sich somit für dieses Vorhaben anbieten. Die praktikabelste Lösung zum Zugang zu 8-Thioguanosin war der Umsatz von Guanosin (**6**) mit elementarem Brom zu 8-Bromoguanosin (**56**), welches im Anschluss mit Thioharnstoff zum 8-Thioguanosin (**57**) umgesetzt wurde (**Abbildung 3.24**).<sup>[219, 220]</sup> Eine Einführung des Thiocarbonyls bzw. Thiols in C<sup>8</sup>-Position zu einem späteren Zeitpunkt in der Synthese, ausgehend von unterschiedlichen geschützten Derivaten des 8-Bromoguanosins, wurde auch getestet, waren jedoch allesamt erfolglos – der Schwefel muss somit als Erstes eingeführt werden.



**Abbildung 3.24.** Synthese von 8-Thioguanosin (**57**), ausgehend von Guanosin (**6**) in 2 Schritten.

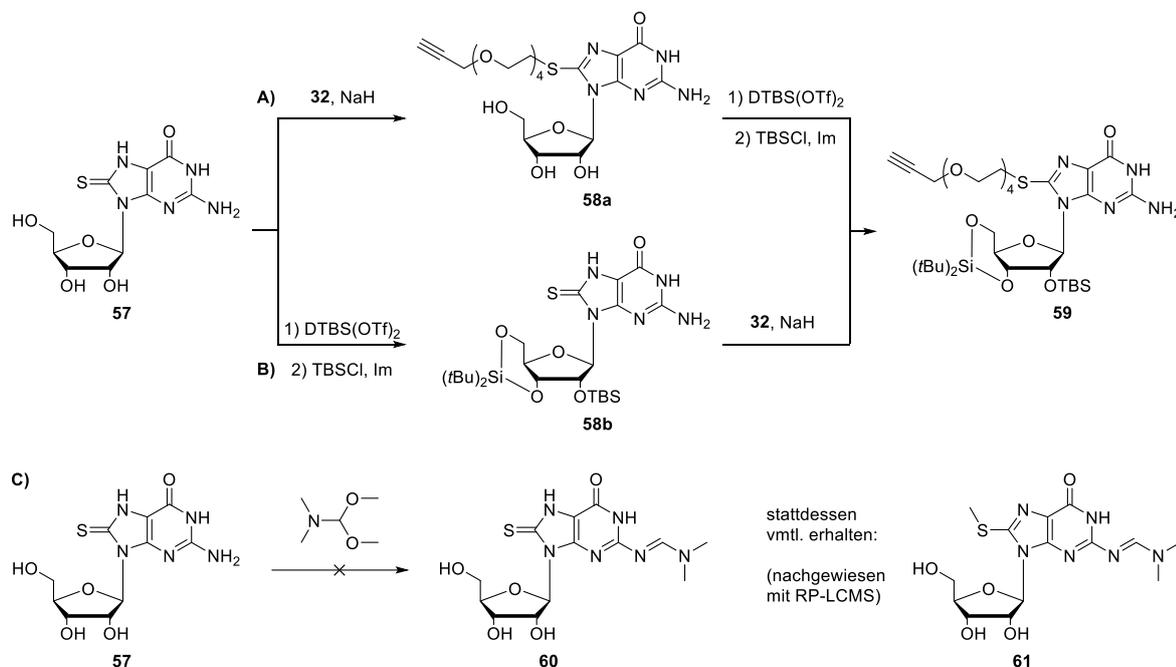
Neben einer nukleophilen Substitution wurden auch die *Thiol-ene*- und die *Thiol-yne*-Reaktion für eine Modifikation in Position C<sup>8</sup> in Betracht gezogen (**Abbildung 3.25**). Beide Reaktionen haben gemeinsam, dass Thiole an endständig ungesättigten Verbindungen zu Thioethern reagieren. Die *Thiol-ene* Reaktion soll über einen radikalischen Mechanismus ablaufen, bei dem am Thiol ein Radikal gebildet wird, welches dann ein endständiges Alken attackiert (**Abbildung 3.25A**). Das dabei wiederum entstehende Radikal am Kohlenstoff soll von einem weiteren Äquivalent des Thiols gequenchet werden. Die *Thiol-yne*-Reaktion dagegen kann sowohl radikalisch als auch über einen Säure-Base-Mechanismus ablaufen, bei der ein Thiolat das endständige Alkin attackiert (**Abbildung 3.25B**).<sup>[221, 222]</sup> Das dabei entstehende, negativ geladene Alken wird anschließend durch das zuvor vom Thiol abstrahierte Proton wieder neutralisiert. Auf diese Weise konnte keine Modifikationen an 8-Thioguanosin **57** eingeführt werden, was wahrscheinlich auf der Tautomerie auf Seiten des Thions beruht (**Abbildung 3.25C**).



**Abbildung 3.25. A)** Mechanismus der radikalischen *Thiol-ene*- und **B)** der Säure-Base-katalysierten *Thiol-yne*-Reaktion. **C)** Tautomerie von **57** auf Seiten des Thions.

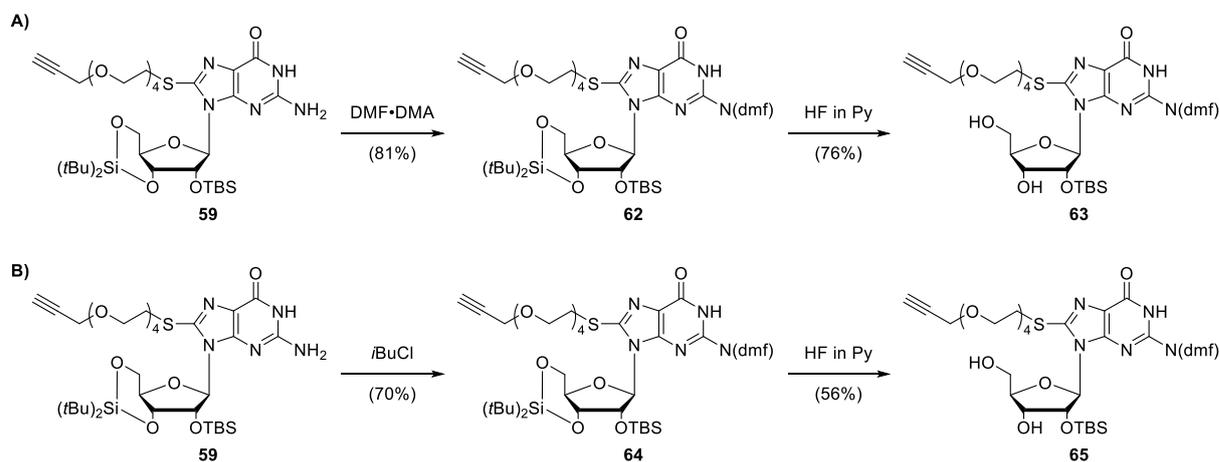
Ab diesem Punkt in der Syntheseroute gab es mehrere Möglichkeiten, in welcher Reihenfolge die anschließenden Reaktionen auf dem Weg zum gewünschten Phosphoramidit durchgeführt werden können (**Abbildung 3.26**). Zumal können erst die Hydroxygruppen an der Ribose bzw. das exozyklische Amin geschützt werden und dann eine nukleophile Substitution am Schwefel durchgeführt werden oder in umgekehrter Reihenfolge erst der Schwefel umgesetzt werden. Die unterschiedlichen Wege wurden im Folgenden untersucht:

Umsatz mit 8-Thioguanosin (**57**) in Anwesenheit einer nicht-nukleophilen Base und bromierten Linker **32**, gab in fast quantitativen Ausbeuten ein einziges alkyliertes 8-Thioguanosinderivat **58a**. Das darauffolgende Schützen der 3'- und 5'-Hydroxygruppen mit Hilfe von Di-*tert*-butylsilyl-ditriflat (DTBS(OTf)<sub>2</sub>) und Schützen der 2'-Hydroxygruppe mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBSCl) gab **59** leider nur Ausbeuten von etwa 50% (**Abbildung 3.26A**). Hierbei ist zu erwähnen, dass kürzere Linkerlängen zu tendenziell höheren Ausbeuten für die Folgereaktionen an den Hydroxylgruppen führen. Die umgekehrte Reihenfolge der Reaktionsschritte lieferte zunächst das ribosyl-geschützte Derivat **58b** in einer Ausbeute von bis zu 86% und die anschließende nukleophile Substitution am Schwefel lieferte **59** in etwa 75% Ausbeute. (**Abbildung 3.26B**) Es sei hierbei wiederum bemerkt, dass die Ausbeute für das vorangehende Schützen der Hydroxygruppen stark fluktuieren kann und in manchen Fällen sogar bei unter 40% lag. Ein vorangestelltes Schützen der N<sup>2</sup>-Position ist auch nicht erfolgsversprechend, denn bei Umsatz von **57** mit Dimethylformamid-dimethylacetal (DMF·DMA) konnte anstelle von **60** eine zusätzliche Methylierung (**61**) mittels RP-LCMS beobachtet werden. Diese lässt sich höchst wahrscheinlich auf die Nukleophilie des Schwefels zurückführen und führt so zu einer „gequenschten“ Spezies. (**Abbildung 3.26C**).



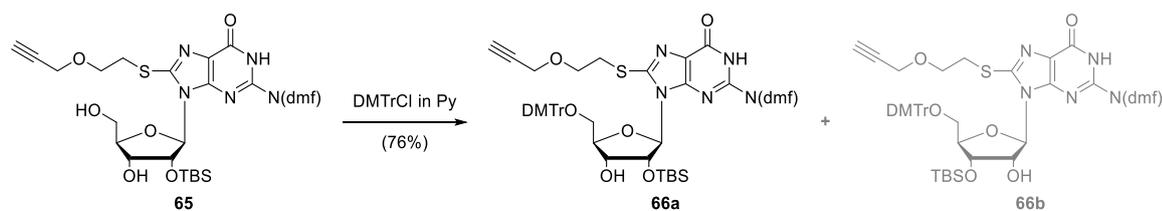
**Abbildung 3.26.** Untersuchung der Reaktivität von 8-Thioguanosin **57** zur Etablierung einer Syntheseroute hin zu den benötigten 3'-Phosphoramiditen. **A**) Nukleophile Substitution am Schwefel (**58a**), dann Schützen der Hydroxygruppen an der Ribose (**59**); Ausbeute von etwa 50%. **B**) Schützen der Hydroxygruppen (**58b**), dann nukleophile Substitution am Schwefel (**59**); Ausbeuten von bis zu 65%. **C**) Vorausgehendes Schützen des exozyklischenamins an der Nukleobase.

Als Nächstes wurden Schutzgruppen für das exozyklische Amin untersucht (**Abbildung 3.27**). Umsatz von **59** mit DMF·DMA zu **62** und die darauffolgende selektive Abspaltung der Silylklammer an den Positionen 3'- und 5'- mittels OLAH-Reagenz (HF in Pyridin) zu **63** konnte in guten Ausbeuten erzielt werden. Die Verwendung von Isobutrylchlorid führte jedoch sowohl bei der Inkorporation der Aminschutzgruppe, als auch bei der Entschützung der Silylklammer zu geringeren Ausbeuten (**Abbildung 3.27B**).



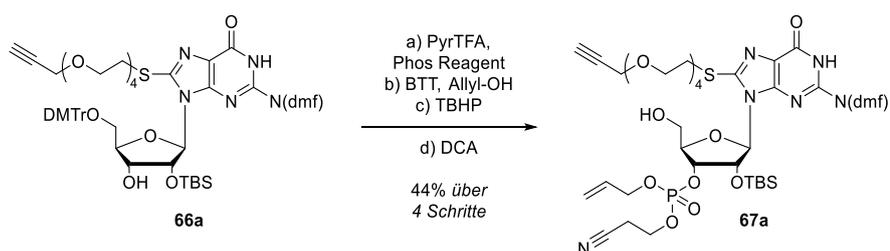
**Abbildung 3.27. A)** Umsetzung von **59** zum dmf-geschützten Derivat **63** in 2 Schritten. **B)** Umsetzung von **59** zum *i*Bu-geschützten Derivat **65** in 2 Schritten mit niedrigeren Ausbeuten.

Das nachfolgende Einführen der Dimethoxytrityl-Gruppe an **65** in 5'-Position sollte unter schwach basischen Bedingungen mit Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) selektiv möglich sein. Jedoch war in manchen Fällen das Entstehen von Nebenprodukten identischen Molekulargewichts bei der Aufreinigung zu erkennen (**Abbildung 3.28**). Hierbei handelt es sich um die Entstehung von TBS-Regioisomeren an den 2'- und 3'-Positionen (**66a** und **66b**). Dieser Effekt war zwar schon unter extremen Bedingungen, wie unter stark basischen Bedingungen, bekannt gewesen.<sup>[223-225]</sup> Jedoch scheint hier die Elektronendichte des modifizierten 8-Thioguanosins **65** dieses Verhalten viel stärker zu beeinflussen, da diese Isomerisierung zu **66a** und **66b** schon während der Synthese in Pyridin eintreten kann. Selbst Spuren an Wasser im Pyridin oder im DMTrCl konnten diese Isomerisierung nachweislich auslösen. Absolut trockene Bedingungen sind bei diesem Syntheseschritt also essenziell, um ein selektives Schützen ohne Isomerisierung zu gewährleisten. Dieses Verhalten kann aber auch ausgenutzt werden, um eines der beiden Isomere anzureichern, indem das nicht Erwünschte wieder in eine 1:1 Mischung überführt wird und die Regioisomere separat isoliert werden (siehe **Kapitel 3.1.4**).<sup>[226, 227]</sup>



**Abbildung 3.28.** Einführen der DMTr-Schutzgruppe an **65** unter schwach basischen Bedingungen. Bei nicht absolut trockenen Bedingungen kann neben dem gewünschten Nucleosid **66a** auch das Regioisomer **66b** in einem Verhältnis von bis zu 50% entstehen.

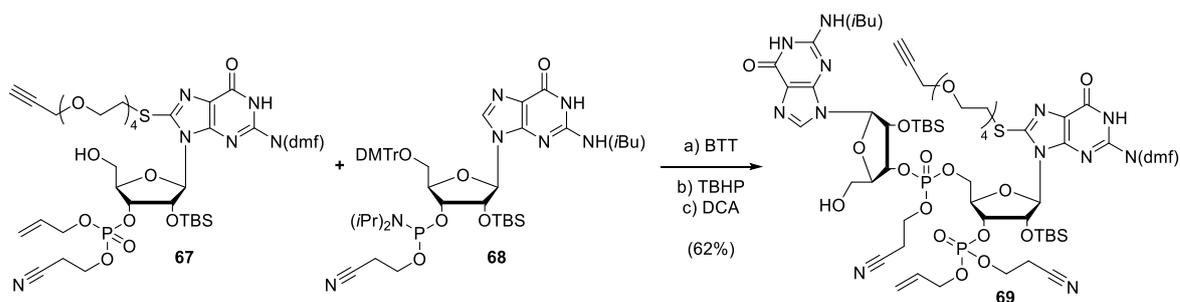
Nach der Etablierung einer Syntheseroute zum Nucleosid **66a** wurde nun die Synthese eines C<sup>8</sup>-modifizierten Derivates von c-di-GMP in Angriff genommen. Zur besseren Verfolgbarkeit der einzelnen Reaktionsschritte wurde ausschließlich ein Verfahren mit Hilfe der Phosphoramidit-Chemie angewandt. Angelehnt an der zuvor gezeigten Synthese wurde das Nucleosid **66a** zum geschützten Phosphat **67a** in 4 Schritten zusammengefasst umgesetzt. Unter Verwendung von 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidit (*Phos Reagent*) und PyrTFA wurde das Phosphoramidit in der 3'-Position eingeführt. Anschließend wurde dieses, analog zur Synthese von **48** (beschrieben in **Kapitel 3.1.2**), mittels BTT, Allylalkohol und später TBHP zu einem geschützten Phosphat umgesetzt. Im letzten Schritt wurde die DMTr-Gruppe an der 5'-Position mit verdünnter DCA entfernt. Hierbei belaufen sich die Ausbeuten für **67a** auf knapp unter 50% über 4 Schritte (**Abbildung 3.29**). Die verringerte Ausbeute kann sich neben den veränderten Eigenschaften des Nucleosids auch auf die Inkorporation des Phosphoramidit-Reagenzes belaufen. Bei der Synthese von **48** über den H-Phosphonatansatz wird Phosphormaidit **34** unter sauren Bedingungen mittels PyrTFA und Wasser gezielt zum geschützten H-Phosphonat hydrolysiert. Potenziell höhere Ausbeuten lassen sich deshalb eventuell mit anderen Aktivatoren von höheren pK<sub>a</sub>-Werten und geringerer Hygroskopie erzielen, wie beispielsweise Imidazolperchlorat (ImClO<sub>4</sub>, pK<sub>a</sub>: ~7) oder Diisopropylammoniumtetrazolid (DIPAT, pK<sub>a</sub>: ~11).



**Abbildung 3.29.** Synthese von Phosphat **67a** ausgehend vom Nucleosid **66a** in einer Eintopf-Reaktion über vier Reaktionsschritte. a) Einführung des Phosphoramidites, b) Einführen von Allylalkohol mit BTT, c) Oxidation des entstandenen Phosphit(III)-triesters zum Phosphor(V)-triesters mit TBHP, d) Entfernen der DMTr-Schutzgruppe mit DCA.

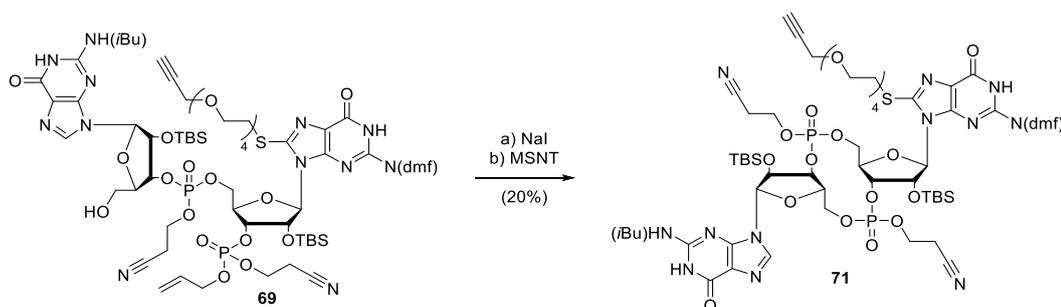
Bei der linearen Kupplung wurden analog zu den Bedingungen wie in **Kapitel 3.1.2** vorgegangen, mit dem Unterschied, dass das kommerziell erhältliche *i*Bu-Derivat **68** als zweites Phosphoramidit verwendet wurde (**Abbildung 3.30**). Das lineare Dinucleotid **69** konnte in Ausbeuten von 62% erhalten werden und liegen in einem ähnlichen Bereich wie die für **45**.

### 3.1.3 PROTACs auf Basis von 3',3'-c-di-GMP, modifiziert an C8G



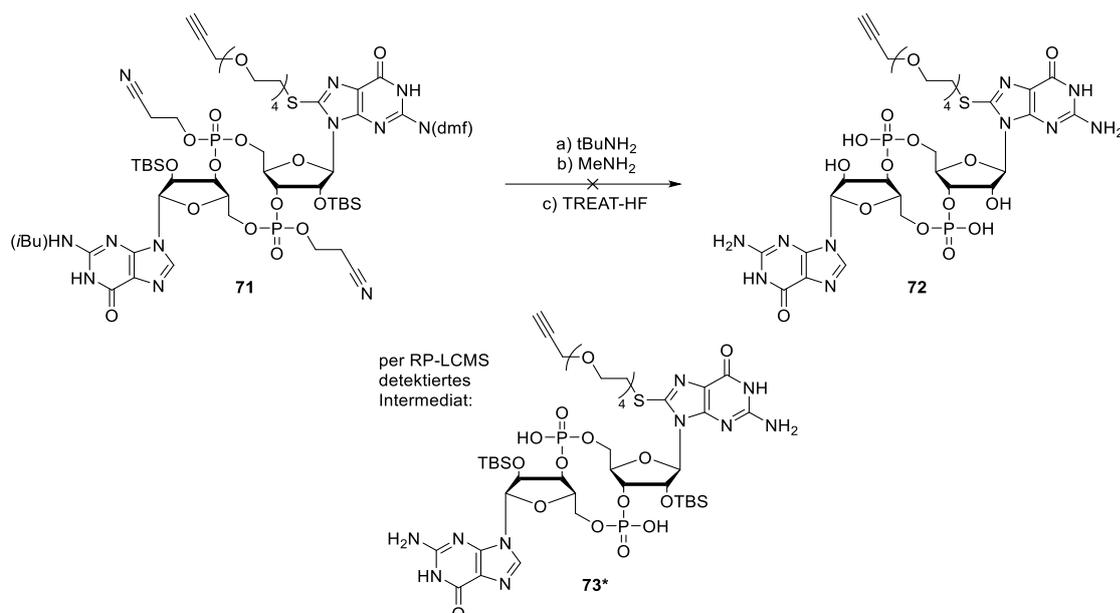
**Abbildung 3.30.** Synthese von **69** ausgehend von zuvor hergestelltem Phosphat **67a** und kommerziell erhältlichen Phosphoramidit **68** und über drei Schritte. a) Lineare Kupplung mit BTT als Aktivator, b) Oxidation des entstandenen Phosphit(III)-triesters zum Phosphor(V)-triester mit TBHP, c) Entfernen der DMTr-Schutzgruppe mit DCA.

Anschließend wurde das lineare Dinukleotid **69** in zwei Schritten zum geschützten CDN **71** umgesetzt (**Abbildung 3.31**). Hierfür wurde **69** wieder durch das Entfernen der Allyl-Schutzgruppe mit Natriumiodid erst zur intramolekularen Zyklisierung vorbereitet (**70**), und im nachfolgenden Schritt mittels MSNT zyklisiert. Dabei beliefen sich die Ausbeuten für den ersten Schritt auf 36%, und für den zweiten Schritt auf etwa 60%.



**Abbildung 3.31.** Zyklisierung von linearem Dinukleotid **69** zum zyklischen Dinukleotid **71** über 2 Schritte. a) Vorbereiten zur intramolekularen Zyklisierung durch Entfernen der Allyl-Schutzgruppe, b) Zyklisieren mit MSNT als Aktivator.

Bei der finalen Entschützung von **71** konnte jedoch kein Produkt **72** detektiert werden (**Abbildung 3.32**). Das Problem lässt sich jedoch wahrscheinlich auf das Entfernen der TBS-Schutzgruppen eingrenzen. Da die Reaktionen immer auf ihre Vollständigkeit untersucht wurden, konnte nach Schritt a) und b) ein Intermediat mittels RP-LCMS detektiert werden, das von allen basenlabilen Schutzgruppen befreit scheint (**73\***). Beim Entfernen der Silyl-Schutzgruppen in Schritt c) konnte jedoch weder Intermediat **73\*** noch gewünschtes Produkt **72** detektieren lassen. Diese Feststellung wirft jedoch Fragen auf, denn die geschützten Dinukleotide **47** und **71** unterscheiden sich nur in der Position der eingeführten Modifikation und der Amin-Schutzgruppe an der zweiten Nukleobase.

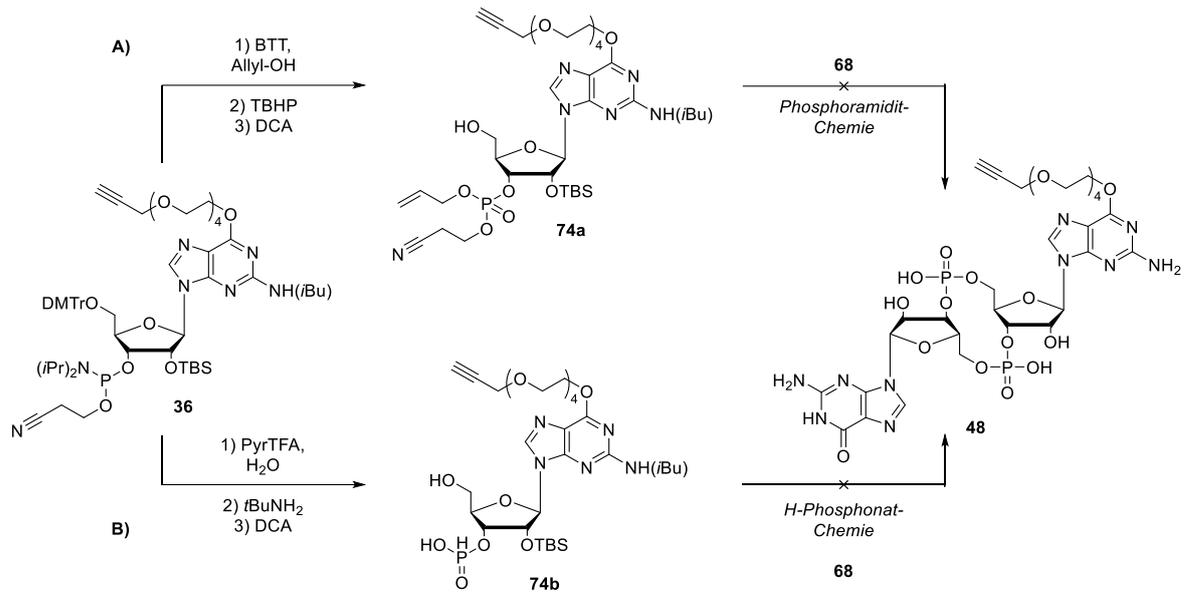


**Abbildung 3.32.** Entfernen aller Schutzgruppen von **71**, um freies modifiziertes CDN **72** zu erhalten. Während ein Umsatz zum Intermediat **73\*** mittels RP-LCMS detektiert werden konnte, ließ sich kein Produkt **72** nach dem Entfernen der Silylschutzgruppen feststellen. a) und b) Entfernen der basenlabilen Schutzgruppen, c) Entfernen der Silylschutzgruppen.

Da die *i*Bu-Schutzgruppe in unseren Synthesen schon an einigen anderen Stellen Probleme verursacht hat, vor allem bei der Mitsunobu-Reaktion, stellte sich die Frage, ob diese Schutzgruppe generell einen negativen Einfluss auf die Synthese von CDN haben könnte, wie es bei der Synthese von CDN **72** der Fall zu sein scheint. Um dies zu untersuchen, wurde eine Synthese von CDN **48** ausschließlich unter Verwendung von *i*Bu-geschütztem Phosphoramidit **68** unternommen (**Abbildung 3.33**). In diesem Fall tragen die innerhalb der Reaktionssequenz entstehenden Dinukleotide entweder zwei *i*Bu-Schutzgruppen oder jeweils eine *i*Bu- und eine dmf-Schutzgruppe an den Nukleobasen. Hierfür wurden auch die beiden zuvor untersuchten Verfahren, sowohl rein nach Phosphoramidit-Chemie (**Abbildung 3.33A**) als auch dem hybriden Eintopfverfahren (**Abbildung 3.33B**), untersucht. Dabei ließ sich leider feststellen, dass für das Verfahren rein nach Phosphoramidit-Chemie im direkten Vergleich bei jedem einzelnen Reaktionsschritt deutlich geringere Ausbeuten erzielt wurden als mit den zuvor getesteten dmf-geschützten Derivaten (siehe **Kapitel 3.1.2**). Des Weiteren sind Derivate mit zwei *i*Bu-Schutzgruppen spätestens an der Zyklisierung mit MSNT oder der finalen Entschützung gescheitert. Ein ähnliches Verhalten musste leider auch für das hybride Eintopfverfahren festgestellt werden: hier ist man an verschiedenen Stellen der Reaktionssequenz stecken geblieben. Aufgrund der hohen Komplexität der Reaktionsgemische war es nicht möglich bestimmte Intermediate zu isolieren und den Grund für die Reaktionsabbrüche genauer zu bestimmen.

Aufgrund dieser Probleme bei der Verwendung der *i*Bu-Schutzgruppe sollte auf ebendiese bei der Synthese von modifizierten Dinukleotiden verzichtet werden. Stattdessen sollte ausschließlich die dmf-Schutzgruppe als Schutzgruppe für das exozyklische Amin an Guanosin verwendet werden.

### 3.1.3 PROTACs auf Basis von 3',3'-c-di-GMP, modifiziert an C8G



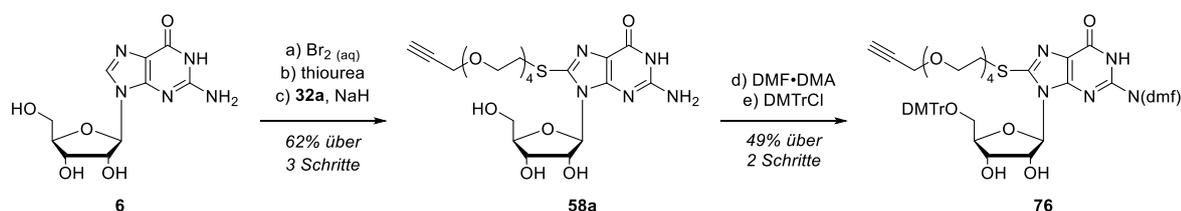
**Abbildung 3.33.** Versuchte Synthese von CDN **48**, ausgehend von O<sup>6</sup>-modifiziertem *i*Bu-geschütztem Phosphoramidit **36** und r<sup>G</sup>/<sup>*i*Bu</sup>-Phosphoramidit **68**. **A)** Synthese über Phosphoramidit-Chemie (**74a**). **B)** Synthese über H-Phosphonat-Chemie (**74b**). Während die Umsetzung zu den Schlüsselstufen **74a** und **74b** erfolgreich war, war die nachfolgende Synthese zum CDN **48** leider nicht möglich.

### 3.1.4 PROTACs auf Basis von 2',3'-cGAMP, modifiziert an C<sup>8</sup>G

Die zuvor diskutierte Modifikation an der C<sup>8</sup>-Position von Guanosin wurde in diesem Kapitel auch für die Synthese von potenziellen STING-PROTACs auf Basis von 2',3'-cGAMP (**1**) verwendet. Viele der zuvor erworbenen Kenntnisse sind dafür in die Etablierung einer neuen, effizienteren Syntheseroute zum hierfür benötigten Guanosin-2'-Phosphoramidit eingeflossen. Die folgenden Ergebnisse wurden von *Luoxia Shi* im Rahmen seiner Masterarbeit ermittelt.

Diese neue Syntheseroute beinhaltet als neuen Schlüsselschritt den gezielten Erhalt des 3'-TBS Isomers **66b** (**Abbildung 3.34**). Da das recht fragile Phosphoramidit bestenfalls direkt vor seiner Verwendung eingeführt werden sollte und ein gezieltes Schützen der 3'- und 5'-Positionen bei zeitgleicher Konservierung eines Phosphoramidits über mehrere Reaktionsschritte hinweg äußerst schwierig ist, wurde hier auf eine regioselektive Synthese verzichtet. Stattdessen wurden beide Regioisomere, sowohl das 2'-TBS-Isomer **66a** als auch das 3'-TBS-Isomer **66b**, in einer Reaktion gemeinsam hergestellt und voneinander getrennt isoliert. Das in diesem Fall unerwünschte Isomer **66a** kann, falls nötig, unter Zuhilfenahme von stark basischen Bedingungen wieder in eine 1:1-Mischung beider Regioisomere überführt werden. So kann prinzipiell eines der beiden Regioisomere angereichert werden.

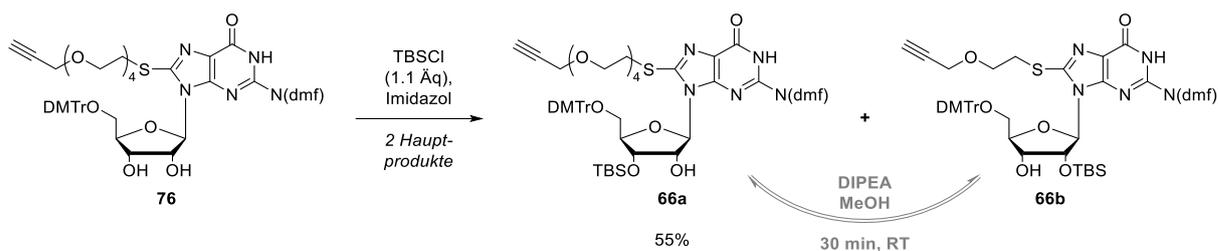
Um dies zu erreichen, wurde die bisher verwendete Syntheseroute angepasst, um schneller zum erwünschten Isomer zu gelangen (**Abbildung 3.34**). Dabei wurden die ersten Schritte zum C<sup>8</sup>-modifizierten Guanosin (**58a**), ausgehend von elementarem Guanosin (**6**), beibehalten (siehe **Kapitel 3.1.3**, **Abbildung 3.24** und **3.26**) und anschließend zum Schützen des exozyklischen Amins mit DMF·DMA umgesetzt (**75**). Daraufhin wurde dann die 5'-OH Gruppe mit DMTrCl geschützt und **76** konnte in 5 Schritten ausgehend von Guanosin (**6**) erhalten werden. Die Bedingungen für die einzelnen Reaktionsschritte sind hier sehr ähnlich zu den in **Kapitel 3.1.3** verwendeten und ergab über die beiden neuen angeordneten Schützungschritte eine Ausbeute von etwa 50%.



**Abbildung 3.34.** Synthese von **76** ausgehend von Guanosin (**6**) in 5 Schritten. a) Bromierung der C<sup>8</sup>-Position, b) Umsetzen zu 8-Thioguanosin (**57**), c) Modifizierung der C<sup>8</sup>-Position zu **58a**, d) Schützen des exozyklischen Amins (**75**), e) Schützen der 5'-Hydroxygruppe (**76**).

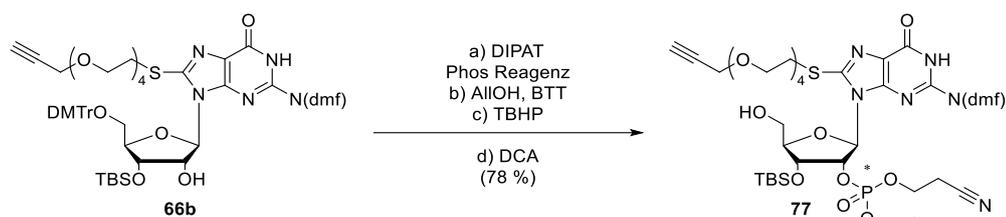
Als nächstes wurden die Hydroxygruppen von **76** geschützt, um so das 2',3'-TBS-Isomerengemisch aus **66a** und **66b** zu erhalten (**Abbildung 3.35**). Sehr große Reaktionsansätze im Gramm-Maßstab haben sich hierfür unter Verwendung von 1.1 bis 1.2 Äquivalenten TBSCl bei Raumtemperatur bewährt. Kleine Ansatzgrößen haben zu insgesamt niedrigeren Ausbeuten geführt, während ein zu großer Überschuss an TBSCl, die Schützung an sowohl der 2'- als auch 3'-Position begünstigen und so zu einem verhältnismäßig hohen Anteil an doppelt geschütztem Nebenprodukt führt.

### 3.1.4 PROTACs auf Basis von 2',3'-cGAMP, modifiziert an C8G



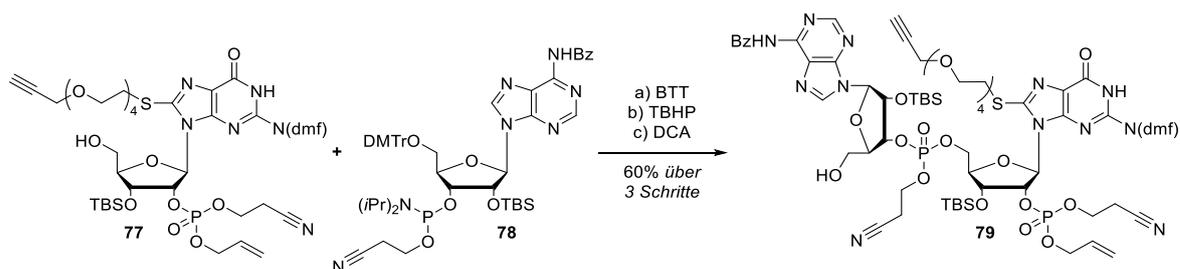
**Abbildung 3.35.** Synthese der Regioisomere **66a** und **66b** über einen nicht-regioselektiven Ansatz.

Als nächstes wurde in einer Eintopfreaktion in 4 Schritten das Phosphoramidit eingeführt und gleich zum geschützten Phosphat **77** überführt (**Abbildung 3.36**). Die Schritte sind auch hier sehr ähnlich zu denen in **Kapitel 3.1.2 (Abbildung 3.11)** und **Kapitel 3.1.3 (Abbildung 3.29)**, ein vollständiger Abschluss jedes Reaktionsschrittes wurde wieder mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR und RP-LCMS ermittelt. Zum Aktivieren des Phosphoramidits wurde diesmal jedoch Diisopropylammoniumtetrazolid (DIPAT) anstelle von PyrTFA verwendet, da es zu einer saubereren Kopplung zwischen Nucleosid und Phosphoramidit führt. Die folgenden drei Schritte, also die Umsetzung zum Phosphit(III)-triester unter Verwendung von BTT und Allylalkohol, die Oxidation zum Phosphat mithilfe von TBHP und das Entfernen der DMTr-Gruppe unter sauren Bedingungen, wurden beibehalten. **77** konnte in einer Ausbeute von 78% über 4 Schritte erhalten werden.



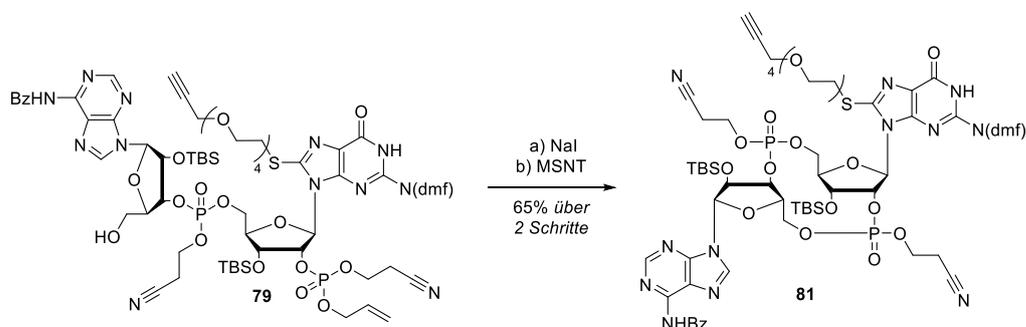
**Abbildung 3.36.** Synthese von Phosphortriester **77**, ausgehend von **66b** über 4 Schritte. a) Einführen des Phosphoramidits, b) Umsetzen zum Phosphit(III)-triester, c) Oxidation zum Phosphor(V)-triester, d) Entfernen der DMTr-Gruppe.

Bei der linearen Kupplung wurden ebenfalls, wie in den vorangegangenen Kapiteln, drei Reaktionsschritte zusammengefasst (**Abbildung 3.37**). Analog zu den vorhergehenden Ansätzen wurde Phosphat **77** vorgelegt und sequenziell eine Lösung des kommerziell erhältlichen Phosphoramidits  $r\text{A}^{\text{Bz}}$ -PA (**78**) und danach BTT zur Reaktion zugegeben. Anschließend wurde der erhaltene Phosphit(III)-triester mittels TBHP zum Phosphor(V)-triester oxidiert und nach wässriger Aufarbeitung die DMTr-Gruppe in Position 5' des Adenosins unter sauren Bedingungen entfernt. Die Gesamtausbeute für **79** über diese drei Reaktionsschritte lag bei 60%.



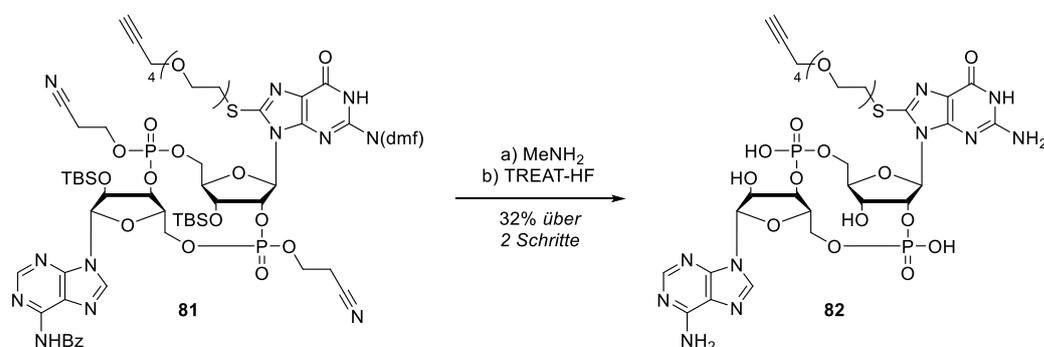
**Abbildung 3.37.** Synthese von linearem Dinucleotid **79** aus Phosphat **77** und kommerziell erhältlichem Phosphoramidit **78** über 3 Schritte. a) lineare Kupplung, b) Oxidation zum Phosphor(V)-triester, c) Entfernen der DMTr-Schutzgruppe.

Als nächstes wurde die Allyl-Gruppe des geschützten Phosphates **79** mit Hilfe von Natriumiodid entfernt (**Abbildung 3.38**) und so das lineare Dinukleotid (**80**) zur intramolekularen Zyklisierung vorbereitet. **80**, welches in einer Ausbeute von 78% erhalten werden konnte, wurde anschließend mittels MSNT zyklisiert. Das geschützte CDN **81** konnte so in einer Ausbeute von 83% erhalten werden.



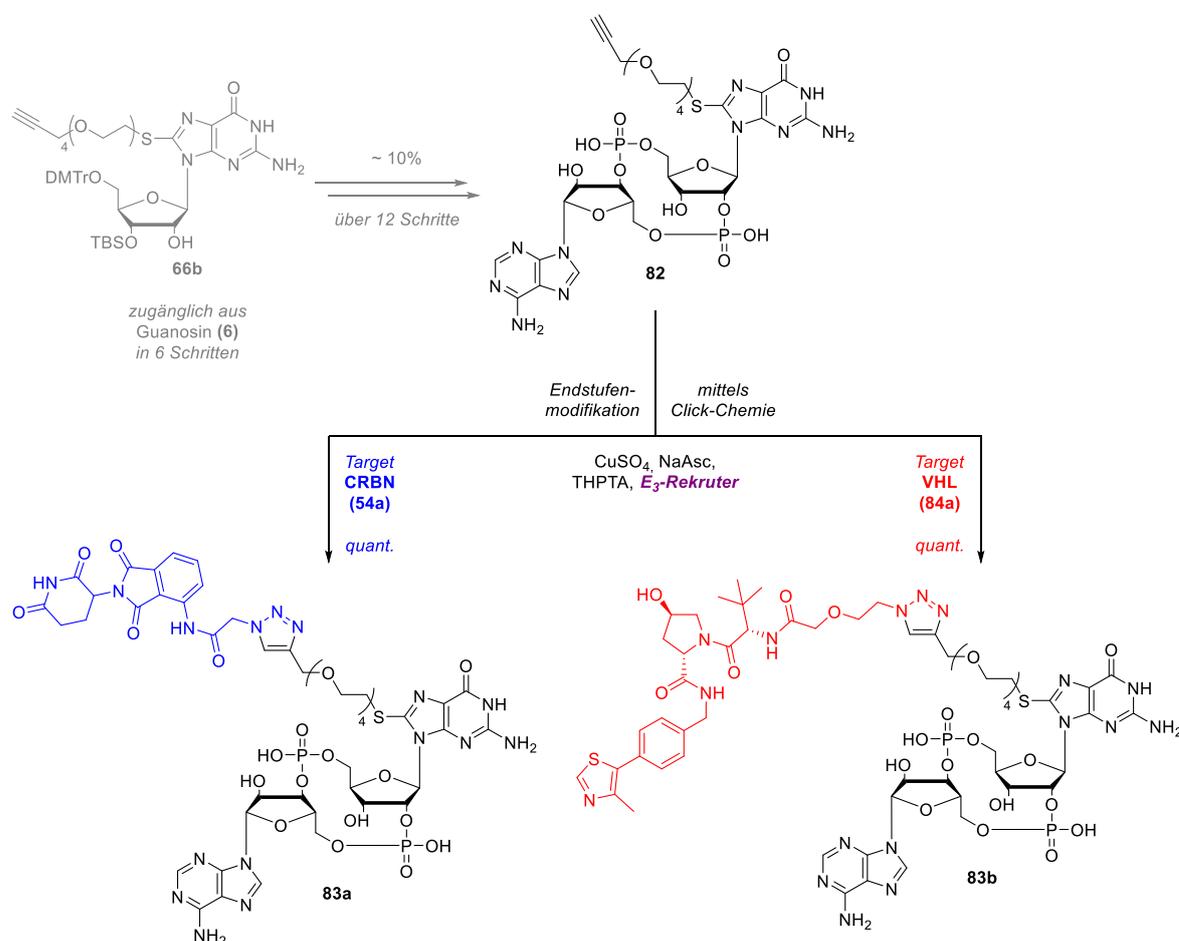
**Abbildung 3.38.** Zyklisierung von linearem Dinukleotid **79** zum geschützten CDN **81** über 2 Schritte. a) Entfernen der Allyl-Schutzgruppe, b) Intramolekulare Zyklisierung über MSNT.

Das geschützte CDN **81** wurde anschließend mit Methylamin und danach mit TREAT-HF bei erhöhten Temperaturen umgesetzt, um alle verbliebenen Schutzgruppen zu entfernen (**Abbildung 3.39**). Das Rohprodukt wurde – nach Quenschen von überschüssigem HF mit TMSOMe – aus Aceton gefällt. **82** konnte nach Aufreinigung mittels RP-HPLC in einer Ausbeute von 32% als einzelnes Isomer erhalten werden. Die Ausbeute für diesen Reaktionsschritt ist weitaus höher als die bisher für Derivate von c-di-GMP erhaltenen Ausbeuten.



**Abbildung 3.39.** Synthese von freiem CDN **82** ausgehend von geschütztem CDN **81** über 2 Schritte. a) Entfernen aller basenlabilen Schutzgruppen, b) Entfernen der Silyl-Schutzgruppen.

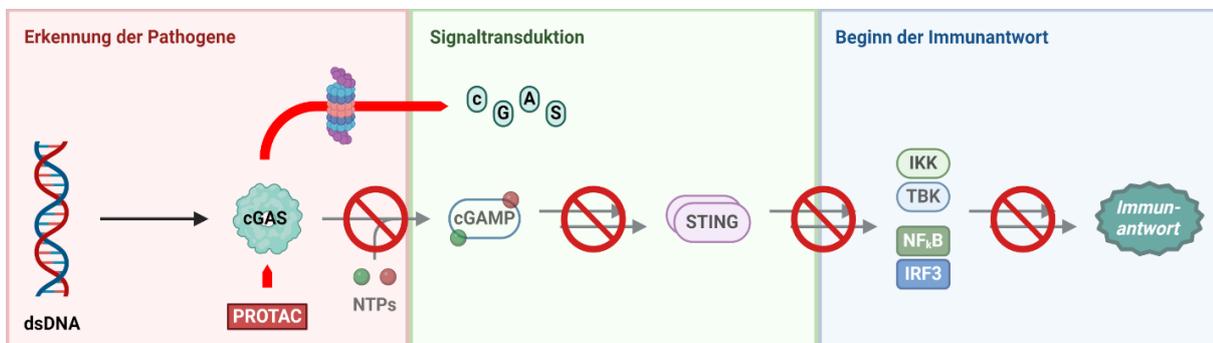
Somit konnte C<sup>8</sup>G-modifiziertes cGAMP (**82**) ausgehend von Nukleosid **66b** in einer Ausbeute von ~10% über 11 Schritte, bzw. ausgehend von Guanosin (**6**) in einer Gesamtausbeute von knapp 2% über 17 Schritte hergestellt werden (**Abbildung 3.40**). Für die Endstufenmodifikation wurden sowohl CRBN- als auch VHL-Rekruter an **82** mittels Click-Chemie gekoppelt (**Abbildung 3.40**). Hierfür wurde unter Sauerstoffausschluss wieder Cu(I) *in situ* über CuSO<sub>4</sub> mit NaAsc als Reduktionsmittel hergestellt und THPTA als wasserlöslicher Chelator und Stabilisator verwendet. Dabei konnten nach Entfernen von DMSO durch Lyophilisieren und einer darauffolgenden Aufreinigung mittels RP-HPLC sowohl der CRBN-PROTAC **83a** als auch der VHL-PROTAC **83b** in jeweils nahezu quantitativer Ausbeute erhalten werden. Weitere physikochemische und biologische Untersuchungen dieser beiden Substanzen stehen aus.



**Abbildung 3.40.** Synthese potenzieller PROTACs **83a** und **83b**, ausgehend von **82** über Click-Chemie.

### 3.2 PROTACs gegen cGAS

Ein weiterer Ansatz zur Herunterregulierung der cGAS-STING-Kaskade bei Autoimmun- und autoinflammatorischen Erkrankungen wäre die Entwicklung von PROTACs gegen cGAS – das Protein, welches fremde zytosolische dsDNA erkennt und den *second messenger* cGAMP für STING synthetisiert, der dann die Signalkaskade zur Zytokin- und Interferonantwort auslöst (**Abbildung 3.41**). Ein solcher cGAS-spezifischer PROTAC würde die Signalkaskade durch die fehlende Produktion des *second messengers* eine Ebene höher, also bei der Erkennung von Pathogenen, unterbrechen. Da STING ohne *second messenger* in der Regel nicht aktiviert werden kann, sollte somit auch die Ausschüttung von Zytokinen und Interferonen unterbunden werden. Einen potenziellen Nachteil hat dieser Ansatz jedoch, denn auf diese Weise könnten Mutanten von STING oder cGAS, welche unabhängig von cGAMP bzw. anderen CDNs oder ONs ihre Funktion durch *gain-of-function mutations* noch entfalten können, nicht unterbunden werden.

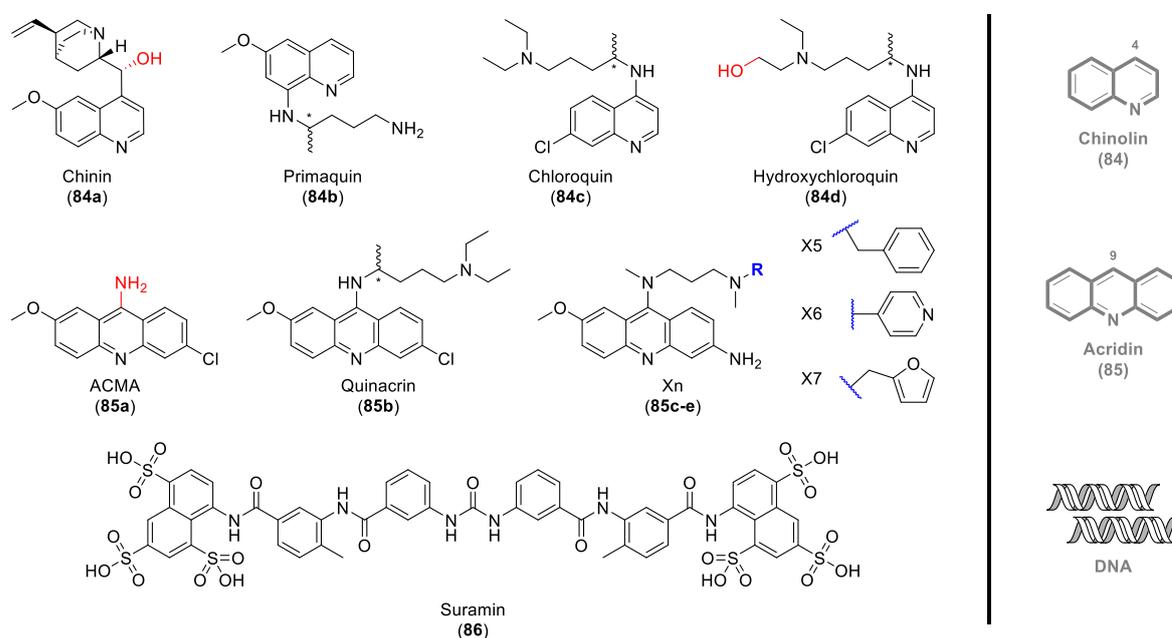


**Abbildung 3.41.** Darstellung der negativen Regulation der cGAS-STING-Kaskade mithilfe eines auf cGAS abzielenden PROTAC. Dieser PROTAC soll an cGAS binden und das Protein somit zum Abbau markieren. Dadurch soll die Produktion von cGAMP eingeschränkt, STING nicht mehr aktiviert und die Immunantwort letztendlich unterbunden werden. Abbildung erstellt mit *BioRender*.

Bei der Entwicklung von PROTACs gegen cGAS, die bestenfalls nicht kovalent an ein aktives Zentrum binden sollen, ist zu beachten, dass cGAS zwei Bindungstaschen besitzt: eine für die Erkennung von Oligonukleotiden und eine für die Synthese von cGAMP aus Nukleosidtriphosphaten (NTPs). Im Idealfall sollten unabhängig von der Bindungstasche Motive genutzt werden, die hochspezifisch an cGAS binden, ohne es zu aktivieren. Das wären klassische Inhibitoren. Derivate einzelner NTPs, welche immer als 5'-Triphosphat vorliegen und auch in dieser Form für die Bildung von cGAMP benötigt werden, disqualifizieren sich automatisch, da diese auch von vielen anderen Enzymen genutzt und erkannt werden können.<sup>[228]</sup> Für Inhibitoren von cGAS gibt es in der Literatur einige Beispiele, sowohl auf Basis von *small molecules* als auch anderer Stoffklassen. Dabei binden diese Inhibitoren in der Regel entweder kompetitiv an die Bindungsstelle für dsDNA, lagern sich zwischen das Protein und die dsDNA ein, oder binden kompetitiv an die Bindungsstelle für NTPs.<sup>[71]</sup> Um eine erste Einschätzung darüber treffen zu können, welche dieser Moleküle als gute Kandidaten für cGAS-PROTACs agieren könnten und an welchen Stellen diese modifiziert werden können, wurde auch hier zuallererst auf Kristallstrukturen sowie *in silico* Studien und weiterführende Publikationen zurückgegriffen.

### 3.2.1 cGAS-PROTACs auf Basis von *small molecule inhibitors*

Einer der ersten Klassen an Molekülen, bei denen eine Inhibition von cGAS nachgewiesen werden konnte, waren Substanzen, welche bereits zuvor gegen Malaria eingesetzt worden sind.<sup>[229-231]</sup> Die meisten dieser synthetischen Verbindungen haben ein Grundgerüst basierend auf Chinolin (**84**, **Abbildung 3.42**, Reihe 1) oder basierend auf Acridin (**85**, **Abbildung 3.42**, Reihe 2). Allen diesen Substanzen ist gemein, dass sie über die Position 4 in Chinolin bzw. über die Position 9 in Acridin über das exozyklische Amin modifiziert sind. Suramin (**86**) ist hierbei ein Außenseiter, denn es bindet durch seine vielen negativ geladenen Sulfonsäuregruppen in der DNA-Bindungsstelle und agiert somit als kompetitiver Inhibitor für dsDNA, hat aber gleichzeitig durch seine strukturelle Ähnlichkeit auch dasselbe Problem wie DNA die Zellmembranen zu überwinden (**Abbildung 3.42**, Reihe 3).<sup>[232]</sup>



**Abbildung 3.42.** Übersicht über pharmakologisch genutzte Substanzen gegen Malaria auf Basis von Chinolin (Reihe 1) oder Acridin (Reihe 2), welche mit cGAS interagieren. Diese Substanzen binden an der Grenzfläche zwischen dsDNA und cGAS. Zusätzlich ist Suramin (Reihe 3) gezeigt, welches durch seine vielen negativen Ladungen kompetitiv zu dsDNA an cGAS binden kann. In Rot sind potenziell geeignete Reste für eine Endstufenmodifikation dargestellt.

AN *et al.* haben diese Antimalaria-Substanzen an cGAS mithilfe mehrerer Methoden untersucht und zum Teil auch neue Derivate synthetisiert.<sup>[229, 231]</sup> Die Auswirkung dieser Moleküle auf die Interaktion zwischen cGAS und dsDNA wurde mittels *electron mobility shift assays* (EMSA) experimentell bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass diese Inhibitoren die Interaktion zwischen cGAS und dsDNA konzentrationsabhängig stören und dsDNA wieder freigesetzt wird. Weiterhin konnte die Syntheseaktivität von cGAS mittels Isotopenmarkierter NTPs in Anwesenheit von Inhibitoren gemessen werden. Dabei wurde durch die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (engl. *reverse transcriptase polymerase chain reaction*, rtPCR) die Freisetzung von mRNA zur Produktion von IFN- $\beta$  untersucht und daraus jeweils IC<sub>50</sub>-Werte (halbmaximale inhibitorische Konzentration) errechnet werden. Dabei waren die Acridin-basierten Substanzen deutlich potenter als die Chinolin-basierten. Chinin (**84a**) hat hierbei am schlechtesten abgeschnitten (**Tabelle 1**).

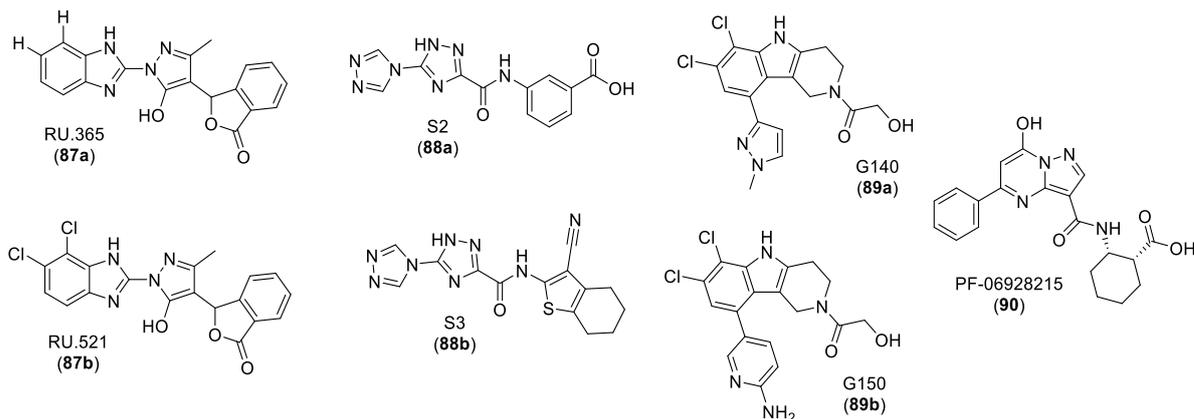
**Tabelle 1.** Berechnete Bindungsenergien und experimentell bestimmte IC<sub>50</sub>-Werte der Inhibitoren aus Abbildung 3.41.

	$\Delta G_{b1}$ [kJ/mol]	$\Delta G_{b2}$ [kJ/mol]	IC <sub>50</sub> (cGAMP) [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> (IFN- $\beta$ ) [ $\mu$ M]
CHININ	-8.0	-8.2	2063	93.1
PRIMAQUIN	-6.6	-6.8	823	83.9
CHLOROQUIN	-6.1	-6.7	823	23.0
HYDROXYCHLOROQUIN	-6.6	-7.0	354	27.2
ACMA	-7.4	-7.7	32	5.3
QUINACRIN	-7.5	-8.0	13	3.7
X5	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	19	13
X6	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	23	14
X7	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	22	5

Bei *in silico* Studien von AN *et al.* stellte sich heraus, dass alle Substanzen an der Grenzfläche zum Protein sequenzunabhängig in die kleine Furche der dsDNA interkalieren sollen.<sup>[230, 231]</sup> Dies ist im Einklang mit der beobachteten Eigenschaft, dass in Anwesenheit der Inhibitoren mehr dsDNA freigesetzt wird. Interessant ist hierbei, dass die Wirksamkeiten der Substanzen sehr weit auseinander liegen, obwohl die berechneten Bindungsenergien sehr ähnlich zueinander sind. Weiterhin fällt bei den *in silico*-Studien auf, dass die Ausrichtung der Reste nicht einheitlich zu sein scheint: während die Acridin-basierten Substanzen sich mit ebendiesem Motiv in die kleine Furche setzen, ist dies bei den Chinolin-basierten Substanzen nicht einheitlich – mal ist das aromatische Rückgrat mehr dem Protein, mal mehr der DNA zugewandt. Dieses Verhalten könnte die Unterschiede im Potenzial der einzelnen Substanzen erklären. Auch wurden diese Studien erfolgreich als Grundlage für das Design von X5 (**85c**), X6 (**85d**) und X7 (**85e**) genutzt. Vor allem zeichnet sich X6 (**85d**) gegenüber den anderen Acridin-basierten Inhibitoren durch eine niedrigere Zytotoxizität bei ähnlichen Aktivitäten aus. Hierbei muss angemerkt werden, dass *in silico*-Studien rein theoretischer Natur und deshalb nicht als absolut verlässlich anzuerkennen sind.<sup>[229]</sup>

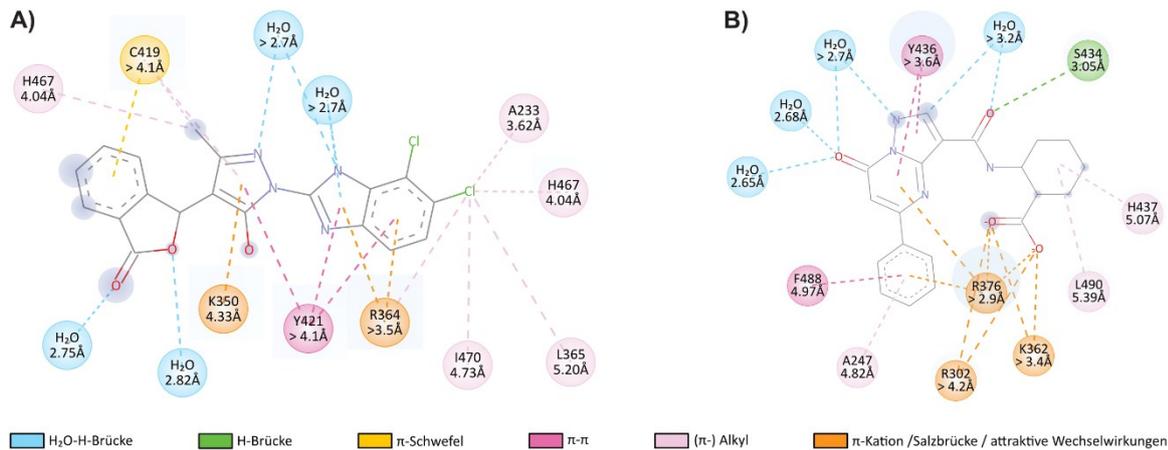
Trotz dieser positiven Ergebnisse sind PROTACs auf Basis von Chinolin (**84**) und Acridin (**85**) nicht unbedingt so geeignet, wie sie zu sein scheinen. Zuallererst darf nicht unterschlagen werden, dass diese Substanzen vorrangig gegen andere Krankheiten entwickelt worden sind und somit die benötigte hohe Spezifität von PROTACs nicht unbedingt gewährleistet werden kann. Des Weiteren stellt die Art der Interaktion dieser Substanzen ein Problem dar: sie benötigen immer dsDNA, um überhaupt mit cGAS wechselwirken zu können. Dies macht den zur Aktivität von PROTACs benötigten ternären Komplex zu einem quaternären Komplex und bringt wiederum zwei weitere Probleme mit sich – der dadurch entstehende sterische Anspruch und die unterschiedlichen Arten der Interaktion zwischen den Inhibitoren und der DNA. Hier bieten sich die Acridin-basierten Inhibitoren an – allen voran ACMA (**85a**), da zumindest bei diesen von einer einheitlichen Interaktion zu DNA ausgegangen werden kann.<sup>[231]</sup> Dennoch ist eine Modifikation zu einem PROTAC nicht trivial, da zusätzlich noch die E3-Ligase in einer bevorzugten räumlichen Orientierung rekrutiert werden muss.

Aufgrund dieser Datenlage wurde auf eine Synthese von potenziellen PROTACs basierend auf Chinolin und Acridin vorerst verzichtet. Auf der Suche nach weiteren Kandidaten als Grundlage für funktionale cGAS-PROTACs sind wir auf Inhibitoren gestoßen, welche an das aktive Zentrum zur Synthese von cGAMP (**1**), ausgehend von den NTPs, binden (**Abbildung 3.43**).<sup>[233-236]</sup> Diese Moleküle lassen sich nicht wie die zuvor besprochenen Inhibitoren grob in Stoffklassen zuordnen und sind in den meisten Fällen durch *in silico*-Studien oder mittels Hochdurchsatz-Screenings (*high-throughput-screening*, HTS) entdeckt und anschließend iterativ durch Analysen der Struktur-Wirkungs-Beziehung (*structure activity relationship*, SAR) verbessert worden.



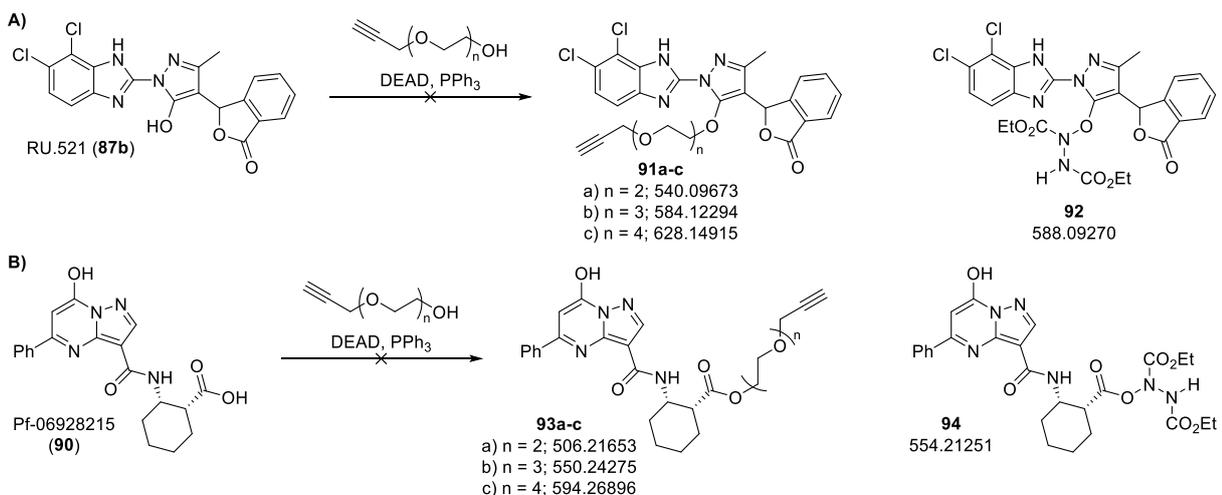
**Abbildung 3.43.** Verschiedene Vertreter von cGAS-Inhibitoren, welche auf die NTP-Bindungstasche abzielen.

Mit Hinblick auf die Herstellung eines produktiven PROTACs gegen cGAS wurden diese Inhibitoren neben ihrer Verfügbarkeit und synthetischer Zugänglichkeit hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität und Bindungsgeometrie im aktiven Zentrum geprüft. Hierbei kristallisierten sich RU.521 (**87b**) und PF-06928215 (**90**) als mögliche Favoriten heraus (**Abbildung 3.43**). RU.521 (**87b**) weist mit einer Bindungsaffinität ( $K_d$ ) von 36.2 nM und einer inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von 0.7  $\mu$ M gute Eigenschaften für eine Grundlage als PROTAC auf. Weiterhin haben Kristallstrukturanalysen gezeigt, dass das Molekül größtenteils über  $\pi$ -stacking und hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Protein interagiert und die Hydroxygruppe des Pyrazolol-Gerüsts nicht an der Interaktion beteiligt ist (**Abbildung 3.44A**).<sup>[235]</sup> PF-06928215 (**90**) kann in Studien mit einer  $K_d$  von 200 nM und einer  $IC_{50}$  von 4.9  $\mu$ M Werte in ähnlichen Größenordnungen erzielen wie RU.521 (**87b**). In diesem Molekül bietet sich zur Funktionalisierung die Carbonsäure an, da sie aus der aktiven Tasche heraussteht. Hier muss aber festgehalten werden, dass die Carbonsäure im Gegensatz zur Hydroxygruppe von RU.521 an der Interaktion zum Protein beteiligt ist (**Abbildung 3.44B**).<sup>[236]</sup> Eine Modifikation sollte dennoch ohne signifikante Verschlechterung der Bindungsaffinität möglich sein. Beide Substanzen sind kommerziell erwerblich, jedoch nicht günstig. Um so viele Reaktionsbedingungen wie möglich zu testen, wurden die nachfolgenden Versuche in sehr kleinen Maßstäben von bis zu maximal 1 mg durchgeführt.



**Abbildung 3.44.** Zweidimensionalen Darstellung der Interaktion von cGAS mit RU.521 (A, PDB: 5XZG)<sup>[235]</sup> und PF-06928215 (B, PDB: 6LRC).<sup>[236]</sup> Distanzen sind abgerundet in Angström angegeben, dabei ist immer die kürzeste Distanz angegeben, wenn eine Aminosäure an mehrere Positionen koordiniert. Abbildung erstellt mit *Biovia Discovery Studio Visualizer 2024*.

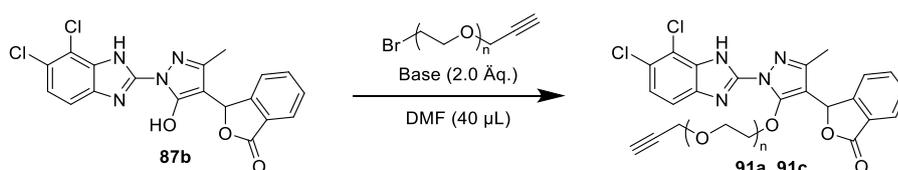
Als erster Ansatz wurde ähnlich zu den O<sup>6</sup>-modifizierten PROTACs gegen STING (siehe **Kapitel 3.1.2**) eine Mitsunobu-Reaktion als Schlüsselschritt zum Einbringen einer Modifikation getestet. In der Theorie sollten die pK<sub>a</sub>-Werte der Hydroxygruppe von RU.521 (**87b**) mit 6.4 und die der Säuregruppe von PF-06928215 (**90**) bei 3.7 (berechnet mit MarvinSketch) azide genug für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt sein und jeweils zu den veretherten Produkten **91a-c** bzw. den veresterten Produkten **93a-c** führen. Jedoch konnte kein Umsatz zu den jeweiligen Produkten beobachtet werden. Stattdessen wurde in beiden Fällen entweder nur Startmaterial oder eine Spezies beobachtet, die laut RP-LCMS Analyse einer gequenschten reaktiven Zwischenstufe mit dem DEAD entsprechen könnten. Ein Umsatz mit Linkern unterschiedlicher Länge konnte bei keinem Versuch festgestellt werden; Änderungen der Reaktionsdauer und -temperatur führten nur zu einer Mehrung der gequenschten Zwischenstufe, nicht zum jeweiligen gewünschten Produkt (**Abbildung 3.45**).



**Abbildung 3.45.** Untersuchte Mitsunobu-Reaktionen an A) RU.521 (**87b**) und B) PF-06928215 (**90**) mit unterschiedlich langen PEG-Linkern. Anstelle der erwarteten Produkte **91a-c** und **93a-c** konnten mittels RP-LCMS nur Substanzen detektiert werden, welche jeweils dem Startmaterial oder einer abreagierten Zwischenstufe mit DEAD entsprechen (**92** und **94**).

Dies kann sich eventuell auf eine höhere Reaktivität des Betains im Vergleich zu den anderen Reaktanden zurückführen lassen, da allem Anschein nach weder Sterik noch Regioselektivität die Reaktion beeinträchtigen und sich nur die Startmaterialien oder die gewünschten Zwischenstufen finden lassen.<sup>[237]</sup> Basierend auf diesen Ergebnissen wurde diese Syntheseroute vorerst nicht weiterverfolgt und es wurden andere Ansätze zur Modifikation dieser Positionen untersucht. Die Mitsunobu-Reaktion selbst wurde jedoch permanent weiter erforscht und mittlerweile wurden viele Kombinationen verschiedenster Phosphane, Azodicarboxylate und Lösemittel publiziert, um Reaktionen zu katalysieren, welche nicht unter klassischen Bedingungen zum gewünschten Produkt führen.<sup>[195, 197, 198]</sup> Eventuell lässt sich unter diesen eine Kombination finden, um die Reaktion an RU.521 (**87b**) und PF-06928215 (**90**) unter Mitsunobu-Bedingungen erfolgen zu lassen.

Eine weitere Herangehensweise für eine Veretherung der Hydroxygruppe an RU.521 (**84**) ist in diesem Fall eine nukleophile Substitution an einem bromierten Linker in Anwesenheit einer Base (**Abbildung 3.46**). Um die besten Reaktionsbedingungen zu ermitteln, wurde die Reaktion wie zuvor in Maßstäben von maximal 1 mg mit verschiedenen Basen und Linkerlängen getestet. Eine Auswahl der getesteten Bedingungen ist in **Tabelle 2** zu finden, die Prozente beziehen sich hier auf die Integrale in der RP-LCMS bei 260nm.



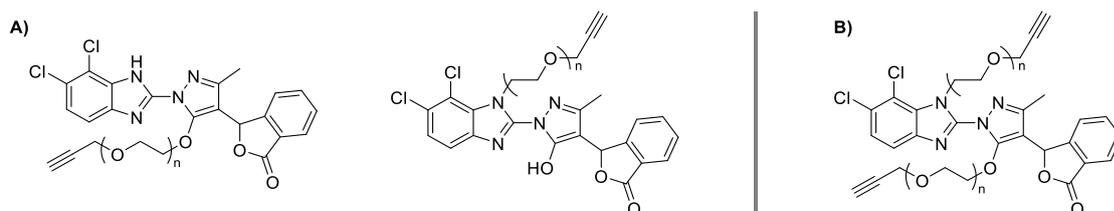
**Abbildung 3.46.** Veretherung von RU.521 (**87b**) unter basischen Bedingungen. n = 2 oder 4.

Hier wurde eine Bandbreite an Basen mit verschiedenen Eigenschaften und  $pK_a$ -Werten getestet und für die Linkerlängen die sich wiederholenden Einheiten von 2 und 4 getestet. Die Reaktionen wurden in DMF durchgeführt, um die Löslichkeit als möglichen Faktor auszuschließen, und der Reaktionsverlauf wurde in regelmäßigen Abständen mit Hilfe von RP-LCMS untersucht.

**Tabelle 2.** Getestete Bedingungen für die nukleophile Veretherung an RU.521 (**87b**) in DMF unter basischen Bedingungen.

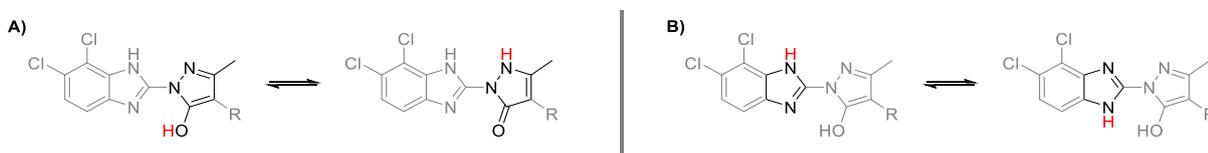
EINTRAG	BASE (2.0 Äq.)	PEG <sub>n</sub> (1.5 Äq.)	t [d]	T [°C]	ERGEBNIS
1	NaH	2 oder 4	7	rt	größtenteils SM
2	KOtBu	2 oder 4	7	rt	größtenteils SM
3	DIPEA	2 oder 4	7	rt	größtenteils SM
4	NaH	2	1	60	größtenteils Bissubstitution
5	KOtBu	2	1	60	größtenteils SM, wenig mono
6	DIPEA	2	1	60	wenig SM, 78% mono, 5% bis
7	NaH	4	1	60	größtenteils SM
8	KOtBu	4	1	60	größtenteils SM
9	DIPEA	4	1	60	20% SM, 70% mono, 0% bis

Als Favorit stellte sich bei diesem *screening* Diisopropylethylamin (DIPEA) als Base im doppelten Überschuss bei 60 °C heraus. Jedoch ließen sich hier per RP-LCMS weitere Substanzen bei unterschiedlichen Retentionszeiten finden, die entweder dasselbe Molekulargewicht wie das gewünschte Produkt (**Abbildung 3.47A**) oder das einer doppelten Substitution aufwiesen (**Abbildung 3.47B**). Die Linkerlänge scheint dabei einen Einfluss auf das Verhältnis der entstehenden Substanzen zu haben. Während bei Umsatz mit dem kürzeren Linker kein Startmaterial mehr zu finden ist, so ist der Anteil an Doppelsubstitution höher. Der längere Linker reagiert insgesamt langsamer und unvollständig, ergibt aber weniger doppelt substituiertes Produkt.



**Abbildung 3.47.** Mögliche Strukturen der mittels RP-LCMS ermittelten Massen bei der Veretherung von RU.521 (**87b**). **A)** Regioisomere einer Monosubstitution. **B)** Bissubstitution.

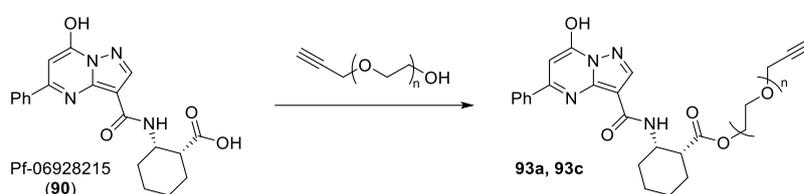
Bei der Substanz identischer Masse mit dem Produkt liegt die Bildung eines Regioisomers nahe. Hier kann zum einen die Umlagerung des Pyrazolols zum Pyrazolon stattfinden und so zu zwei verschiedenen deprotonierbaren Spezies führen (**Abbildung 3.48A**). Zum anderen kann aber auch das mesomer grenzstabilisierte Benzimidazol deprotoniert werden (**Abbildung 3.48B**). Aufgrund des Gleichgewichts zwischen Pyrazolol und Pyrazolon und der erhöhten Reaktivität des Pyrazolols ist die Bildung eines Regioisomers durch die Reaktion am Benzimidazol jedoch wahrscheinlicher. Die Doppelsubstitution wird demnach wahrscheinlich durch jeweils einmalige Substitution an diesen beiden Positionen erfolgen. Für eine eindeutige Identifikation müssen diese Moleküle im größeren Maßstab hergestellt, isoliert und per NMR untersucht werden. Leider ist ein *scale-up* dieser Reaktion ausgehend von den zuvor optimierten Reaktionsbedingungen bisher nicht möglich gewesen.



**Abbildung 3.48.** Darstellung der potenziellen Positionen reaktiver Protonen an RU.521 (**87b**), welche zu dem Produktgemisch aus Regioisomeren und/oder Mono- und Bissubstitutionen führen können. **A)** Pyrazolol-Pyrazolon-Tautomerie. **B)** Grenzstrukturen des Benzimidazols. R = Isobenzofuranon.

Da die Synthese ausgehend von RU.521 (**87b**) sehr kostspielig ist, müssen weitere Untersuchungen mit Bedacht gewählt werden. Weitere Screenings auf bisherigem Maßstab können eventuell zu noch besseren Ausbeuten führen und das Gleichgewicht weiter zu Gunsten eines monosubstituierten Produktes verschieben, garantieren aber wie hier schon gezeigt kein erfolgreiches *scale-up*. Eventuell muss bei nicht erfolgreichem *scale-up* sogar eine Syntheseroute ausgehend von kommerziell erhältlichen Vorstufen neu entwickelt werden.

Anschließend wurde eine potenzielle Veresterung bzw. Amidierung der Carbonsäure an PF-06928215 (**90**) untersucht. Im ersten Schritt wurde die Veresterung genauer untersucht; jedoch sollte für *in vitro* und *in vivo*-Studien der Fokus auf die Amidierung verlegt werden, da eine Amidbindung unter physiologischen Bedingungen eine höhere Stabilität aufweist als eine Esterbindung. Auch hier wurde ein Screening hinsichtlich der optimalen Bedingungen mit verschiedenen Kombinationen aus Aktivatoren und Kopplungsreagenzien in Ansatzgrößen von etwa 0.5 mg Startmaterial in DMF betrieben (**Abbildung 3.49, Tabelle 3**). Klassische Bedingungen zur Veresterung nach STEGLICH<sup>[238]</sup> mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) führten mit Abstand zu den besten Ausbeuten, gefolgt von einer Umsetzung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC·HCl) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt). Alle anderen getesteten Kombinationen führten hier zu einer Zersetzung oder zu keinem Umsatz. Jedoch war auch hier, ähnlich wie bei der Veretherung an RU.521 (**87b**), ein *scale-up* schwierig und die Länge des Linkers scheint auch hier Einfluss auf die Reaktivität zu haben.



**Abbildung 3.49.** Veresterung an PF-06928215 (**90**) an der Carbonsäure mit Alkin-Linkern. n = 2 oder 4.

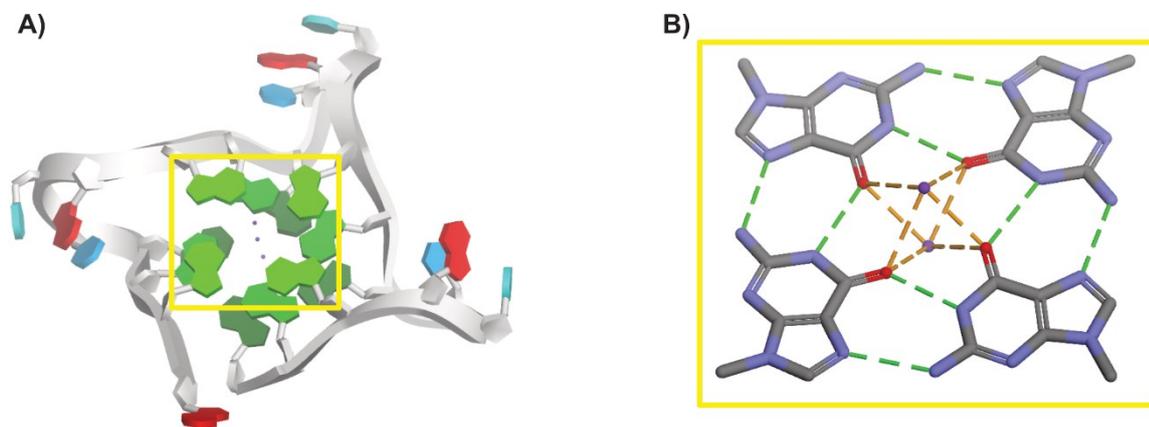
**Tabelle 3.** Übersicht über die getesteten Bedingungen zur Veresterung von PF-06928215 (**90**) an der Carbonsäure.

KOPPLUNGS-REAGENZ (Äq.)	AKTIVATOR (Äq.)	BASE (Äq.)	PEG <sub>2</sub> (Äq.)	t [d]	T [°C]	ERGEBNIS	FARBE
EDC·HCl (1.2)	HOBt·H <sub>2</sub> O (1.2)	DIPEA (1.2)	1.2	1 – 4	rt → 60	x (Zersetzung)	braun
DCC (1.3)	HOBt·H <sub>2</sub> O (1.3)	Pyr (10 µL)	1.3	1 – 4	rt → 60	x (Zersetzung)	orange
EDC·HCl (10)	HOBt·H <sub>2</sub> O (10)	DIPEA (10)	10	0.75	rt	✓ (40% Produkt)	gelb
DCC (10)	DMAP (1)	–	10	0.75	rt	✓ (quantitativ)	gelb
DIC (10)	Oxyrna (10)	DIPEA (10)	10	0.75	rt	x (Startmaterial)	rot
DMTMM (10)	–	–	10	0.75	rt	x (Startmaterial)	grün

Die Untersuchungen zur Synthese potenzieller cGAS-PROTACs auf Basis bekannter *small molecules* für cGAS wurde an dieser Stelle eingestellt. Zwar besteht großes Potenzial für Substanzen dieser Klasse, jedoch ist die Synthese ausgehend von den kommerziell erhältlichen Inhibitoren sehr schwierig und kosteneffizient. Es muss mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Syntheseroute aus kleineren Bausteinen und Vorstufen entwickelt werden, um zielführend und in hohen Ausbeuten zu potenziellen cGAS-PROTACs dieser Art zu gelangen.

### 3.2.2 cGAS-PROTACs auf Basis von G-Quadruplexen

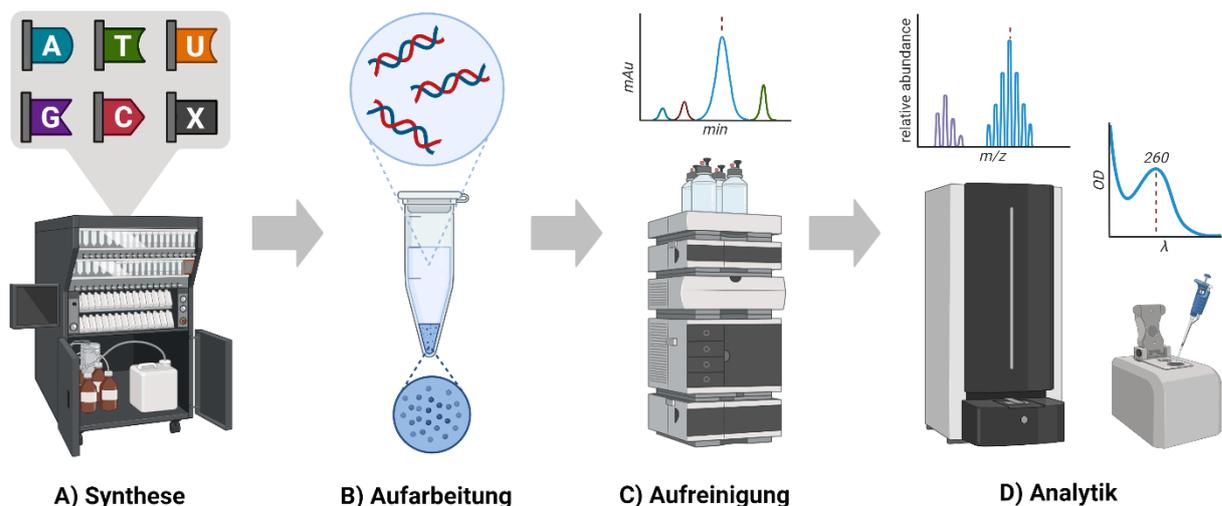
Im Jahr 2017 wurde von STEINHAGEN *et al.* eine inhibitorische Wirkung des Oligonukleotid A151 auf cGAS nachgewiesen.<sup>[239]</sup> Das Oligonukleotid A151 ist eine modifizierte ssDNA mit einer Länge von 24 Nukleobasen. Diese ssDNA hat die Sequenz 5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3', welche aus dem sich viermal wiederholenden telomerische Motiv (*repeat*) TTAGGG besteht, und ein Rückgrat aus Phosphorthioaten besitzt. A151 soll unter physiologischen Bedingungen einen G-Quadruplex ( $G_4$ ) ausbilden (**Abbildung 3.50A**) – eine Sekundärstruktur, welche bei G-reichen Sequenzen auftritt und sich durch Ebenen von jeweils vier um Kalium koordinierenden Guanosinen auszeichnet (sogenannten G-Tetraden,  $G_{tet}$ ), welche übereinander geschichtet sind (**Abbildung 3.50B**).<sup>[240]</sup> Während die Präsenz der Phosphorthioate für die Wirkung der Substanz wichtig zu sein scheint, deutet eine Kristallstrukturanalyse der unmodifizierten Sequenz mit kanonischem Phosphordiester-Rückgrat auf die Topologie eines parallelen G-Quadruplexes.<sup>[241]</sup>



**Abbildung 3.50.** Kristallographische Analyse von Oligonukleotidsequenz A151 (PDB: 1KF1).<sup>[241]</sup> **A)** Gesamtansicht des G-Quadruplexes. In Grün Guanin, in Rot Adenin, in Blau Thymin, in Lila Kalium. **B)** Interaktionen innerhalb der G-Tetrade. In Grün Wasserstoffbrückenbindungen, in Orange ioniische Wechselwirkungen. Abbildung erstellt mit *Biovia Discovery Studio Visualizer 2024*.

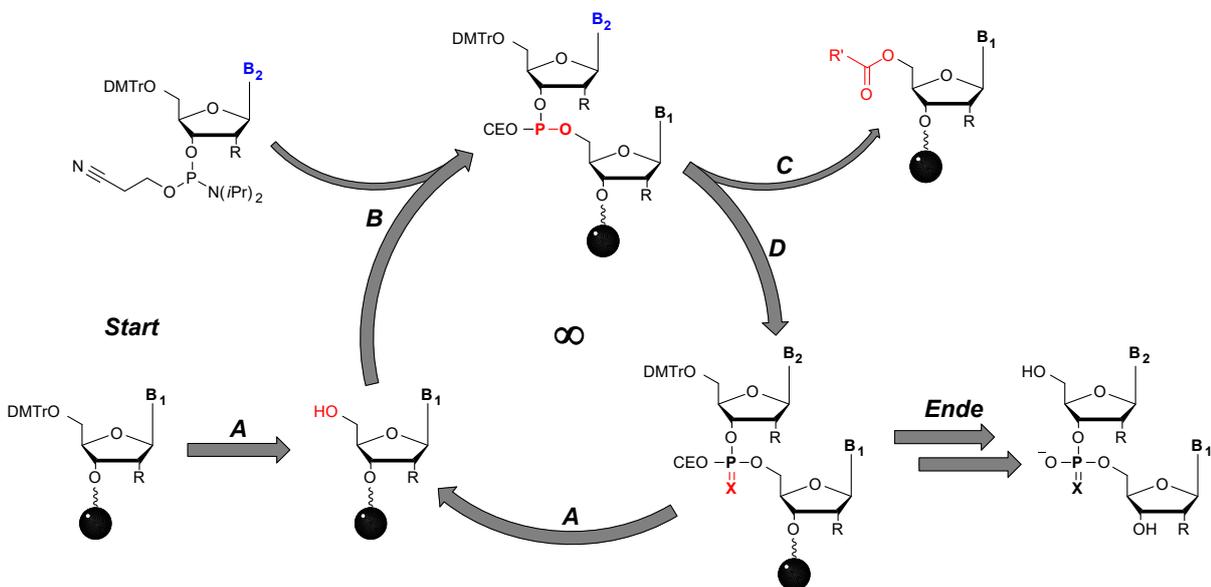
Da noch keine Kristallstrukturen von cGAS im Komplex mit einem  $G_4$  publiziert wurden, ist die Art und Weise der Wechselwirkung zwischen cGAS und  $G_4$  schwer abzuschätzen. Die hohe Affinität, guten inhibitorischen Eigenschaften von A151 sowie die Existenz anderer  $G_4$ -basierter PROTACs bilden jedoch ein solides Fundament, um von dieser Sequenz ausgehend einen PROTAC herzustellen.<sup>[242-244]</sup> Jedoch sind die in Kapitel 3.1 verwendeten Modifikationen an Guanosin nicht mit der Ausbildung von  $G_4$  verträglich: da sowohl  $O^6$  als auch  $N^1$ ,  $N^2$  und  $N^7$  an stabilisierenden Wechselwirkungen beteiligt sind (**Abbildung 3.50B**), kann sich eine Modifikation dieser oder angrenzender Positionen sowohl aufgrund veränderter elektronischer als auch sterischer Effekte negativ auf die Ausbildung der  $G_{tet}$  auswirken. Jedoch sollte eine Modifikation der Nukleobasen, die nicht aktiv an der Struktur des  $G_4$  beteiligt sind, möglich sein. So könnte eine niedrigere Interaktion mit den G-Tetraden und damit einhergehend von keiner Störung der Quadruplexstruktur durch die eingeführten aromatischen Gruppen auszugehen sein. Aufgrund der hohen Symmetrie der Sequenz nach Ausbildung eines  $G_4$ , wurde die ersten beiden *repeats* genauer für eine Modifikation betrachtet, wobei sich das zweite T aufgrund seiner prominenten Exposition besonders anzubieten scheint.

Um Oligonukleotide einer solchen Länge – mit teils unnatürlich modifizierten Nucleobasen – herzustellen, ist eine manuelle Synthese wie bei den zyklischen Dinukleotiden (siehe Kapitel 3.1) nicht praktikabel. Hierzu bieten sich automatisierte, maschinelle Synthesemethoden an. Dabei hat sich die Oligonukleotidsynthese an der Festphase mittels Phosphoramiditchemie in *DNA/RNA-Synthesizern* durchgesetzt (**Abbildung 3.51A**).<sup>[87, 88, 245]</sup> Ein solcher *Synthesizer* ist fundamental betrachtet ein computer-gesteuertes Pumpensystem, welches die gelösten Reaktanden unter Argon- oder Helium-Gegenstrom in einer bestimmten vorprogrammierten Reihenfolge in und aus den einzelnen Reaktionskammern pumpt. Dabei erhält jede Substanz ihren eigenen Anschluss und es können mehrere Oligonukleotide parallel – in umgekehrter Sequenz ausgehend vom 3'-Ende – in hohen Ausbeuten und bis zu einer Länge von 100 Nucleotiden hergestellt werden. Zudem erleichtern die Reaktionen an der Festphase die Synthese ungemein: durch das Spülen des Festphasenmaterials zwischen den einzelnen Reaktionsschritten werden Verunreinigungen aus den Reaktionskammern entfernt und Nebenreaktionen und Kontaminationen können vermieden werden, ohne Zwischenprodukt zu verlieren. So werden menschliche Fehler ausgeschlossen und Verluste zwischen den einzelnen Reaktionsschritten stark reduziert, und unter maximal optimierten Bedingungen sowohl von technischer als auch von chemischer Seite kann eine Inkorporationsrate von über 99% pro Nucleotid erreicht werden. Jedoch müssen diese Optimierungen für die einzelnen Oligonukleotide oftmals neu untersucht und angepasst werden, denn die Komplexität steigt mit der Länge der Oligonukleotide und der Anzahl unnatürlich modifizierter Nucleotide exponentiell an. Nach der Synthese werden die erhaltenen Oligonukleotide aufgearbeitet, indem sie von ihren Schutzgruppen befreit und vom Festphasenmaterial abgespalten werden. Anschließend werden die Oligonukleotide mit einer geeigneten Methode aufgereinigt und isoliert und mittels verschiedener Verfahren auf dessen Reinheit und Sequenz untersucht (**Abbildung 3.51B-D**).



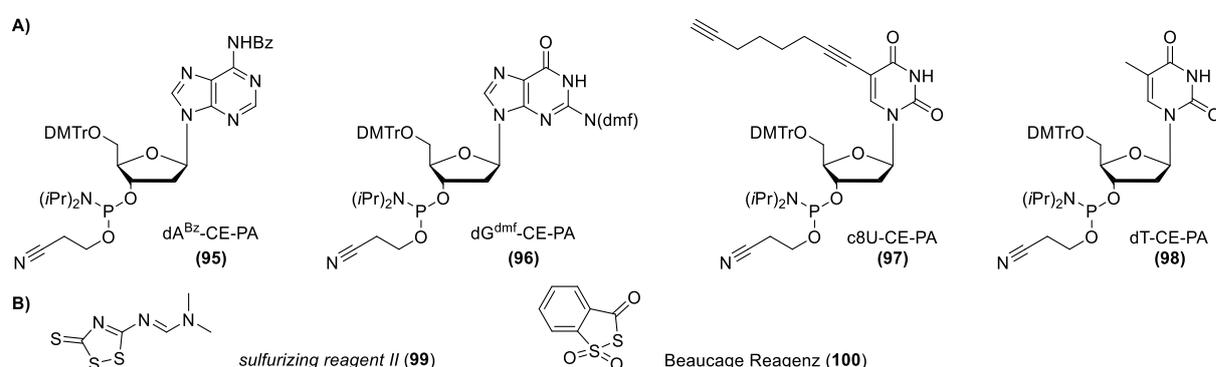
**Abbildung 3.51.** Allgemeiner Arbeitsablauf zur chemischen Synthese von Oligonukleotiden. **A)** Oligonukleotide gewünschter Sequenz und Länge werden an einem *Synthesizer* mittels Festphasen-Oligonukleotidsynthese hergestellt. **B)** Anschließend werden die Stränge von allen Schutzgruppen befreit und von der Festphase abgespalten. **C)** Dann werden die Stränge aufgereinigt und isoliert (hier dargestellt: mittels RP-HPLC) und **D)** schließlich über verschiedene Methoden auf ihre Zusammensetzung bestimmt (hier dargestellt: Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF und Konzentrationsbestimmung durch Nanophotometrie). Abbildung erstellt mit *BioRender*.

Der Reaktionszyklus für die Inkorporation eines Phosphoramidites an der Festphase besteht aus vier Schritten und wird beliebig oft bis zur Realisierung des gewünschten Oligonukleotids wiederholt (**Abbildung 3.52**). Unter Verwendung eines *Synthesizers* erfolgen diese Schritte vollautomatisiert. Dabei ist die Herangehensweise sehr ähnlich zu der in **Kapitel 1.1.4 (Abbildung 1.9)** gezeigten Methodik: Zunächst wird das Festphasenmaterial selbst oder ein schon an das Festphasenmaterial gekoppeltes Nukleosid durch das Entfernen der 5'-DMTr-Gruppe unter sauren Bedingungen für eine nachfolgende Kopplung zugänglich gemacht (A). Dann wird die Kopplung mit dem nächsten Phosphoramidit unter Zusatz eines Aktivators, wie beispielsweise Tetrazol-Derivaten, durchgeführt (B). Anschließend werden alle nicht reagierten, noch freien 5'-Hydroxygruppen durch das sogenannte *capping* deaktiviert und vom Weiterreagieren abgehalten, indem diese mit einem Säureanhydrid und einem Aktivator zum entsprechenden Ester umgesetzt werden (C). Dieser Schritt ist wichtig, damit keine verkürzten Stränge während der Synthese auftreten, bei denen innerhalb der Sequenz Basen fehlen. Die Oxidation des erhaltenen Phosphit(III)-triesters zu einer stabileren Phosphor(V)-Spezies schließt den Reaktionszyklus an dieser Stelle ab (D). An dieser Stelle würde der Zyklus unter Wiederholung aller Schritte fortgesetzt werden, bis Oligonukleotide der gewünschten Länge und Sequenz hergestellt worden sind. Das Festphasenmaterial wird zwischen den einzelnen Reaktionsschritten gespült, um Verunreinigungen zu entfernen und Nebenreaktionen zu vermeiden. Anschließend wird nach den weiteren Schritten verfahren, die in **Abbildung 3.51** gezeigt sind.



**Abbildung 3.52.** Allgemeiner vierstufiger Reaktionszyklus der Festphasen-Oligonukleotidsynthese. **A)** Entschütten der 5'-Hydroxygruppe unter sauren Bedingungen. **B)** Kopplung des nächsten Bausteins (blau) an die Festphase über die zuvor frei gewordene 5'-Hydroxygruppe unter Aktivierung des Phosphoramidits. **C)** *Capping* der nicht reagierten Festphase, um das Entstehen verkürzter Stränge zu vermeiden. **D)** Oxidation des Phosphors auf die Oxidationsstufe +V. Dieser Zyklus kann in der Theorie beliebig oft wiederholt werden, bis ein Oligomer der gewünschten Länge und Sequenz hergestellt wurde. Nach Ende der Synthese wird das Oligonukleotid von der Festphase abgespalten und entschützt. In Rot sind die reaktiven oder die sich verändernden Gruppen des jeweiligen Schritts abgebildet, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> = Nukleobase.

Als Alternative zu den bisher hergestellten modifizierten Basen von G sollte stattdessen c8U in die Sequenz von A151 integriert werden und ein T ersetzen. Diese unnatürliche Nukleobase trägt eine acht Atome lange Alkylkette mit endständigem Alkin, welches sich für eine Endstufenmodifikation mittels Click-Chemie eignet. <sup>[246-248]</sup> Aus kommerziell erhältlichen Phosphoramiditen (**Abbildung 3.53A**) wurden die im Folgenden gezeigten Oligonukleotide synthetisiert (**Tabelle 4**). Um das Phosphorthioat-Rückgrat zu realisieren wurde zur Oxidation des Phosphit(III)-triesters anstelle einer wässrigen Lösung elementaren Iods eine Lösung von *sulfurizing reagent II* (DDTT, 3-((*N,N*-Dimethyl-aminomethyliden)amino)-3*H*-1,2,4-dithiazol-5-thion, **99**) in Pyridin/Acetonitril von *GlenResearch* genutzt. Diese Substanz zeichnet sich im Vergleich zu anderen Sulfurylierungs-Reagenzien wie dem *Beaucage-Reagenz* (3*H*-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid, **100**) durch kürzere Reaktionszeiten bei längerer Haltbarkeit aus (**Abbildung 3.53B**). Als zusätzliche Kontrollen für spätere biologische Untersuchungen wurden neben den beiden mit c8U-modifizierten Sequenzen von A151 (**107**, **108**) auch A151 ohne Nukleobasenmodifikationen (**104**), A151 mit normalen Phosphatrückgrat (**101**) sowie zwei zueinander komplementäre Oligonukleotidsequenzen einer Länge von 24 Nukleobasen sowohl mit (**105**, **106**) als auch ohne Phosphorthioat-Rückgrat (**102**, **103**) synthetisiert, welche nach Hybridisierung als Positivkontrolle zur Quantifizierung der Aktivität von cGAS genutzt werden könnten. Dabei konnten für die G-Quadruplex-Sequenzen **101**, **104**, **107** und **108** Ausbeuten von über 25% nach abgeschlossener Aufreinigung mittels RP-HPLC erzielt werden.

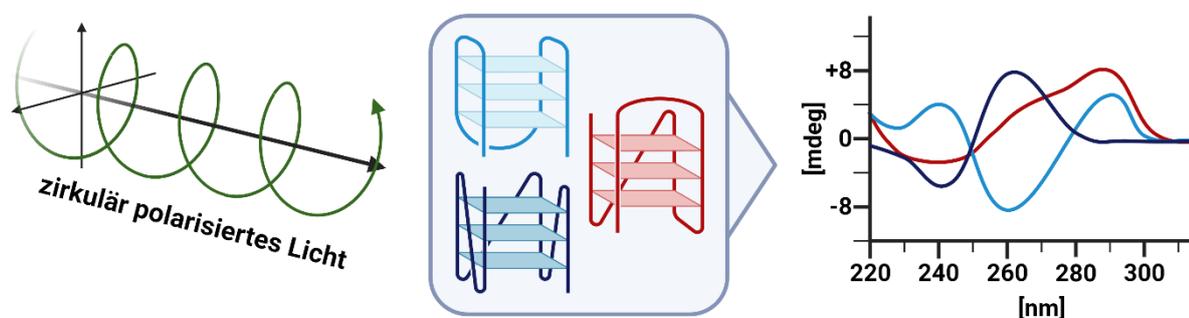


**Abbildung 3.53. A)** Darstellung der verwendeten Phosphoramidite zur Synthese der Oligonukleotide aus **Tabelle 4**. **B)** Darstellung des Sulfurylierungsreagenzien.

**Tabelle 4.** Hergestellte Oligonukleotide **101–108** mit Retentionszeit, bestimmtem Molekulargewicht und Ausbeute.

#	SSDNA-SEQUENZ	HPLC	GEMESSEN	BERECHNET	%
<b>101</b>	5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	20.5 min	7573.87	7573.27	26%
<b>102</b>	5'-AGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTC-3'	20.0 min	7352.01	7351.27	24%
<b>103</b>	5'-GACTGACTGACTGACTGACTGACT-3'	20.0 min	7352.37	7351.27	17%
<b>104</b>	<sup>PS</sup> 5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	29.4 min	7942.52	7942.75	36%
<b>105</b>	<sup>PS</sup> 5'-AGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTC-3'	29.6 min	7719.43	7720.73	16%
<b>106</b>	<sup>PS</sup> 5'-GACTGACTGACTGACTGACTGACT-3'	29.6 min	7719.04	7720.73	11%
<b>107</b>	<sup>PS</sup> 5'-T <b>c8U</b> AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	30.9 min	8033.92	8032.80	28%
<b>108</b>	<sup>PS</sup> 5'-TTAGGGT <b>c8U</b> AGGGTTAGGGTTAGGG-3'	32.2 min	8034.52	8032.80	26%

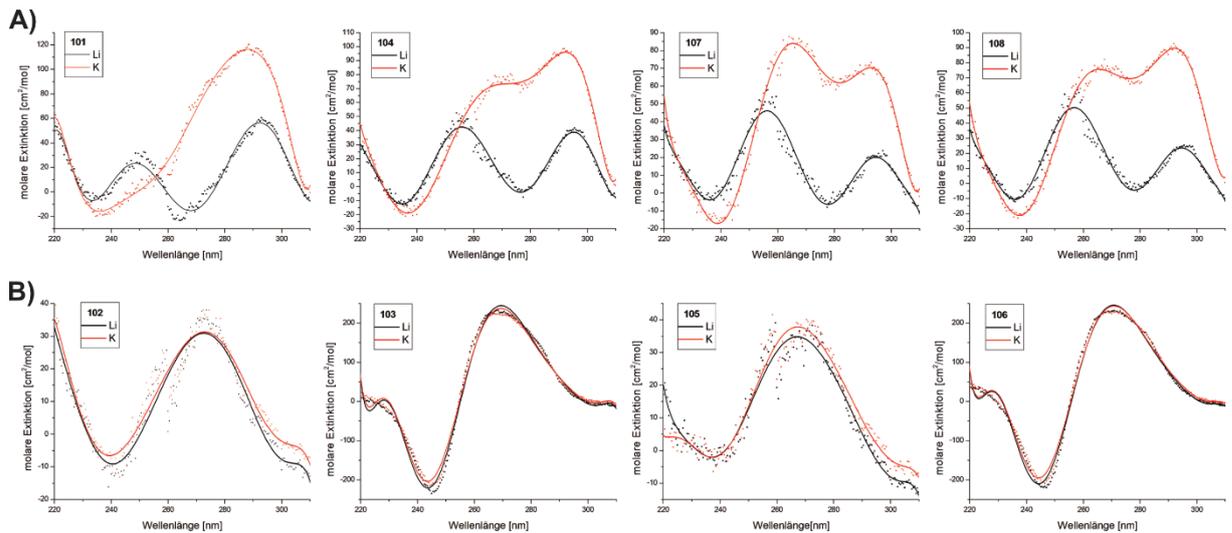
Die Sequenz der hergestellten Oligonukleotide reicht jedoch nicht aus, um eine Aussage über ihre Sekundärstruktur zu treffen. Um die Entstehung eines G<sub>4</sub> beweisen zu können, welche für unsere PROTACs notwendig wäre, muss die Änderung der Sekundärstruktur hin zu einem G<sub>4</sub> in Gegenwart von physiologischen Mengen an Kalium gezeigt werden (**Abbildung 3.50B**). Eine hierfür bewährte Methode ist die Zirkulardichroismus-Spektroskopie (engl. *circular dichroism*, CD-Spektroskopie). Bei der CD-Spektroskopie werden chirale Proben zirkular polarisiertem Licht ausgesetzt und die Absorption in einem gewissen Wellenlängenbereich detektiert. Für biologische Proben können dabei charakteristische Absorptionsmuster aufgenommen werden, die Rückschlüsse auf sekundäre und tertiäre Strukturen von Proteinen oder Oligonukleotiden geben können (**Abbildung 3.54**). Als Faustregel haben sich gewisse Wellenlängenbereiche und Absorptionsmuster für die drei häufigsten Topologien von G<sub>4</sub> etabliert: parallel (~264 nm<sub>max</sub>, ~245 nm<sub>min</sub>), antiparallel (~295 nm<sub>max</sub>, ~260 nm<sub>min</sub>) und hybrid/“3+1“ (~295 nm<sub>max</sub>, ~260 nm<sub>max</sub>, ~245 nm<sub>min</sub>).<sup>[249, 250]</sup> Dagegen sind sowohl für ssDNA als auch dsDNA Minima bei etwa 250 nm und Maxima bei 280 nm bekannt.<sup>[251]</sup>



**Abbildung 3.54.** Darstellung der CD-Spektroskopie an G-Quadruplexen. Die zu untersuchenden Substanzen werden zirkular polarisiertem Licht ausgesetzt. Durch die Gesamtchiralität der Substanzen, die unterschiedlichen Topologien (dunkelblau: parallel; hellblau: antiparallel, rot: hybrid) und die Sekundärstrukturen der Substanzen entstehen Differenzen in der Absorption. Abbildung erstellt mit *BioRender*.

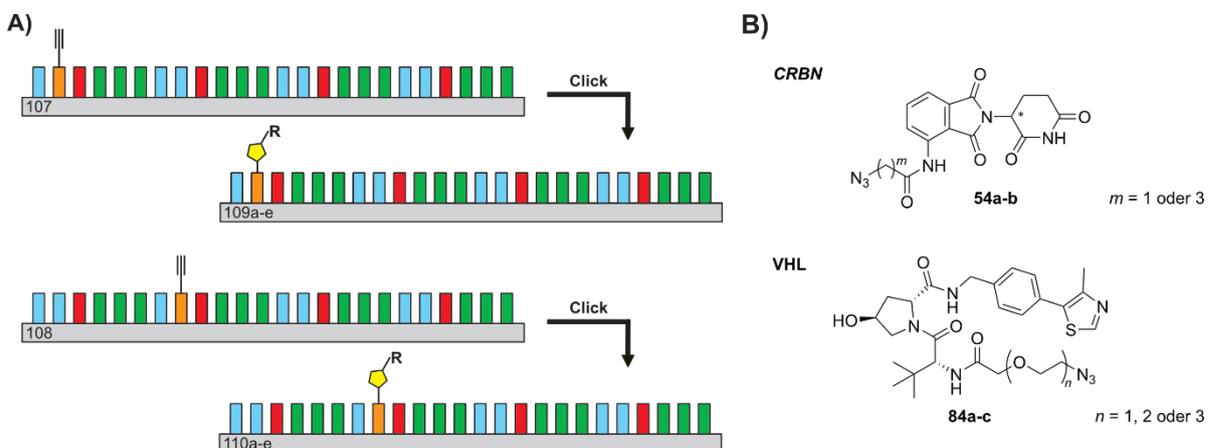
Hierfür wurden zuvor hergestellten Stränge in jeweils in einer wässrigen Lösung von LiCl (Negativkontrolle) oder KCl (Positivkontrolle) gelöst und anschließend zirkular polarisiertem Licht ausgesetzt. Dabei wurden die Messungen in technischen Triplikaten durchgeführt, gemittelt und die Positiv- (KCl) und Negativkontrollen (LiCl) der jeweiligen Stränge miteinander verglichen (**Abbildung 3.55**). Für die Stränge **101**, **104**, **107** und **108** konnten bei Anwesenheit von KCl charakteristische Änderungen in den Absorptionsmustern für G<sub>4</sub> nachgewiesen werden, welche unter LiCl nicht zu finden waren. Dies zeigt so nachweislich die Bildung von G<sub>4</sub> in Anwesenheit von Kalium. Außerdem fällt auf, dass die Oligonukleotide mit Phosphorthioat-Rückgrat (**104**, **107** und **108**) mit ihren zwei Maxima eine hybride Topologie hinweisen, während die unmodifizierte Sequenz **101** nur ein Maximum aufweist (**Abbildung 3.55A**). Dagegen sind keine nennenswerten Änderungen zwischen der Anwesenheit von LiCl und KCl für die anderen Stränge zu verzeichnen gewesen (**Abbildung 3.55B**). Jedoch kann anhand der hier erhobenen Daten nicht klar gesagt werden, ob die gebildeten G<sub>4</sub> aus einem einzelnen Oligonukleotid, also intramolekular, oder aus mehreren Oligonukleotiden aufgebaut sind, und ob die chiralen Zentren im Phosphorthioat-Rückgrat Einfluss auf dieses Verhalten haben.

### 3.2.2 cGAS-PROTACs auf Basis von G-Quadruplexen



**Abbildung 3.55.** CD-Spektren der synthetisierten Oligonukleotide, aufgetragen ist die Molare Extinktion [ $\text{cm}^2/\text{mol}$ ] im Wellenlängenbereich von 220 nm bis 310 nm. **A)** CD-Spektren der G-Quadruplexe. **B)** CD-Spektren der anderen Stränge.

Im nächsten Schritt sollten die Stränge **107** und **108** mittels Click-Chemie zu den potenziellen cGAS-PROTACs modifiziert werden (**Abbildung 3.56A**). Generell sollte bei einer CuAAC ein Ligand zur Stabilisierung des Cu(I)-Alkin-Komplexes genutzt werden.<sup>[182]</sup> Jedoch erweist sich die Click-Reaktion and Phosphorthioaten aufgrund der hohen Affinität zwischen Übergangsmetallen und Schwefel als besonders schwierig: hier kann es neben einer Fragmentierung am Rückgrat auch zu einem Verlust von Schwefel an den Phosphorthioaten führen, welcher durch Sauerstoff ersetzt wird und so zu einem unmodifizierten Phosphatrückgrat führt.<sup>[252]</sup> HONCHARENKO *et al.* haben gezeigt, dass die Verwendung von Dimethylsulfid als alternativer Ligand möglich ist, dessen Nutzung mit einem geringeren Verlust von Schwefel aus den Phosphorthioaten einhergeht.<sup>[253]</sup> Daran angelehnt wurden die nachfolgenden Click-Reaktionen durchgeführt. Dabei sollten sowohl CRBN- als auch VHL-bindende cGAS-PROTACs hergestellt werden und es wurden insgesamt zwei CRBN- und drei VHL-bindende Motive geklickt (**Abbildung 3.56B**).



**Abbildung 3.56.** Schematische Darstellung der Endstufenmodifikation von den Oligonukleotiden **107** und **108** zu den potenziellen cGAS-PROTACs **109a-e** und **110a-e** mittels Click-Chemie. Insgesamt wurden fünf verschiedene E3-Rekruter an die jeweiligen Stränge geklickt, zwei für CRBN (**54a-b**) und drei für VHL (**84a-c**).

Um die Effizienz der Click-Reaktion zu untersuchen und ebendiese gegebenenfalls zu optimieren, wurden erste Untersuchungen in einem Maßstab von 5 nmol unternommen. Die Reaktionen wurden in Reinstwasser in Mikroreaktionsgefäßen unter Ausschluss von Sauerstoff bei Raumtemperatur durchgeführt. Anstelle von CuSO<sub>4</sub> wurde der Komplex CuBr · Me<sub>2</sub>S im Überschuss in Kombination mit NaAsc verwendet, um eine Oxidation zu Cu(II) zu verhindern; ein zusätzlicher Chelator wurde nicht verwendet. Das jeweilige Azid wurde in DMSO gelöst und ebenfalls im Überschuss zugegeben, ggf. wurden noch geringe Mengen an DMSO für eine bessere Löslichkeit zur Reaktionsmischung gegeben. Nach 18 h wurden die jeweiligen Reaktionslösungen mit MilliQ-H<sub>2</sub>O verdünnt, über einen MWCO-Filter (engl. *molecular weight cut-off*) mit einer Ausschlussgröße von 3000 kDa von den Reaktionslösungen befreit, und nochmals gewaschen. Anschließend wurden die Rohprodukte über RP-HPLC aufgereinigt, die Ausbeuten über das Integral der Absorption bei 260 nm bestimmt und die Substanzen hinsichtlich ihres Molekulargewichtes mittels MALDI-TOF (engl.: *matrix-assisted laser-desorption/ionisation time-of-flight*) analysiert. Dabei betrug die Ausbeute zwischen 40 und 75%, wobei die VHL-Rekruter insgesamt bessere Kopplungsraten aufweisen. Eine Übersicht über die so hergestellten Substanzen ist nachfolgend in **Tabelle 5** zu finden. Biologische Untersuchungen der Stränge **109a-e** und **110a-e** stehen noch aus.

**Tabelle 5.** Potenziellen cGAS-PROTACs auf Basis von Oligonukleotiden.

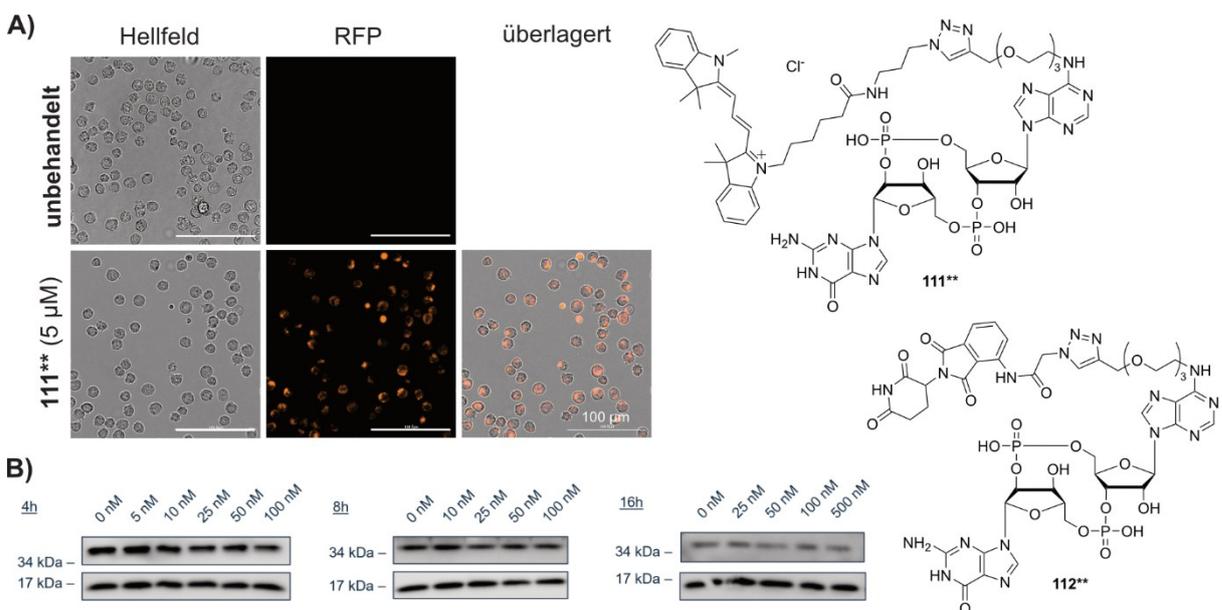
#	SUMMENFORMEL	GEMESSEN	BERECHNET	AUSBEUTE
<b>109a</b> (107+54a)	C <sub>262</sub> H <sub>315</sub> N <sub>102</sub> O <sub>128</sub> P <sub>23</sub> S <sub>23</sub>	8392.03	8388.88	44%
<b>110a</b> (108+54a)	C <sub>262</sub> H <sub>315</sub> N <sub>102</sub> O <sub>128</sub> P <sub>23</sub> S <sub>23</sub>	8392.03	8388.88	49%
<b>109b</b> (107+54b)	C <sub>264</sub> H <sub>319</sub> N <sub>102</sub> O <sub>128</sub> P <sub>23</sub> S <sub>23</sub>	8419.73	8416.92	37%
<b>110b</b> (108+54b)	C <sub>264</sub> H <sub>319</sub> N <sub>102</sub> O <sub>128</sub> P <sub>23</sub> S <sub>23</sub>	8419.13	8416.92	63%
<b>109c</b> (107+84a)	C <sub>273</sub> H <sub>338</sub> N <sub>103</sub> O <sub>128</sub> P <sub>23</sub> S <sub>24</sub>	8592.68	8592.14	61%
<b>110c</b> (108+84a)	C <sub>273</sub> H <sub>338</sub> N <sub>103</sub> O <sub>128</sub> P <sub>23</sub> S <sub>24</sub>	8594.35	8592.14	75%
<b>109d</b> (107+84b)	C <sub>275</sub> H <sub>342</sub> N <sub>103</sub> O <sub>129</sub> P <sub>23</sub> S <sub>24</sub>	8636.90	8636.19	60%
<b>110d</b> (108+84b)	C <sub>275</sub> H <sub>342</sub> N <sub>103</sub> O <sub>129</sub> P <sub>23</sub> S <sub>24</sub>	8635.27	8636.19	69%
<b>109e</b> (107+84c)	C <sub>277</sub> H <sub>346</sub> N <sub>103</sub> O <sub>130</sub> P <sub>23</sub> S <sub>24</sub>	8682.71	8680.24	52%
<b>110e</b> (108+84c)	C <sub>277</sub> H <sub>346</sub> N <sub>103</sub> O <sub>130</sub> P <sub>23</sub> S <sub>24</sub>	8681.82	8680.24	53%

Des Weiteren wurde eine Click-Reaktion an **107** und **108** untersucht, während diese Oligonukleotide noch am Festphasenmaterial gebunden waren und Schutzgruppen trugen. Auf diese Weise sollte die zeitliche Effizienz und die Gesamtausbeute erhöht werden, da so die nachfolgenden benötigten Aufreinigungsschritte in einer Sequenz zusammengefasst werden könnten. Jedoch konnte nach Aufarbeitung und chromatographischer Aufreinigung kein Produkt mittels MALDI-TOF detektiert werden – weder von Startmaterial noch von Produkt. Beim Waschen des Festphasenmaterials konnte eine blaue Farbe der Waschlösungen festgestellt werden, was auf eine Cu(II)-Spezies deuten lässt. Eventuell sind so in Anwesenheit von Cu(II) ROS entstanden, welche zu einer Zersetzung der Oligonukleotide geführt haben.<sup>[209, 254]</sup>

### 3.3 Untersuchung der Stabilität von CRBN-basierten PROTACs

Um die Effektivität von PROTACs im biologischen Kontext evaluieren zu können, haben sich mehrere Methoden etabliert. Neben der Bestimmung von Bindungsaffinitäten durch beispielsweise kalorimetrische Methoden werden *in vitro* Nachweismethoden zur Untersuchung der Änderung zellulärer Proteinlevel verwendet. Zusätzlich können darauf aufbauende Nachweismethoden für eine zielproteinabhängige Signaltransduktion durchgeführt werden. Zur Untersuchung von STING-PROTACs wurden biologische Studien von meiner Kollegin *Yasmin V. Gärtner* an THP-1 (dual) Zellen durchgeführt (**Abbildung 3.57**). Diese Zelllinie bietet sich aufgrund ihrer hohen Expressionslevel für cGAS sowie STING, und im Falle der dual-Variante mithilfe des Luciferase-Reportersystems zur Quantifizierung einer Interferonantwort, besonders an.<sup>[68, 255]</sup> Weitere Substanzen für diese Untersuchungen wurden von *Dr. Giacomo Ganazzoli* (mit \*\* markiert) bereitgestellt.

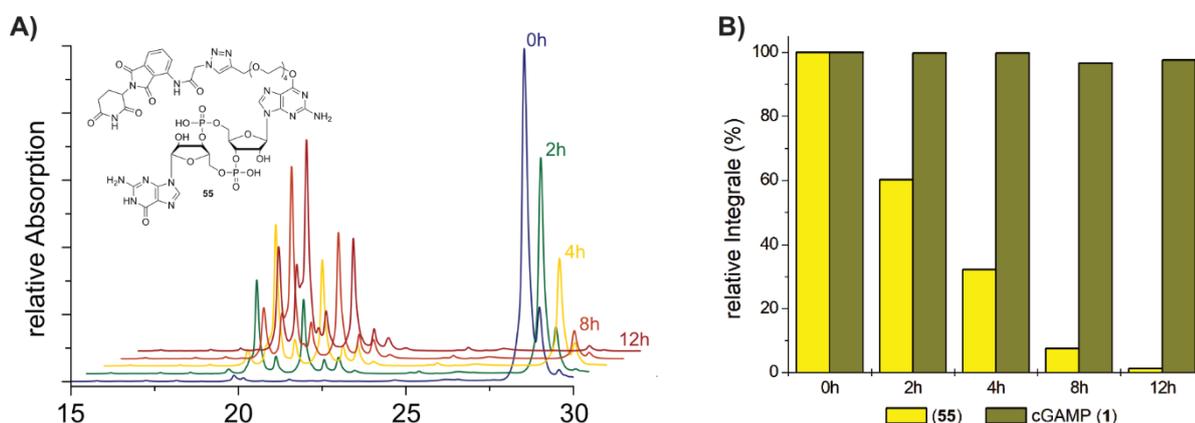
THP-1 (dual) Zellen wurden dafür im Zellkulturmedium RPMI-1640 mit 10% fötalem Kälberserum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) bei 37 °C für eine gewisse Zeit mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Benötigte Substanzkonzentrationen, die Menge und Aufarbeitung der exponierten Zellen sowie die Versuchsdauer hängen immer individuell von der Nachweismethode ab. Nach der Inkubation mit unseren PROTACs sollte jeweils die Menge an verbliebenem STING-Protein mittels Western Blot (nach 4, 8, 16 oder 24 h) und die Stärke der verbliebenen Interferonantwort mittels Lumineszenz-Reporter-Assays (nach 24 h) quantifiziert werden. Hierbei konnten jedoch, trotz nachweisbarer Internalisierung des fluoreszierenden cGAMP-Derivates **111\*\***, keine verwertbaren biologischen Ergebnisse für die bisherigen potenziellen PROTACs CDG-O<sup>6</sup>4-POM (**55**) und **112\*\*** generiert werden. So sind erste Zweifel an dem Design der getesteten Substanzen aufgekommen.



**Abbildung 3.57.** Biologische Untersuchungen, durchgeführt und Daten bereitgestellt von *Yasmin V. Gärtner*, Substanzen bereitgestellt von *Dr. Giacomo Ganazzoli*. **A)** Untersuchung der Internalisierung von fluoreszentem cGAMP-Derivat **111\*\*** an THP1-Zellen. **B)** Untersuchung der Aktivität von cGAMP-PROTAC **112\*\*** mittels Western Blot über die Restmenge an STING (42 kDa) nach 4, 8 und 16 h, mit CoxIV (20 kDa) als internem Standard. Ähnliche Ergebnisse einer fehlenden biologischen Aktivität konnte auch für c-di-GMP-PROTAC **55** nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt).

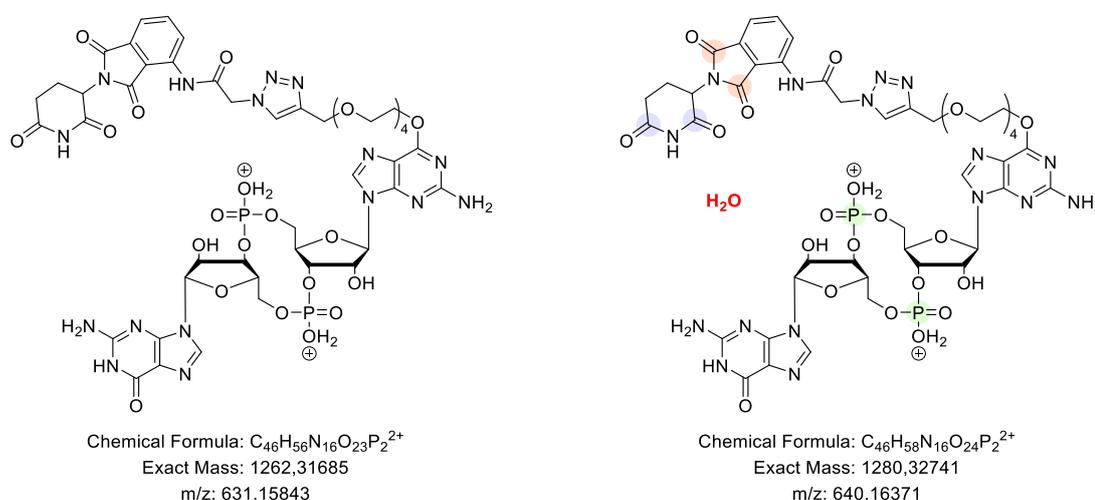
Um die Stabilität unserer STING-PROTACs genauer zu untersuchen, wurden Substanzen simulierten Zellkulturbedingungen ausgesetzt und deren Verbleib über Zeit mittels RP-HPLC und ggf. HRMS genauer untersucht. Dabei wurden die meisten dieser Untersuchungen an **55** durchgeführt. Die zu analysierenden Substanzen wurden dafür in RPMI-1640 mit 10% FBS bei 37 °C im beheizbaren Autosampler der HPLC inkubiert (*Shimadzu LC-2060C 3D*, ausgestattet mit einer *Macherey-Nagel EC 250/4 NUCLEODUR 120-3 C18ec*), fest definierte Volumina in bestimmten Zeitintervallen injiziert und die Chromatogramme anschließend ausgewertet. Da eventuell entstehende Abbau- und Zerfallsprodukte andere Extinktionskoeffizienten als die jeweilige Ausgangssubstanz aufweisen können, wurden die Ergebnisse immer in Bezug auf das ursprüngliche Integral bei  $t = 0$  h diskutiert, sofern möglich. Aufgrund des verwendeten Versuchsaufbaus können jedoch Schwankungen in den Messreihen bei späteren Zeitpunkten auftreten: durch Konvektion im Probenbehältnis kann es zu potenziellen Injektionsfehlern kommen. Messwerte, welche von diesen Schwankungen betroffen waren, wurden weitestgehend und sofern möglich von der Auswertung ausgeschlossen.

Als Erstes wurden sowohl CDG-O<sup>6</sup>4-POM (**55**, Abbildung **3.58**) als auch natürliches cGAMP (**1**, Abbildung **3.58B**) unter diesen Bedingungen über einen Zeitraum von bis zu insgesamt 24 h untersucht. Hierbei ließ sich feststellen, dass bei **55** ( $t_R = 28.5$  min) nach 2 h nur noch etwa 60% der ursprünglichen Menge detektiert werden konnte und es sich nach 12 h fast vollständig zersetzt hatte, während bei cGAMP ( $t_R = 20.5$  min) kaum eine Zersetzung über den gleichen Zeitraum feststellbar war. Des Weiteren scheint die Zersetzung sehr komplex zu sein: nach 2 h lassen sich 5 Abbauprodukte finden, von denen zwei einen hohen Anteil zu haben scheinen ( $t_R = 20.1$  und 21.5 min). Nach 8 h entstehen nochmals früher eluierende Produkte ( $t_R = 19.2$  und 19.7 min), während die bei 20.1 und 21.5 min nicht zuzunehmen scheinen. Die stetig zunehmende Polarität der Abbauprodukte und das komplexe Zersetzungsmuster deuten auf einen hydrolytischen Zerfall unter Zellkulturbedingungen, der in Reinstwasser bisweilen nicht festzustellen war und ein maßgeblicher Grund für die fehlende Aussagekraft der bisher gesammelten biologischen Daten zu sein scheint.



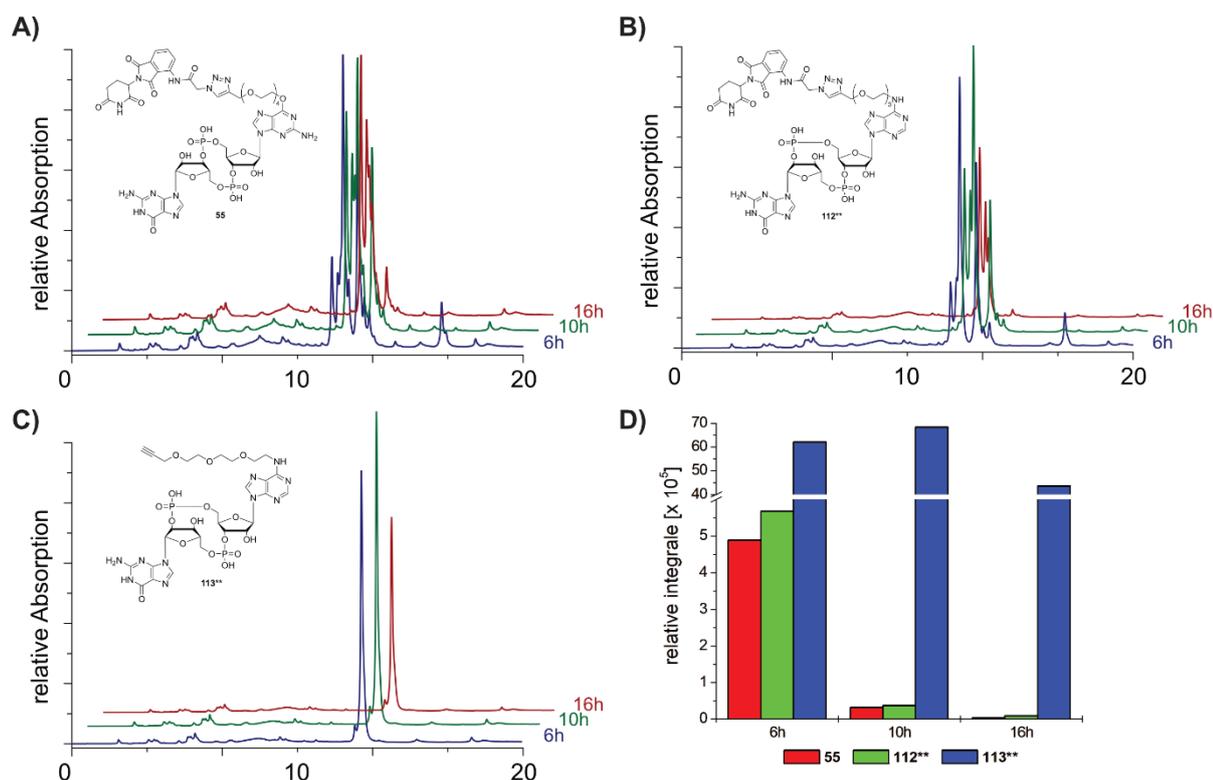
**Abbildung 3.58.** Untersuchung der Stabilität von **55** und cGAMP (**1**) unter Zellkulturbedingungen über einen Zeitraum von 12 h. **A)** Ausschnitte überlagerter RP-HPLC-Chromatogramme von **55** unter Zellkulturbedingungen für THP-1 (dual) Zellen bei den Zeitpunkten  $t = 0$  h, 2 h, 4 h, 8 h und 12 h. **B)** Direkter Vergleich der Restintegrale, normiert auf das jeweilige ursprüngliche Integral von **55** und cGAMP (**1**), nach 0, 2, 4, 8 und 12 h. Proben wurden bei 37 °C in RPMI-1640 mit 10% FBS inkubiert und per RP-HPLC untersucht: pro Injektion 10 nmol Substanz, Injektionsvolumen 20  $\mu$ L; Methode 0.1 M TEAA, 0-30% B (**55**) bzw. 0-100% B (**1**) über 30 min bei einer Flussrate von 1 mL/min.

Massenspektrometrische Untersuchungen der entstandenen Abbauprodukte von **55** bei  $t_R = 20.1$  und 21.5 min, durchgeführt von *Dr. Matthias Heiß*, bestätigten den bisherigen Verdacht auf einen hydrolytischen Zerfall und zeigten jeweils eine spezifische Zunahme des Molekulargewichtes um 18 u, welche auf eine Addition von Wasser zurückzuführen ist (**Abbildung 3.59**). Basierend auf den unterschiedlichen Retentionszeiten, aber einer identischen Masse, müssen in den ersten 2 Stunden des Versuchs zwei unterschiedliche Produkte eines hydrolytischen Zerfalls entstanden sein. Da einige Positionen in unseren Molekülen einer Hydrolyse zum Opfer fallen können, musste systematisch festgestellt werden, an welchen Bausteinen die Hydrolyse stattfindet und welche Faktoren diese begünstigen. Das Fehlen eines Isotopenstandards eine quantitative Auswertung mittels HRMS sehr schwierig macht und die folgenden Untersuchungen wurden weitestgehend mittels RP-HPLC durchgeführt.



**Abbildung 3.59.** Darstellung der Masse von **55** und dem detektierten Addukt mit  $H_2O$ . Farblich hinterlegt sind mögliche Positionen der Addition von Wasser an den Phosphaten (grün), am Phthalimid (rot) und am Glutarimid (blau).

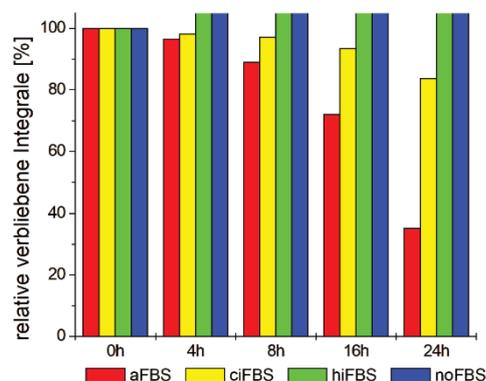
Zur Untersuchung, welche Bausteine unserer Moleküle dem hydrolytischen Zerfall zum Opfer fallen, wurden STING-PROTACs und deren Vorstufen ohne CRBN-Rekruter unter denselben Bedingungen wie im Versuch zuvor mittels RP-HPLC untersucht (**Abbildung 3.60**). Hierbei stellte sich heraus, dass die Modifikation von cGAMP mit Linker (**113\*\***) die Stabilität nicht signifikant beeinträchtigt (**Abbildung 3.60C**). Eine Hydrolyse tritt nur bei den PROTACs mit CRBN-Rekruter auf. Weiterhin ist sowohl die Geschwindigkeit als auch das Muster der Zersetzung bei den PROTACs **55** (**Abbildung 3.60A**) und **112\*\*** (**Abbildung 3.60B**) trotz unterschiedlicher Komposition der CDNs sehr ähnlich. Im Vergleich zu **113\*\*** lässt sich bei sowohl **55** als auch **112\*\*** nach 6 h nur noch etwa 10% der Substanz wiederfinden, nach 10 h sind es nur noch etwa 1%. Diese Beobachtungen, und die Tatsache, dass cGAMP (**1**) selbst auch unter Zellkulturbedingungen stabil ist (**Abbildung 3.58B**) lassen auf eine Instabilität der CRBN-Rekruter unter Zellkulturbedingungen schließen.



**Abbildung 3.60.** Untersuchung der Substanzen **55** (A), **112\*\*** (B) und **113\*\*** (C) nach 6, 10 und 16 h in RPMI-1640 mit 10% FBS. Pro Injektion 10 nmol in 20  $\mu$ L; Methode 0.1 M TEAA, 0-100% B über 45 min, Flussrate 1 mL/min. **D)** Vergleich der Restintegrale von **55**, **112\*\*** und **113\*\*** nach 6, 10 und 16 h in RPMI-1640 mit 10% FBS. Pro Injektion 10 nmol in 20  $\mu$ L; Methode 0.1 M TEAA, 0-100% B über 45 min, Flussrate 1 mL/min. **112\*\*** und **113\*\*** bereitgestellt von *Dr. Giacomo Ganazzoli*.

Um die Zellkulturbedingungen hinsichtlich der hydrolytischen Stabilität und der biologischen Evaluation unserer PROTACs hin optimieren zu können hieß es herauszufinden, welche Parameter den hydrolytischen Zerfall begünstigen und ob diese anpassbar sind. Zellkulturmedien bestehen in der Regel aus einem Puffersystem für einen bestimmten pH-Wert, Salzen und vielen anderen Substanzen, die eine Zelle zum Wachsen und Überleben benötigt. Das Zellkulturmedium RPMI-1640 besteht aus einem Hydrogencarbonat-Puffersystem mit einem pH von etwa 7.4 und Zusätzen wie Phenolrot als pH-Indikator, Zucker, Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und Wachstumsfaktoren.<sup>[256]</sup> Für letztere wird meistens ein deaktiviertes Blutserum als Zusatz (hier FBS) verwendet, welches aber aufgrund seiner biologischen Beschaffenheit und Gewinnung nicht auf seine Bestandteile hin standardisiert werden kann. Zellkulturbedingungen sind jedoch bis zu einem gewissen Grad anpassbar: Es ist theoretisch möglich, Zellen in rein chemisch definierten Bedingungen temporär und ohne Serum zu kultivieren. Der Erfolg ist aber stark von der Zelllinie abhängig und die Rahmenbedingungen und Toleranzbereiche müssen immer individuell neu erarbeitet werden.<sup>[257]</sup> Da nicht jede einzelne Komponente eines Zellkulturmediums spezifisch hinsichtlich Ihres Einflusses auf die Stabilität unserer Substanzen getestet werden kann, wurden die folgenden Untersuchungen auf die wahrscheinlichsten Faktoren hinsichtlich des hydrolytischen Zerfalls gesammelt zugeschnitten – Serum, pH-Wert und Salze.

Um den Einfluss des Serums zu untersuchen, wurde cGAMP (**1**) mit verschiedenen Formen von FBS in RPMI-1640 bei 37 °C inkubiert und wieder mittels RP-HPLC auf einen Zerfall hin in regelmäßigen Zeitabständen untersucht (**Abbildung 3.61**). Hierbei wurden aktives (aFBS), kommerzielles inaktiviertes (ciFBS) und hitzeinaktiviertes FBS (hiFBS) gegen eine Kontrolle ohne FBS (noFBS) getestet. In der Regel wird ciFBS oder hiFBS verwendet, da so im Serum enthaltene Proteine denaturiert werden und somit eventuell auftretende enzymatische Aktivitäten auszuschließen sind. Hierbei zeigte sich, dass die Gesamtmenge von cGAMP (**1**) einzig bei aFBS signifikant reduziert hatte (um ca. 25% nach 16 h), in den anderen drei Bedingungen erwies sich cGAMP (**1**) wie erwartet als stabil. Somit konnte FBS als Kriterium für den hydrolytischen Zerfall der Dinukleotide ausgeschlossen werden und serum-freie Zellkulturmedien scheinen nicht benötigt zu werden.

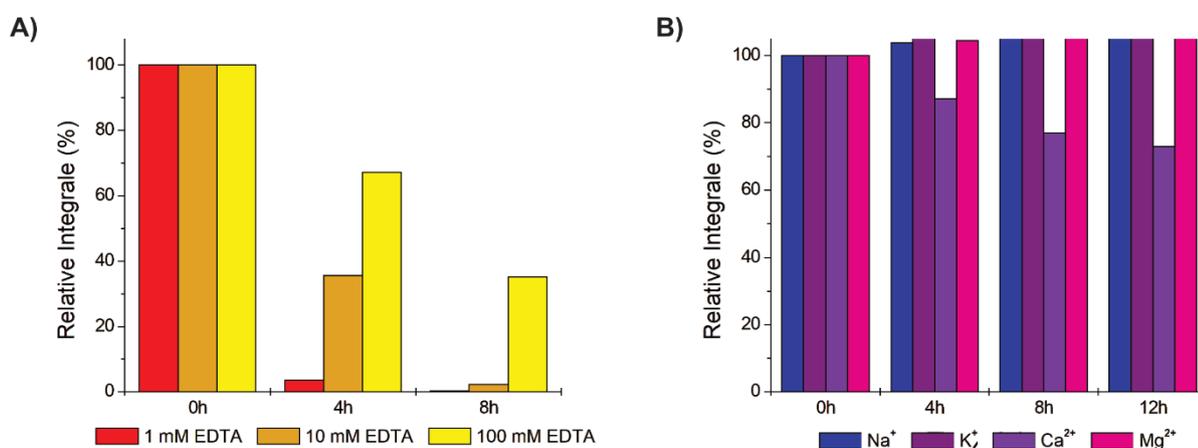


**Abbildung 3.61.** Auswirkungen von FBS auf die Stabilität von cGAMP (**1**). Vergleich der Restintegrale von (**1**) in RPMI-1640 mit verschiedenen Aktivitätsstufen von FBS, je 10%, nach 0, 4, 8 und 16 und 24 h. Pro Injektion 5 nmol in 20 µL, Methode 0.1 M TEAA, 0-100% B über 45 min, Flussrate 1 mL/min.

Als nächstes wurden gezielt die Salze hinsichtlich ihres Einflusses auf die Hydrolyse untersucht (**Abbildung 3.62**). In einer ersten Studie wurde Na<sub>2</sub>EDTA als Chelator freier Metallkationen in Konzentrationen von 1 mM, 10 mM und 100 mM zu RPMI-1640 gegeben und **55** wurde nach Inkubation in diesen Lösungen bei 37 °C in bestimmten Zeitintervallen per RP-HPLC untersucht (**Abbildung 3.62A**). Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich höhere Konzentrationen von EDTA zwar positiv auf die Stabilität auswirken, jedoch nicht in einem derartigen Maße um eine ausreichende Stabilität für biologische Untersuchungen gewährleistet zu können. Bei 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA sind nach 8 h noch etwa 40% der ursprünglichen Menge an **55** noch vorhanden. Des Weiteren wurde klar, dass durch die Verwendung von Na<sub>2</sub>EDTA auch der pH-Wert gesenkt wird (Indikation durch Phenolrot), während zugleich weitere Na<sup>+</sup>-Ionen in das Zellmedium eingebracht werden. Aufgrund dieser Ergebnisse müssen die Salze zusätzlich zu einer eindeutigen Klärung unabhängig von einer Änderung des pH-Wertes untersucht werden.

Um spezifisch den Effekt der Salze zu untersuchen, wurden wässrige Salzlösungen von NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> sowohl in physiologischen Verhältnissen als auch in einem hohen Überschuss von jeweils 1000 mM angesetzt und die pH-Werte der Lösungen auf den pH-Wert von Reinstwasser angepasst, welcher in der Regel durch Aufnahme von CO<sub>2</sub> aus der Luft bei etwa 5 bis 6 liegt.<sup>[258]</sup>

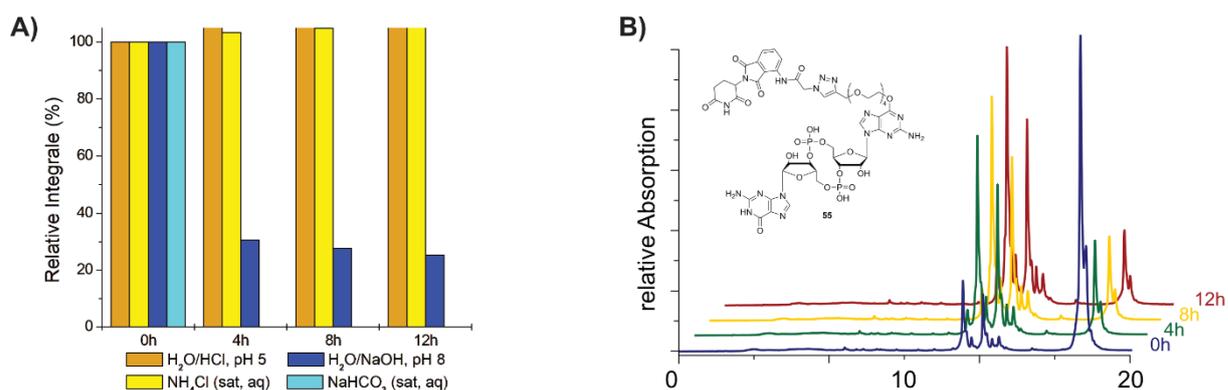
Proben von CDG-O<sup>6</sup>4-POM (**55**) wurden dann in diesen Lösungen bei 37 °C inkubiert und in bestimmten Zeitabständen mittels RP-HPLC untersucht (**Abbildung 3.62B**). Es sei hier vermerkt, dass Konzentrationen von 1000 mM weitaus höher als die in Medien enthaltenen Konzentrationen sind und unter physiologischen Bedingungen in der Regel nicht erreichbar sind. In den RP-HPLC-Studien konnte bei physiologischen Salzkonzentrationen keine Zersetzung detektiert werden. Auch bei Konzentrationen 1000 mM konnte mit Ausnahme von Ca<sup>2+</sup> kein hydrolytischer Zerfall nachgewiesen werden. Doch auch unter diesen extremen Konzentrationen von Ca<sup>2+</sup> ist die Hydrolyse nicht annähernd so schnell wie zuvor im Zellmedium bestimmt: nach 12 h konnte **55** in einer Restmenge von über 70% nachgewiesen werden, während **55** nach derselben Zeit in Zellkulturbedingungen kaum noch detektierbar war (**Abbildung 3.58**). Somit können auch zumindest die untersuchten Metallkationen als Katalysatoren für die Hydrolyse weitestgehend ausgeschlossen werden. Demnach scheint der pH-Wert die entscheidende Rolle für die Hydrolyse zu spielen.



**Abbildung 3.62.** Auswirkung von Salzen auf die Stabilität von **55**. **A)** Restmenge von **55** in RPMI-1640 in Gegenwart von EDTA (1 mM, 10 mM und 100 mM) nach 0, 4 oder 8 h. Pro Injektion 5 nmol in 20 µL; Methode 0.1 M TEAA, 0-100% B über 30 min, Flussrate 1 mL/min, Daten in Kollaboration mit *Yasmin V. Gärtner* und *Simon Dresbach* entstanden (Bereitstellung der Medien). **B)** Restmenge von **55** in wässrigen Metallsalzlösungen (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, je 1 M, pH ~5) nach 0, 4, 8 und 12 h. RP-HPLC, pro Injektion 5 nmol in 20 µL, Methode 0.1 M TEAA, 0-30% B über 30 min, Flussrate 1 mL/min.

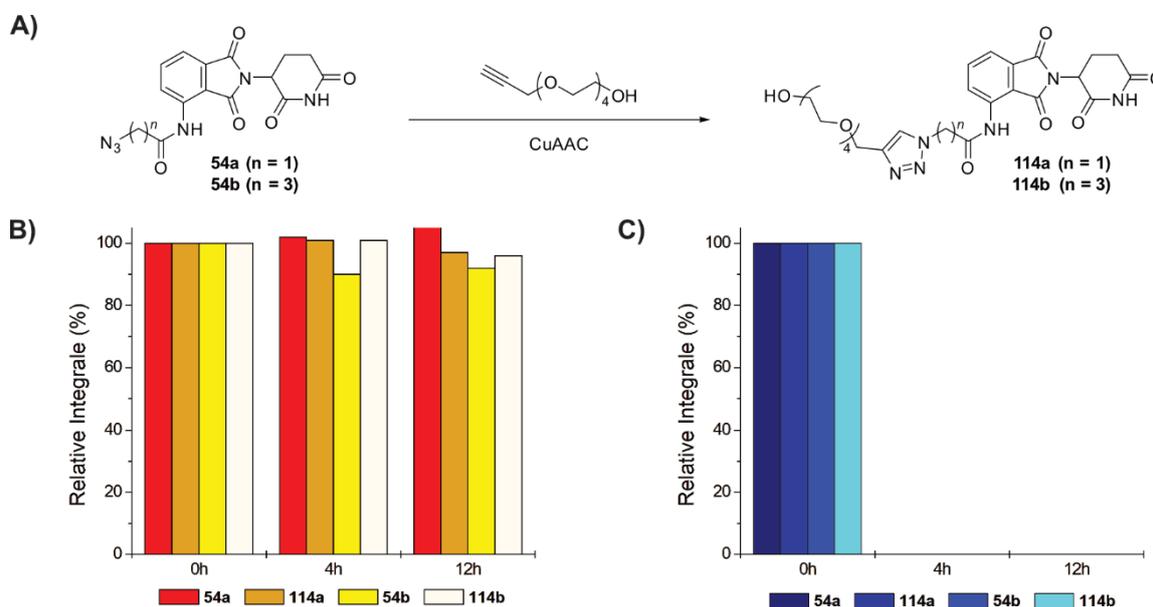
Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde **55** unter sowohl sauren als auch basischen Bedingungen untersucht (**Abbildung 3.63**). Dafür wurden zum einen Reinstwasser mit HCl und NaOH jeweils auf pH ~5 und pH ~8 angepasst und zum anderen ähnliche pH-Werte mit gesättigten Lösungen von NH<sub>4</sub>Cl und NaHCO<sub>3</sub> realisiert. Proben von **55** wurden in diesen Lösungen bei 37 °C inkubiert und in bestimmten Zeitintervallen mittels RP-HPLC untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Proben unter den getesteten Bedingungen im Basischen zerfallen, wohingegen die Substanzen im Sauren stabil sind (**Abbildung 3.63A**). Auch hier ähneln die Zersetzungsmuster den an unseren PROTACs zuvor beobachteten. Beim nicht gepufferten basischen System stagnierte der Zerfall nach 4 h, was die Hypothese des basenlabilen Zerfalls durch den Verbrauch der Hydroxidionen nochmals verstärkt (**Abbildung 3.63B**). Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die hier verwendeten Lösungen kein optimales Modellsystem darstellen, da sie chemisch betrachtet weit von den Zellkulturbedingungen entfernt sind. Jedoch ist bekannt, dass im menschlichen Körper in gewissen Organen oder Körperflüssigkeiten solche pH-Werte in Annäherung vorzufinden sind.<sup>[259]</sup>

### 3.3 Untersuchung der Stabilität von CRBN-basierten PROTACs



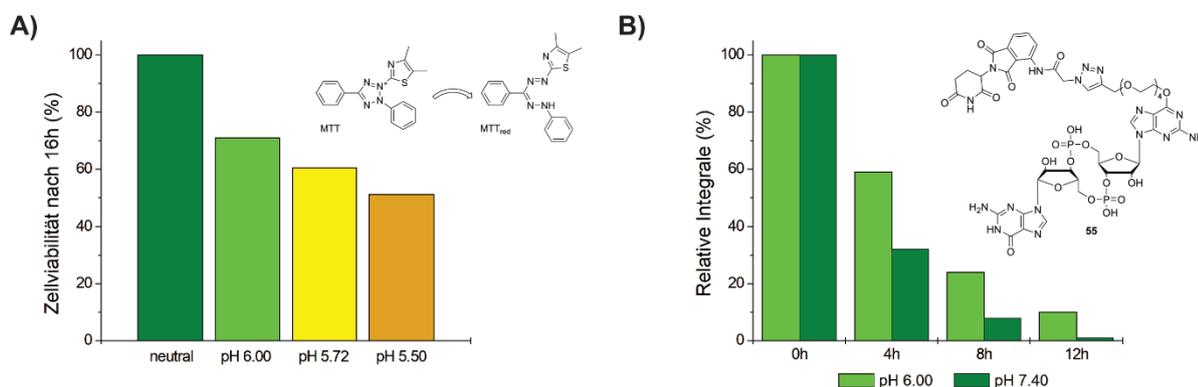
**Abbildung 3.63. A)** **55** in verschiedenen Medien bei pH ~5 und pH ~8 nach 0, 4, 8 und 12 h Inkubation. **55** erweist sich in sauren Bedingungen stabil, während es sich unter basischen Bedingungen sehr schnell zersetzt. **B)** Ausschnitte der HPLC-Chromatogramme für **55** in H<sub>2</sub>O/NaOH, pH ~8 bei 0, 4, 8 und 12 h. Pro Injektion 5 nmol in 20 µL, Methode 0.1 M TEAA, 0-30% B über 30 min, Flussrate 1 mL/min.

Diese pH-Untersuchungen wurden nochmals isoliert für die CRBN-Rekruter durchgeführt (**Abbildung 3.64**). Zunächst wurden die Azide **54a-b** in einer Click-Reaktion mit dem Linker **31a** zu den Substanzen **114a-b** umgesetzt (**Abbildung 3.64A**, detektiert mittels RP-LCMS). Anschließend wurden diese 4 Substanzen unter den gleichen Bedingungen wie **55** zuvor analysiert. Die Substanzen wurden gesättigten Lösungen von NH<sub>4</sub>Cl und NaHCO<sub>3</sub> bei 37 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen mittels RP-HPLC untersucht. Auch hier sind die Substanzen unter sauren Bedingungen stabil (**Abbildung 3.64B**) und eine Hydrolyse ist nur im Basischen erkennbar (**Abbildung 3.64C**), was die zuvor aufgestellte Hypothese unterstützt.



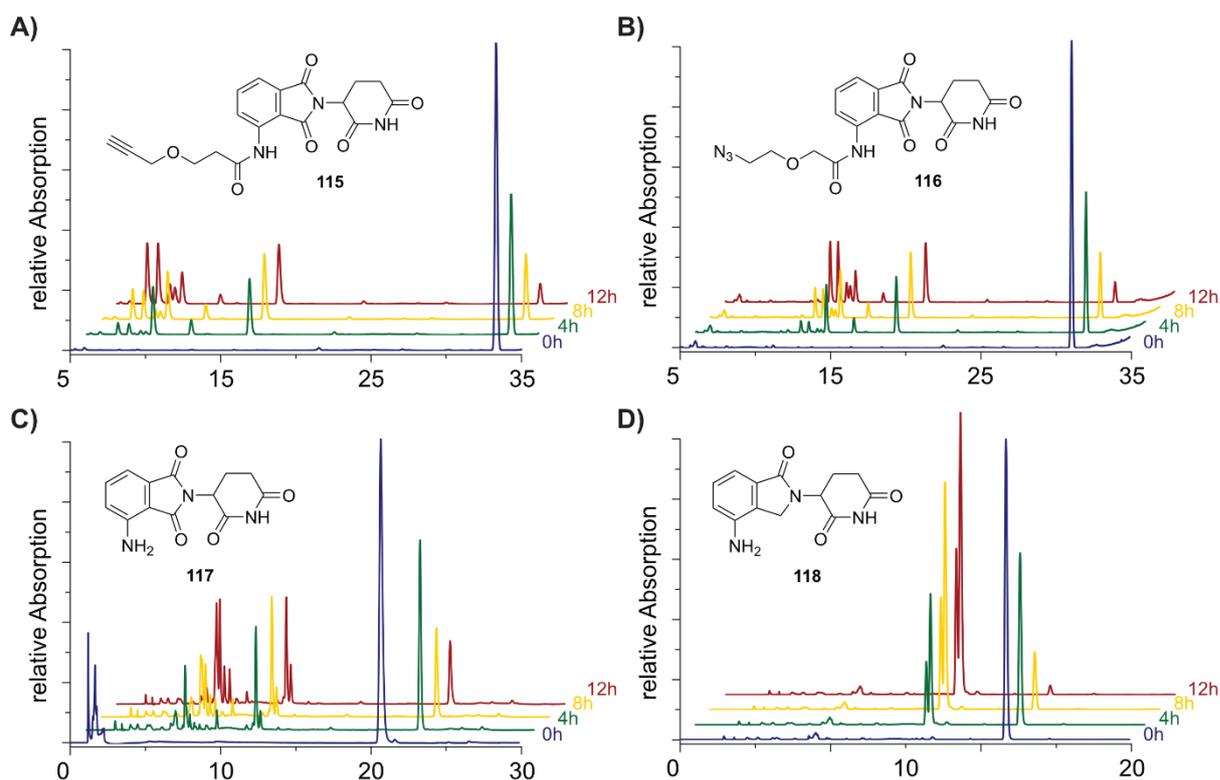
**Abbildung 3.64. A)** Synthese von **114a-b**, ausgehend von **54a-b** und Linker **31a** mittels CuAAC. **B)** Untersuchung der hydrolytischen Stabilität von **54a-b** und **114a-b** in gesättigter wässriger NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (pH ~5) durch relative Quantifizierung der verbliebenen Substanz nach 0, 4, und 12 h. **C)** Untersuchung der hydrolytischen Stabilität von **54a-b** und **114a-b** in gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (pH ~8) durch relative Quantifizierung der verbliebenen Substanz nach 0, 4, und 12 h. Alle Substanzen erweisen sich stabil in sauren Bedingungen und instabil in basischen Bedingungen. RP-HPLC, pro Injektion 10 oder 15 nmol in 20 µL, Methode 0.1 M TEAA, 0-50% B über 30 min, Flussrate 1 mL/min.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die hier verwendete Zelllinie saure pH-Werte dulden kann, denn so könnten zumindest die zuvor synthetisierten Substanzen untersucht werden. Um die Zellviabilität unter bestimmten Bedingungen zu untersuchen, kann ein MTT-Test durchgeführt werden. Bei einem solchen Test wird genau genommen der Zellmetabolismus untersucht, welcher oft stark mit der Zellviabilität korreliert. Hier werden durch aktiven Stoffwechsel und in der Zelle synthetisierten Reduktionäquivalenten der Farbstoff 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) zum entsprechenden Formazan reduziert. Anschließend kann die Absorption der Testlösung bei einer bestimmten Wellenlänge untersucht und so Rückschluss auf den Gesamtumsatz an Farbstoff und die Menge an noch metabolisch aktiven Zellen gezogen werden (Abbildung 3.65A).<sup>[260]</sup> Diese Zellviabilitätsstudien wurden von *Simon Dresbach* durchgeführt und haben gezeigt, dass nach 16 Stunden bei pH 6 noch 70% und bei pH 5.5 nur noch knapp 50% von den THP-1-Zellen metabolisch aktiv sind. Um zu testen, ob unsere Substanzen auch bei pH 6 stabil sind, wurden weitere Tests durchgeführt (Abbildung 3.65B). Hierbei stellte sich heraus, dass bei pH 6 im Vergleich zu pH 7.4 die Stabilität von **55** zwar erhöht ist, jedoch nicht in einem ausreichenden Maße für unsere Studien: nach 8 h sind noch knapp 30% und nach 12 h nur etwa 10% in Relation zu  $t_0$  erhalten geblieben. Zieht man dieses Ergebnis mit denen des MTT-Tests in Betracht, lässt sich schlussfolgern, dass ein Anpassen der Zellkulturbedingungen in Bezug auf den pH-Wert aufgrund der Inkompatibilität zwischen Zelllinie und Substanzklasse nicht sinnvoll sein sollte.



**Abbildung 3.65. A)** MTT-Test der THP1-Zellen in Abhängigkeit des pH-Werts. Die Metabolisierung von MTT innerhalb der Zellen korreliert mit ihrer Aktivität. Nach 16 h sind bei pH ~6 noch etwa 70% der Zellen am Leben, während es bei pH ~5,5 nur noch etwa 50% sind. Daten erhoben und bereitgestellt von *Simon Dresbach*. **B)** Restmenge von **55** in RPMI-1640 und in RPMI-1640, angepasst an pH ~6, nach 0, 4, 8 und 12 h. Die Stabilität ist zwar insgesamt besser, jedoch nicht ausreichend für biologische Studien bei diesem pH-Wert. RP-HPLC, pro Injektion 5 nmol in 20  $\mu$ L, Methode 0.1 M TEAA, 0-30% B über 30 min, Flussrate 1 mL/min.

Weiterhin wurden noch andere IMiDs (engl. *immunomodulatory imide drugs*) und deren kommerziell erhältlichen Derivate auf ihre Stabilität in RPMI-1640 untersucht (Abbildung 3.66). Einige dieser Substanzen werden oft als Bausteine für eine Endstufenmodifikation vermarktet (**115** und **116**, Abbildung 3.66A-B). Auch hier konnte bei allen untersuchten Substanzen eine Hydrolyse mittels RP-HPLC und HRMS bestätigt werden. Nach 12 h sind die Substanzen **115-118** kaum zu detektieren und das Zersetzungsmuster für **115-117** ist sehr ähnlich zu den zuvor beobachteten (Abbildung 3.66A-C). Lediglich für **118** ist die Zersetzung weniger komplex (Abbildung 3.66D).



**Abbildung 3.66.** Untersuchung der Stabilität verschiedener IMiD-Derivate in RPMI-1640 bei 37 °C nach je 0, 4, 8 und 12 h. Ausschnitte der HPLC-Chromatogramme für **A)** **115** von 5 bis 35 min, **B)** **116** von 5 bis 35 min, **C)** **117** von 0 bis 30 min, und **D)** **118** von 0 bis 20 min. Pro Injektion 15 nmol in 20 µL, Methode 0.1 M TEAA, 0-50% B über 30 min, Flussrate 1 mL/min.

Bei den Click-Reaktionen der noch am Festphasenmaterial gebundenen Oligonukleotide **107** und **108** mit den Substanzen **54a-b** und **84a-c** konnte nach der basischen Aufarbeitung weder Startmaterial noch Produkt detektiert werden (siehe **Kapitel 3.2.2**). Da die in diesem Kapitel alle untersuchten Substanzen, welche CRBN-Motive tragen, unter basischen Bedingungen instabil zu sein scheinen, wurden die Substanzen **54a-b** und **84a-c** auch auf ihre Stabilität unter den Entschützungsbedingungen der Oligonukleotide untersucht. Hierfür wurden kleinste Mengen der E3-Rekruter den jeweiligen Entschützungsbedingungen ausgesetzt und mittels RP-LCMS untersucht (**Tabelle 6**). Dabei hat sich im Vergleich zur Kontrolle in Wasser gezeigt, dass CRBN-Rekruter unter allen getesteten Bedingungen – sowohl *standard* als auch *ultramild* und *ultrafast* – zersetzt worden sind und nicht mehr detektiert werden konnten, während VHL-Rekruter stabil zu sein scheinen. Diese Beobachtung konnte *Dr. Giacomo Ganazzoli* auch an VHL-modifiziertem cGAMP machen.<sup>[178]</sup>

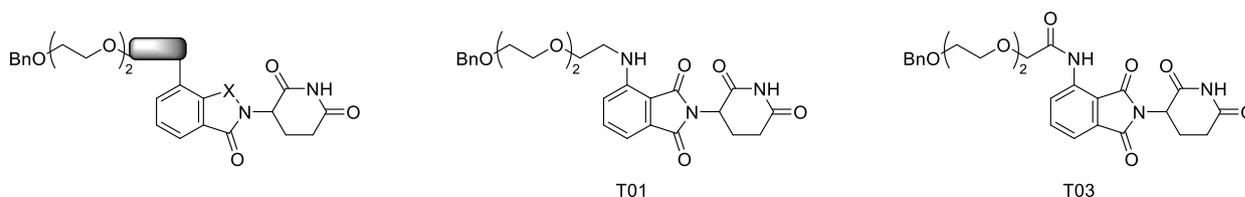
**Tabelle 6.** An E3-Rekrutern getestete Bedingungen zum Entschützen und Abspalten von Oligonukleotiden.

KATEGORIE	Entschützungsbedingung	Zeit, Temperatur	CRBN	VHL
KONTROLLE	H <sub>2</sub> O	18 h, RT	✓	✓
STANDARD	30% NH <sub>4</sub> OH <sub>(aq)</sub>	6 h, 55 °C	✗	✓
	30% NH <sub>4</sub> OH <sub>(aq)</sub>	2 h, RT	✗	✓
ULTRAFAST	30% NH <sub>4</sub> OH <sub>(aq)</sub> / 40% MeNH <sub>2(aq)</sub> (1:1)	5 min, 65 °C	✗	✓
	30% NH <sub>4</sub> OH <sub>(aq)</sub> / 40% MeNH <sub>2(aq)</sub> (1:1)	2 h, RT	✗	✓
ULTRAMILD	<i>t</i> BuNH <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O (1:3)	6 h, 60 C	✗	✓
	<i>t</i> BuNH <sub>2</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1:2)	18 h, 55 °C	✗	✓

Während TPD als Konzept zunächst um die Jahrtausendwende aufgekommen ist,<sup>[133]</sup> und über erste zellpermeable PROTACs im Jahr 2004 berichtet wurde,<sup>[261]</sup> begann ein regelrechter Goldrausch ab dem Jahr 2010.<sup>[262]</sup> Mit am weitesten verbreitet sind Modalitäten, welche auf die E3-Ligasen VHL und CRBN abzielen.<sup>[141]</sup> Die Vorteile lagen hier mit der breiten Expression in Zelltypen und der potenziell leichten therapeutischen Zugänglichkeit aufgrund bereits vorhandener Moleküle auf der Hand. Um zielgerichtet CRBN zu rekrutieren, wurden bisher meist Variationen der medizinisch etablierten IMiDs eingesetzt. Dabei basieren fast 80% von den bisher knapp 1000 publizierten CRBN-basierten PROTACs auf Phthalimiden,<sup>[263]</sup> gleichzeitig basieren über 75% aller auf CRBN abzielenden PROTACs auf einer heteroatom-erhaltenden Modifizierung in Position 4 der Phthalimide.<sup>[161, 183]</sup> Unsere Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Stabilität unserer Substanzen stark pH-abhängig ist und oberhalb eines Wertes von pH 6 nicht ausreichend gegeben zu sein scheint.

Die hier gesammelten Ergebnisse sind im Hinblick auf die schiere Menge an publizierten CRBN-basierten PROTACs sehr ernüchternd und werfen mehr Fragen auf als sie beantworten – vor allem, wenn der therapeutische Einsatz in Betracht gezogen wird. Basierend auf ihren fundamentalen Konzepten sollen PROTACs nicht nur innerhalb der Zelle katalytisch aktiv sein und stöchiometrisch gesehen mehrere Proteine zum Abbau markieren können, sondern müssen dementsprechend auch eine hohe chemische Stabilität und eine hohe Spezifität sowohl zum abzubauenen Protein als auch zur E3-Ligase aufweisen.<sup>[264]</sup> Dies kann jedoch basierend auf unseren Beobachtungen nicht bzw. nur schwierig mit traditionellen IMiD-basierten PROTACs erreicht werden: die schnelle Hydrolyse bei physiologischem pH und das resultierende komplexe Zerfallsmuster schließen eine Wiederverwendbarkeit und eine hohe Spezifität zu CRBN *de facto* aus. Trotz dieser Datenlage sind aber viele Publikationen rund um dieses Motiv mit nachweisbarer biologischer Aktivität entstanden.<sup>[141, 262]</sup>

Die Stabilität von Thalidomid ist schon in den 1960er-Jahren untersucht worden ist,<sup>[265, 266]</sup> dessen genauer Wirkmechanismus und der seiner Derivate mit CRBN wurde aber erst um 2010 aufgedeckt.<sup>[146, 267]</sup> Maßgebliche Untersuchungen zu den IMiDs in der Verwendung von PROTACs, hinsichtlich ihrer Stabilität, Struktur oder der Art ihrer Verknüpfung, wurden jedoch erst in den letzten paar Jahren durchgeführt. Ende 2021 berichteten BRICELJ *et al.*, dass die Art der Linker-Verknüpfung am Phthalimid maßgeblich die Stabilität der IMiDs gegenüber pH-abhängiger Hydrolyse beeinflussen soll – dabei scheinen sekundäre Amine wie in T01 mit einer Restmenge von knapp 80% nach 24 h bei physiologischem pH das beste Verknüpfungsmotiv darzustellen (**Abbildung 3.67**).<sup>[263]</sup> Diese Ergebnisse konnten jedoch in unseren Studien so nicht bestätigt werden: die von uns getesteten Substanzen wiesen alle im Schnitt eine Halbwertszeit von unter 4 h auf. Hierbei muss jedoch betont werden, dass eine direkte Vergleichbarkeit unserer Studien nicht gegeben ist, da sich sowohl die untersuchten Substanzen als auch die Methodik stark unterscheiden.



**Abbildung 3.67.** Untersuchte Strukturen von BRICELJ *et al.* hinsichtlich der hydrolytischen Stabilität in Relation zur Art der Verknüpfung des Linkers. Links: grundlegende Struktur der getesteten Derivate (X : C=O oder CH<sub>2</sub>). Mitte und rechts: die in diesem Zusammenhang genauer betrachteten und diskutierten Derivate von Pomalidomid.

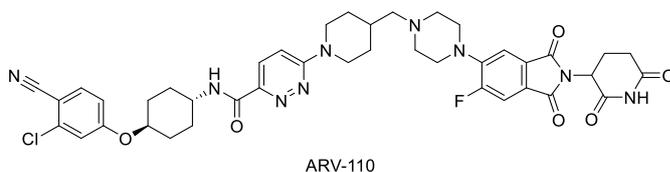
BRICELJ *et al.* untersuchten die Substanzen nämlich hauptsächlich in Phosphatpuffersystemen rein chemischer Komposition oder in Blutplasma, nicht in Zellkulturmedium, und es wurden im direkten Vergleich viel geringere Konzentrationen der IMiD-Derivate getestet.<sup>[263]</sup> Interessant ist jedoch der Unterschied in den Halbwertszeiten zwischen einem rein chemisch definierten Puffersystem und Blutplasma, welches in seiner Komposition deutlich näher an einem Zellkulturmedium ist (**Tabelle 7**). Während für T03 die Restmenge nach 24 h im chemisch definierten Puffersystem noch 15% beträgt, liegt die Halbwertszeit in Blutplasma bei nur  $t_{1/2} = 2$  h. Die für T03 im Blutplasma ermittelte Halbwertszeit liegt in einer ähnlichen Größenordnung wie die von uns beobachteten Halbwertszeit für CDG-O<sup>6</sup>4-POM (**55**) in Zellkulturmedium. Jedoch weist diese Beobachtung zugleich auf unterschiedliche Hydrolysegeschwindigkeiten in den unterschiedlichen Testbedingungen hin. Unter der Annahme eines exponentiellen Zerfalls sollte die Halbwertszeit von T03 in rein chemisch definiertem Puffer etwa 8 h betragen – viermal so lang wie im Blutserum festgestellt. Ein ähnlicher Trend kann für T01 festgestellt werden: die Stabilität scheint in Blutplasma deutlich kürzer zu sein als in einem rein chemisch definierten Puffer bei ähnlichem pH.

**Tabelle 7.** Stabilitäten von T01 und T03 in Phosphatpuffer (pH 7.4) und Blutserum. Angegebene Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  wurden aus den publizierten Daten unter Annahme eines exponentiellen Zerfalls berechnet; 100% bei  $t = 0$  h.<sup>[263]</sup>

SUBSTANZ	Phosphatpuffer			Blutserum			
	% (24 h)	% (48 h)	$t_{1/2}$ [h]	% (0.5 h)	% (1 h)	% (2 h)	$t_{1/2}$ [h]
T01	80	69	~ 85	94	90	86	~ 9
T03	15	5	~ 9	88	74	50	~ 2

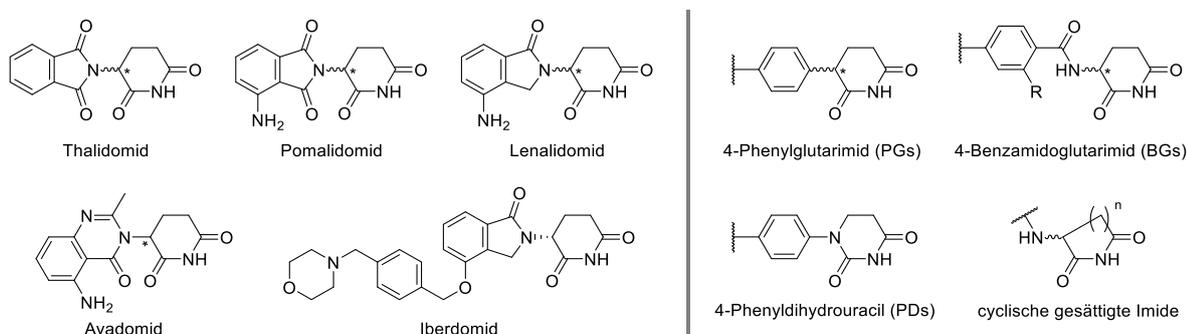
Die von BRICELJ *et al.*<sup>[263]</sup> aufgestellte Hypothese, dass die unterschiedlichen Halbwertszeiten auf einen enzymatischen Effekt vom Blutserum zurückgeführt werden kann, können wir jedoch nicht verifizieren. Bei unseren Untersuchungen hat selbst die Abwesenheit von FBS, und damit auch die Abwesenheit von potenziell aktiven Proteinen, die Geschwindigkeit der Hydrolyse nicht maßgeblich beeinflusst hat. Diese Ergebnisse zeigen, dass der hydrolytische Zerfall noch deutlich komplexer scheint als bisweilen angenommen und neben dem pH-Wert auch die anderen Komponenten wie Aminosäuren und dergleichen einen Einfluss auf die Hydrolyse haben könnten. Basierend auf unseren Ergebnissen in gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung könnte das Puffersystem selbst auch eine Rolle spielen.

2022 wurden von NGUYEN *et al.* pharmakokinetische Untersuchungen an ARV-110 (**Abbildung 3.68**) durchgeführt, einer Substanz, welche erstmals 2018 dokumentiert wurde und mittlerweile schon in klinischen Studien der Phase I/II gegen Prostatakrebs getestet wird.<sup>[268,269]</sup> Auch hier zeigten ähnliche *in vitro*-Studien trotz der Reduktion an zellulären Proteinmenge, dass die ARV-110 in menschlichem Blutplasma schnell hydrolysiert – es konnten nach 60 min bei 37 °C nur noch weniger als 50% nachgewiesen werden. Die bisher größte Studie wurde wohl von GORACCI *et al.* im Jahre 2020 angelegt, in der viele unterschiedliche PROTACs auf ihre Stabilität und ihre ADME-Eigenschaften (Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination) untersucht worden sind.<sup>[270]</sup> Dies sind einige der sehr seltenen Beispiele, bei denen die Stabilität von IMiD-basierten PROTACs genauer untersucht worden ist.



**Abbildung 3.68.** Struktur von ARV-110.

Weiterhin wurden erst in den letzten Jahren viele Modifikationen und Weiterentwicklungen der bisher eingesetzten IMiDs hergestellt, sei es, um Off-Target-Effekte zu reduzieren, die Stabilität zu erhöhen oder beides zugleich (**Abbildung 3.69**). Dabei wird meist das Glutarimid-Motiv konserviert, da dieses maßgeblich für die Bindung zu CRBN ist: eine Methylierung des Glutarimids am Stickstoff beispielsweise entfernt jegliche Aktivität der Substanzen.<sup>[271]</sup> Während neue Derivate wie Avadomid<sup>[272]</sup> und Iberdomid<sup>[273]</sup> synthetisiert wurden und mittlerweile klinisch getestet werden, begannen erste spezifische Untersuchungen zur SAR zwischen IMiD-Derivaten, CRBN und Neosubstraten erst im Jahr 2018. Hier lag der Fokus primär auf Modifikationen des Phthalimid-Gerüsts und zeigte, dass stark elektronenziehende Gruppen und der Verlust der Aromatizität im Phthalimid die Bindungsaffinität zu CRBN deutlich verschlechterten.<sup>[274]</sup> ICHIKAWA *et al.* konnten im Jahr 2022 zeigen, dass gesättigte cyclische Imide wie Glutarimid und Succinimid, welche beispielsweise aus den proteinogenen Aminosäuren entstehen können, die strukturell maßgeblichen Motive für eine Interaktion mit CRBN darstellen.<sup>[275]</sup>



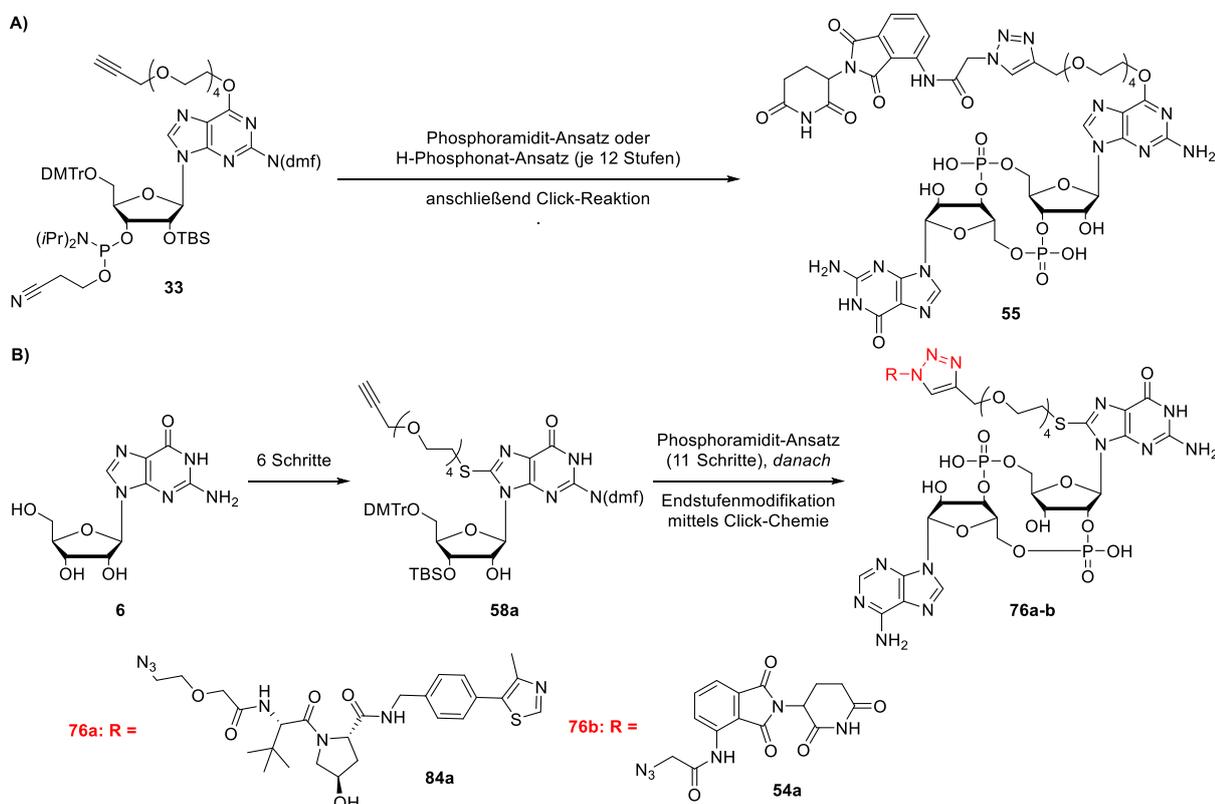
**Abbildung 3.69.** Überblick über CRBN-Rekruter: links auf Basis traditioneller IMiDs, rechts deren Weiterentwicklungen.

Inspiziert von IMiD-Derivaten, welche strukturell auf einer potenziellen Hydrolyse des Phthalimids basieren<sup>[276]</sup>, konnten MIN *et al.* dann im Jahr 2021 eine neue Substanzklasse der 4-Phenylglutarimide (PGs) etablieren, welche aufgrund des nicht mehr vorhandenen elektronenziehenden Effekts des Phthalimids die Hydrolyse des Glutarimids verlangsamen und so eine weitaus höhere Halbwertszeit aufweisen sollen.<sup>[266, 277]</sup> Ende 2023 wurde dann von JARUSIEWICZ *et al.* eine iterative Weiterentwicklung der PGs mit den 4-Phenyldihydrouracilen (PDs) gezeigt, welche keine Racemisierung mehr durchlaufen sollen.<sup>[278]</sup> Parallel dazu konnten STEINEBACH *et al.* Benzamid-basierte Substanzen als neuartige Alternativen zu den bisher genutzten IMiDs für PROTACs etablieren. Hier konnte eine bis zu 5-fach höhere Stabilität über den Zeitraum von 24 h unter Verwendung eines rigiden Linkers nachgewiesen werden.<sup>[279]</sup> Zudem haben NORRIS *et al.* eine weitreichende Studie zu verschiedensten Modifikationen des Phthalimid-Gerüsts hinsichtlich der Aktivität dieser Substanzen durchgeführt.<sup>[271]</sup> Jedoch scheint die Weiterentwicklung der traditionellen IMiDs nicht frei von Tücken zu sein. Neben der Problematik der hydrolytischen Stabilität scheinen Modifikationen sowohl am Molekül selbst als auch an den Linkern – sei es die Länge, Art der Verknüpfung oder Koposition – die Aktivität bezüglich Neo-Substrate und Off-Target Effekten stark zu beeinflussen. YANG *et al.* konnten zeigen, dass eine kleine Abwandlung des Linkers die Spezifität eines traditionellen IMiD-PROTACs zum POI komplett verändern kann.<sup>[280]</sup> Weiterhin ist in den letzten Jahren eine sehr breite Affinität zu Zinkfingerproteinen von traditionelle IMiDs und PROTACs auf deren Basis als Off-Target-Effekt bekannt geworden<sup>[281]</sup>, rigide Linker scheinen dieses Problem jedoch bis zu einem gewissen Grad beeinflussen zu können.<sup>[282]</sup>

Unter diesen Umständen ist die Verwendung traditioneller IMiDs für funktionelle CRBN-rekrutierende PROTACs trotz ihrer weitreichenden Verwendung und der bereits angelaufenen klinischen Untersuchungen als eher kritisch anzusehen. Die Stabilität dieser Substanzen scheint nicht nur stark pH-abhängig zu sein, sondern schwankt zugleich auch in Relation zu den genutzten Testbedingungen, was eine sinnvolle Evaluierung maßgeblich erschwert. Des Weiteren ist die Nutzung eines hydrolytisch instabilen Motives, welche nur bis zu einem gewissen Grad durch Substituenten und Regiochemie beeinflusst werden kann, in Bezug auf die Grundidee von TPD und PROTACs als katalytisch wirkende Moleküle widersprüchlich. Es wird nicht nur die Spezifität und Effektivität dieser Substanzen durch die Verwendung traditioneller IMiDs negativ beeinflusst, sondern die hydrolytische Instabilität bringt auch eine zusätzliche Unsicherheit in ein System hinein, welches bisweilen schon stark auf empirische Optimierung setzt. Zugleich könnte die hydrolytische Instabilität auch zu weiteren unerwünschten Off-Target-Effekten führen und unter therapeutischer Betrachtung kommt noch der Aspekt der Dosierung hinzu, welche wahrscheinlich höher und öfter erfolgen muss, als erste Untersuchungen dieser „katalytisch wirkende Stoffe“ *in vitro* annehmen lassen würden.

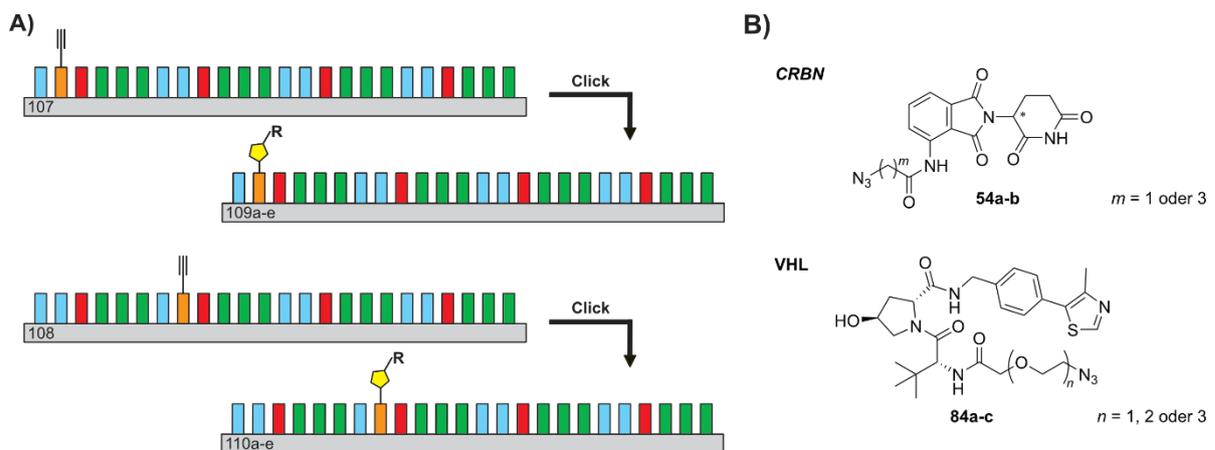
## 4 Fazit und Ausblick

Insgesamt konnten im Zuge dieser Forschungsarbeit mehrere Syntheserouten zu ersten Prototypen von PROTACs gegen die cGAS-STING-Kaskade etabliert werden. Während die Kandidaten für PROTACs gegen STING auf Basis von zyklischen Dinukleotiden entwickelt wurden, sind die Kandidaten gegen cGAS auf Basis von Oligonukleotiden, speziell G-Quadruplexen, entstanden. Dabei wurden für PROTACs gegen STING nicht nur Kandidaten auf Basis zweier unterschiedlicher Moleküle etabliert – nämlich 2',3'-cGAMP (**1**) und 3',3'-c-di-GMP (**2**) – sondern im gleichen Zuge auch zwei unterschiedliche Modifikationen für eine Endstufenmodifikation mittels Click-Chemie vom Typ CuAAC an Guanosin (**6**) eingeführt (siehe **Kapitel 3.1, Abbildung 4.1**). Die Endstufenmodifikation soll für eine breite Zugänglichkeit vieler verschiedener potenzieller PROTACs durch eine schnelle, kostengünstige Derivatisierung bei geringem Verlust von Ausgangsmaterial sorgen. Sowohl die Moleküle **55** als auch **76** leiten sich aus ihrer Funktion natürlicher Aktivatoren von STING mit ihren unterschiedlichen Bindungsmodi ab, wohingegen die unterschiedlichen Nukleobasen-Modifikationen an Guanosin, sowohl an Position O<sup>6</sup> als auch C<sup>8</sup>, hinsichtlich ihres jeweiligen potenziellen Einflusses auf die Bindungsaffinität zu STING etabliert worden sind. Für die Synthese von **55** konnten zwei verschiedene Syntheserouten ausgehend vom modifizierten Phosphoramidit **33** etabliert werden. Dabei belaufen sich beide Syntheserouten auf die gleiche Gesamtzahl an Syntheseschritten, unterscheiden sich aber in Ihrer Herangehensweise (**Abbildung 4.1a**). Für die Synthese von cGAMP-Derivaten **76a** und **76b** konnte eine Syntheseroute, ausgehend von Guanosin **6** über insgesamt 17 Schritte etabliert werden (**Abbildung 4.1b**).



**Abbildung 4.1. A)** Synthese von PROTAC **55**, ausgehend von **33**. **B)** Synthese der PROTACs **76a** und **76b**, ausgehend von **6**.

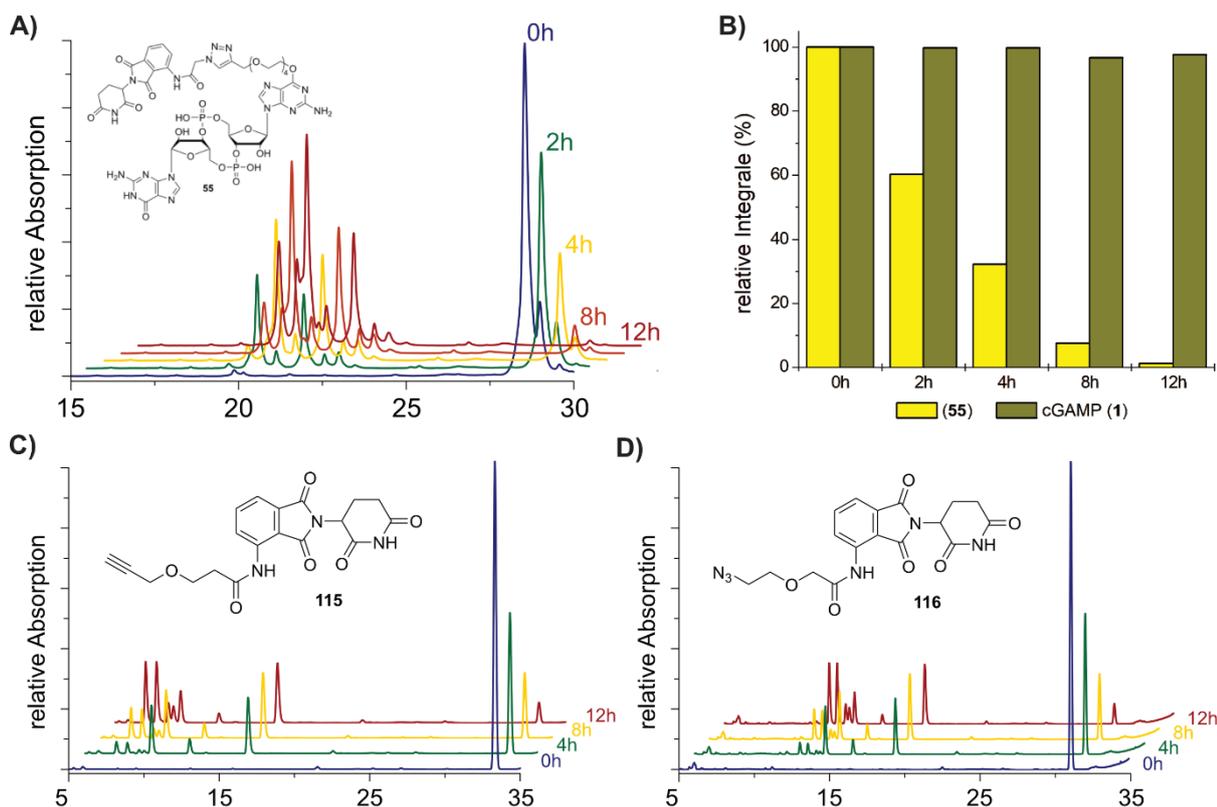
Während die Herstellung von cGAS-PROTACs auf Basis bekannter *small molecule* Antagonisten von cGAS nicht erfolgreich war (siehe **Kapitel 3.2.1**) konnten potenzielle cGAS-PROTACs auf Basis der Oligonukleotidsequenz von A151 (5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3') entworfen und synthetisiert werden (siehe **Kapitel 3.2.2**). Unter physiologischen Bedingungen bildet diese Sequenz, welche in Telomeren vorkommt, G-Quadruplexe aus und soll mit cGAS interagieren, es aber nicht aktivieren. Die mittels automatisierter Festphasensynthese hergestellten Oligonukleotide **107** und **108** trugen wie A151 ein vollständig modifiziertes Phosphorthioat-Rückgrat und konnten über eine Endstufenmodifizierung mittels Click-Chemie zu den jeweiligen potenziellen cGAS-PROTACs **109a-e** und **110a-e** umgesetzt werden konnten (Abbildung 4.2). Um dies zu Erreichen wurde während der Synthese das zweite **T** innerhalb des ersten *repeats* (**107**) oder zweiten *repeats* (**108**) durch **c8U** ersetzt, welches ein endständiges Alkin anstelle der Methylgruppe von **T** trägt (**Abbildung 4.2a**). Die Oligonukleotide **107** und **108** selbst konnten dabei jeweils in Ausbeuten von über 25% synthetisiert werden und mittels CD-Spektroskopie konnte die Ausbildung von G-Quadruplexen hybrider Topologie in Anwesenheit von Kalium bestätigt werden. Die anschließende Endstufenmodifikation zu den potenziellen cGAS-PROTACs **109a-e** und **110a-e**, in Abhängigkeit vom jeweiligen Azid (**Abbildung 4.2b**) konnte in Ausbeuten von etwa 40% bis 75% erreicht werden. Biologische Untersuchungen dieser Substanzen stehen noch aus.



**Abbildung 4.2.** Oligonukleotid-basierte cGAS-PROTACs. A) Endstufenmodifizierung der Oligonukleotide **107** und **108** zu jeweils **109a-e** und **110a-e**. B) Verwendete Azid-tragende Motive für die E3-Ligasen CRBN (**54a-b**) und VHL (**84a-c**).

Während der von *Yasmin V. Gärtner* durchgeführten biologischen Untersuchungen konnte jedoch festgestellt werden, dass alle bis zu dem Zeitpunkt getesteten STING-PROTACs die zellulären Level von STING trotz nachweislicher Internalisierung nicht reduzieren. In diesen Untersuchungen wurden vorrangig STING-PROTACs untersucht, welche sowohl von mir als auch *Dr. Giacomo Ganazzoli* hergestellt worden sind und CRBN als E3-Ligase rekrutieren sollen. Um herauszufinden, weshalb unsere Substanzen nicht biologisch aktiv waren, wurden daraufhin physikochemische Studien mittels RP-HPLC unter Zellkulturbedingungen für die getestete Zelllinie THP-1 durchgeführt (**Kapitel 5.3**). Dabei stellte sich heraus, dass diese Substanzen eine Instabilität aufweisen und einem komplexen hydrolytischen Zerfall im Zellmedium ausgesetzt sind. Ein solches Verhalten konnte bei natürlichem cGAMP und vor der Endstufenmodifikation zum PROTAC nicht festgestellt werden.

Schrittweise konnte daraufhin der pH-Wert als Schlüsselkomponente für den hydrolytischen Zerfall der CRBN-rekrutierenden STING-PROTACs innerhalb des Zellmediums ausfindig gemacht werden. Eine Senkung des pH-Wertes konnte die Stabilität maßgeblich erhöhen, jedoch sind solch niedrige pH-Werte nicht geeignet zum Kultivieren von Zellen. Ähnliches Verhalten konnte für die CRBN-Motive selbst, sowohl für kommerziell erwerbliche als auch eigens hergestellte bzw. modifizierte Substanzen, beobachtet werden. Es kann also geschlossen werden, dass die Instabilität bei physiologischen pH-Werten von den CRBN-Motiven und nicht von den zyklischen Dinukleotiden selbst ausgeht (**Abbildung 4.3**).



**Abbildung 4.3.** Untersuchung verschiedener Substanzen unter Zellkulturbedingungen. **A)** Stabilität von **55** nach 0, 2, 4, 8 und 12 h. **B)** Restmenge von **55** und **1** nach 0, 2, 4, 8, und 12 h. **C)** Stabilität von **115** und **D)** **116** nach 0, 4, 8 und 12 h.

Dies stellt ein klares und viel weiter reichendes Problem dar. Trotz der weit verbreiteten Anwendung von CRBN-Motiven in TPD und bereits angelaufenen klinischen Phasen wurde diese Problematik bisher jedoch nur spärlich diskutiert. Nur einige wenige Publikationen der letzten Jahre zeigen dieses Problem stellenweise im Kontext von PROTACs auf und versuchen diese zu ergründen oder zu lösen. Während einige Publikationen auf die Art der Verknüpfung der CRBN-Motive zu den Linkern oder die Konstitution der Linker weisen, diskutieren andere die Struktur der CRBN-Motive selbst als ausschlaggebenden Grund hinsichtlich der Hydrolyse und versuchen diese weiterzuentwickeln und zu optimieren. Jedoch erweist sich eine zielgerichtete Optimierung dieser Substanzen als schwierig, da kleine Änderungen auch mit der Spezifität der Substanzen einhergehen können. Bis dahin sollte trotz der höheren Komplexität und den damit einhergehenden Kosten wohl eher auf die hydrolyseunempfindlichen VHL-Rekruter gesetzt werden, um den zuvor genannten negativen Aspekten bezüglich der Hydrolyse von PROTACs entgegenwirken zu können.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Chemische Materialien und Methoden

#### Synthese

Trockene Lösemittel und Reagenzien wurden von kommerziellen Anbietern wie *Merck*, *Sigma-Aldrich*, *Thermo Fisher Scientific*, *Acros Organics*, *Carbosynth*, *Carbolution*, *TCI Europe*, *ABCR*, *VWR*, *Alfa Aesar*, *BLD Pharm*, *Linktech* und *GlenResearch* erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für besonders feuchtigkeitssensitive Reaktionen unter Argonatmosphäre wurden Lösemittel und Reagenzien vor der Verwendung ein weiteres Mal über aktiviertes Molekularsieb (3 Å) getrocknet, falls nötig. Vollentsalztes Wasser wurde über ein *Arium Pro* von *Sartorius* oder über ein *OmniaTap II* System von *StakPure* gereinigt.

Sofern nicht weiter spezifiziert, wurden alle Reaktionen magnetisch gerührt sowie in ausgeheizten (Heißluftföhn, 550 °C, oder Trockenofen, 130 °C, 18 h) Glasreaktionsgefäßen unter Inertgasatmosphäre aus Stickstoff durchgeführt. Für Reaktionen bei erhöhten Temperaturen wurden Ölbäder und elektrische Heizplatten verwendet. Für Reaktionen bei tiefen Temperaturen kamen entweder Eis in Wasser (0 °C), Trockeneis in Aceton (−78 °C) oder Trockeneis in Acetonitril (Je nach Menge des verwendeten Trockeneises für Temperaturen zwischen −20 °C und −60 °C) zum Einsatz. Angegebene Reaktionstemperaturen beziehen sich auf die externe Badtemperatur. Beim Ansetzen von Reaktionen wurden für das Überführen von flüssigen Reagenzien und Lösungsmitteln Kanülen und Spritzen verwendet, die zuvor mit Inertgas gespült wurden. Bei mehrstufigen Reaktionen wurde der nächste Schritt erst durchgeführt, wenn kein Umsatz mehr mittels TLC, RP-LCMS oder NMR festgestellt werden konnte. Über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  oder  $\text{MgSO}_4$  trocknen, impliziert die Zugabe und das Rühren einer angemessenen Menge des wasserfreien Salzes zur organischen Phase nach der wässrigen Aufarbeitung, sowie die anschließende Entfernung des Trockenmittels per Filtration und Spülen des Filterkuchens mit zusätzlichem Lösemittel. Zur *in vacuo* Destillation wurde ein *Laborota 4000* der Firma *Heidolph* oder ein *Rotavapor R-300* der Firma *Büchi* in Verbindung mit einer Membranpumpe (*PC3001 Vario select* von *Vacuubrand* oder *SC920G* von *KNF*) bei 45 °C verwendet. Für besonders Hydrolyse- und/oder luftempfindliche Substanzen wurde der Rotationsverdampfer vor der Verwendung evakuiert und sowohl vor als auch nach der Destillation mit Inertgas geflutet.

Oligonukleotide (ONs) wurden an einem automatischen DNA/RNA-Synthesizer (*Applied Biosystems 394 DNA/RNA Synthesizer*) mittels Standard-Festphasen-Phosphoramidit-Chemie auf CPG-Material synthetisiert. ONs wurden im DMT-OFF-Modus unter Verwendung von Dichloressigsäure (DCA) als Entschützungsreagenz in Dichloromethan, Activator 42® (5-[3,5-Bis(trifluormethyl)phenyl]-1H-tetrazol) als Aktivator in Acetonitril,  $\text{Ac}_2\text{O}$  als Capping-Reagenz in Pyridin/THF und  $\text{I}_2$  als Oxidationsmittel in Pyridin/ $\text{H}_2\text{O}$  bzw. *Sulfurizing Reagent II* (3-((Dimethylaminomethyliden)amino)-3H-1,2,4-dithiazol-3-thion, DDTT) in Pyridin/Acetonitril als Sulfurylierungsmittel synthetisiert.

### Reaktionskontrolle und Aufreinigungsmethoden

Die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde bei erhöhtem Druck mit *Merck Geduran* Si 60 (40 – 63  $\mu\text{m}$ ) Silikagel durchgeführt. Für die Kontrolle des Reaktionsfortschritts, Ermitteln geeigneter Lösemittelsysteme, die Analyse von Fraktionen während der Säulenchromatographie und die Messung von  $R_f$ -Werten wurde die Dünnschichtchromatographie (TLC, Silikagel 60 F<sub>254</sub> Platten von *Merck*) verwendet. Die Auswertung der TLC erfolgte über Visualisierung durch UV-Licht ( $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 = 366 \text{ nm}$ ), eine Iodkammer und/oder durch Färbung mit *Stain*-Lösungen wie CAM (5.0 g  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ , 5.0 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ , 50 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50 mL), 450 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ) oder *p*-Anisaldehyd (3.7 mL *p*-Anisaldehyd, 135 mL EtOH, 5 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1.5 mL konz. AcOH). Für unter Normalphasen-Chromatographie besonders schwierig aufzureinigende Substanzen (oder zur weiteren Aufreinigung) wurde neben der präparativen Dünnschichtchromatographie ein automatisiertes Säulenchromatographiesystem der Firma *Interchim* benutzt. Das System *puriFlash 5.125* ist zur Detektion von Substanzen sowohl mit einem UV-VIS als auch mit einem ELSD ausgestattet. Als Säulenmaterial kamen vorgepackte Säulen der Firma *Interchim* zum Einsatz.

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

Für die RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*) und zur präparativen Aufreinigung von sehr polaren Substanzen wurden folgende Geräte und Flussraten verwendet:

#### Analytische HPLC:

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

#### Semipräparative HPLC:

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

#### Präparative HPLC:

*Shimadzu*, bestehend aus *CBM-40 System Controller*, *LC20AP Pump*, *SPD-40 UV-Vis Detector*, *DGU-40S Degasser*, *FCV-200AL Valve*, sowie einer *Shimpack Scepter C18-120 5mm* Säule (45 mL/min).

#### Analytische HPLC zur Messung von Kinetiken und Stabilitätstests:

*Shimadzu LC-2060C 3D*, sowie einer *EC 250/4 NUCLEODUR 100-3 C18ec* Säule von *Macherey-Nagel*. Flussrate: 0.5 mL/min. Die Probenkammer wurde auf eine Temperatur von 37 °C geheizt.

Für die Durchführung von analytischer als auch (semi-)präparativer HPLC kamen unterschiedliche Eluentensysteme zum Einsatz. Geeignete Eluentensysteme sowie Elutionsgradienten wurden zunächst für die entsprechenden Produkte auf einer analytischen HPLC optimiert und anschließend für die semipräparative oder präparative Aufreinigung verwendet oder geringfügig angepasst. Diese Eluentensysteme werden in der nachfolgenden **Tabelle 8** zusammengefasst:

**Tabelle 8.** Auflistung der zur RP-HPLC verwendeten Eluentensysteme.

Name des Eluentensystems	Eluent A	Eluent B
Ungepuffert	H <sub>2</sub> O	MeCN
Trifluoressigsäure (TFA)	H <sub>2</sub> O + 0.1 Vol.-% TFA	MeCN + 0.1 Vol.-% TFA
Triethylammoniumacetat (TEAA, pH 7)	0.1 M NEt <sub>3</sub> /HOAc in H <sub>2</sub> O	0.1 M NEt <sub>3</sub> /HOAc in 80% MeCN

#### Bestimmung von Extinktionskoeffizienten (CDNs):

Extinktionskoeffizienten wurden nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bei einer festgelegten Wellenlänge bestimmt. Dafür wurde die Absorption bei ebendieser Wellenlänge in einem UV-VIS-Spektrometer in 4 Replikaten bei Konzentration von 2 µM bis 30 µM in 2 µM-Schritten bestimmt, gemittelt und aus diesen Werten eine Gerade erstellt. Die Steigung der Gerade entspricht dem Extinktionskoeffizienten bei ebendieser Wellenlänge. Vor Beginn der Messreihe wurde zunächst eine Hintergrundsignalmessung des Lösemittels aufgenommen und abgezogen.

#### Bestimmung von Ausbeuten mittels Eichgerade:

Zur Bestimmung von Ausbeuten von geklickten Oligonukleotiden in sehr geringen Mengen, für welche die Bestimmung oder Berechnung eines Extinktionskoeffizienten schwierig war, wurde zur näheren Bestimmung der Ausbeute eine Eichgerade aufgenommen. Dafür wurden die ungeclickten Oligonukleotide in Konzentrationen von 0 bis 10 nmol in eine analytische HPLC injiziert, die Integrale gegen die Konzentration aufgetragen und anhand der so entstandenen Geraden konnten Ausbeuten nach der Click-Reaktion über das Integral näherungsweise bestimmt werden.

#### Vakuumkonzentration:

Zum Trocknen von Proben, gelöst in sehr kleinen Volumina von wässrigen Lösemittelgemischen mit hohem Anteil an MeCN, kam eine *SpeedVac SPD 120* der Firma *Thermo Fisher Scientific*, gekoppelt mit einer *CT-02-50 SR* Kühlfalle der Firma *Christ* und einer Drehschiebervakuumpumpe zum Einsatz.

#### Gefriertrocknen:

Für in sehr polaren Lösemittelgemischen (wie Wasser mit bis zu 50% MeCN oder 5% DMSO in H<sub>2</sub>O) gelöste Substanzen kam eine *Lyophille Alpha 2-4 LSCbasic* der Firma *Christ*, angeschlossen an einer Drehschiebervakuumpumpe, zum Einsatz. Die Proben wurden zuvor in flüssigem Stickstoff für mind. 15 min durchgefroren, bevor sie über Nacht an der Lyophille gefriergetrocknet wurden.

## Analytische Methoden

### **Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spektroskopie:**

$^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sowie 2D-Spektren (COSY, HSQC, HMBC) wurden, soweit nicht spezifiziert, bei Raumtemperatur von der NMR-Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Chemie (Haus F), an einem *Bruker ARX 300*, *Varian Inova 400*, *Varian VXR400S* und an einem *Bruker ARX 600* oder selbstständig an einem *Bruker Ascend 400* oder *Bruker Ascend 500* gemessen. Die chemische Verschiebung ( $\delta$ ) wird nach allgemeingültiger Konvention in *parts per million* (ppm) tieffeldverschoben zum Standard Tetramethylsilan (TMS) angegeben und relativ zum verbleibenden undeuterten Lösungsmittel als internen Standard nach GOTTLEB *et al.*<sup>[283]</sup> referenziert. Die Multiplizität der Signale wurden als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), p (Pentett), m (Multipllett) und deren Kombinationen angegeben. Kopplungskonstanten ( $J$ ) in  $^1\text{H}$ -Spektren beziehen sich, falls nicht anders angegeben auf  $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -Kopplungen und sind in Hertz (Hz) angegeben. Im Fall von phosphorhaltigen Substanzen beziehen sich Kopplungskonstanten in  $^{13}\text{C}$ -Spektren auf  $^{13}\text{C}$ , $^{31}\text{P}$  Kopplungen und sind in Hz angegeben. Produkte, die sich aus mehreren Diastereomeren zusammensetzten oder deren Aufreinigung keine getrennte und saubere Isolation ermöglichte, wurden nicht genauer mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert.

Zur Auswertung der NMR-Spektren wurde die Software *MestReNova* von *Mestrelab Research S.L.K* in der zu dem Zeitpunkt aktuellen Version verwendet. Die angegebenen Nummerierungen sowie die Nomenklatur der untersuchten Verbindungen sind zum einfacheren Verständnis nicht zwangsläufig im Einklang mit IUPAC. Um unerwünschten Reaktionen der zu untersuchenden Substanzen mit möglichen Säureresten in halogenierten Lösemitteln vorzubeugen, wurde in das Lösemittelbehältnis etwas basisches Aluminiumoxid gegeben. Im Falle, dass die Menge des isolierten Produkts nicht für ein  $^{13}\text{C}$ -NMR mit einem hohen Signal-zu-Rausch Verhältnis ausreichend war, wurden 2D-NMR Spektren (HSQC, HMBC) verwendet, um die  $^{13}\text{C}$ -Signale zu detektieren und zuzuordnen. Bei Produkten, welche sich aus zwei Enantiomeren oder mehreren Diastereomeren zusammensetzten oder deren Aufreinigung keine Isolation einzelner Isomere ermöglichte, wurden Vollzuordnung mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt.

### **High-resolution mass spectrometry (HRMS):**

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

### **Matrix-assisted LASER desorption/ionization (MALDI):**

Massenspektren von Molekülen mit hohem Molekulargewicht, insbesondere Oligonukleotiden, wurden mittels MALDI-TOF an einem *autoflex maX* der Firma *Bruker* im linearen Negativ-Modus aufgenommen, zum Einsatz kam eine Matrix auf Basis von 3-Hydroxypicolinsäure (HPA).

### **Low-resolution mass spectrometry (LRMS):**

Niedrigaufgelöste Massenspektren wurden an einem *DIONEX UltiMate 3000* HPLC-System (Pumpe, Autosampler, Säulenkompartiment und *diode array detector*) und einem ESI-MS basierten *MSQ Plus single-quadrupole mass spectrometer* der Firma *Thermo Fisher* aufgenommen, welches Direkt- und säulenchromatographische RP-Methoden mittels einer *Hypersil Gold C18* Selektivitätssäule (100 × 2.1 mm) ermöglichte.

### **Infrared (IR) Spektroskopie:**

IR-Spektren wurden an einem *Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR* oder an einem *Shimadzu IR Spirit* mit *Attenuated Total Reflection (ATR)* Messkopf aufgenommen. Vor der Durchführung der Messreihen wurde zunächst eine Hintergrundsignalmessung durchgeführt. Reine Proben wurden ohne weitere Präparation direkt auf den Probenkopf aufgetragen. Für sehr geringe Stoffmengen wurde die Substanz in einem geeigneten, schnell verdampfenden Lösemittel gelöst und so schichtweise aufgetragen. Der Analysebereich lag zwischen  $4500\text{ cm}^{-1}$  und  $600\text{ cm}^{-1}$ . Die relative Intensität der Signale wurde mit s (stark), m (medium), und w (*weak*; schwach) konkretisiert.

### **Ultraviolet-visible (UV-VIS) Spektroskopie:**

UV-VIS Spektren wurden an einem *JASCO V-650* Spektroskop gemessen. Bei sehr kleinen Volumina wurde ein *Implen NanoPhotometer 60* verwendet. Vor der Durchführung der Messreihen wurde zunächst eine Hintergrundsignalmessung des verwendeten Lösemittels aufgenommen und abgezogen. Daten der Messpunkte wurden in 4 Replikaten erfasst und unter Ausschluss von Ausreißern gemittelt.

### **Circular dichroism (CD) Spektroskopie:**

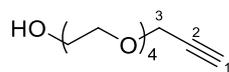
CD-Spektren zur Untersuchung von Oligonukleotiden wurden an einem *JASCO J-810* Spektroskop im Bereich von 220 bis 310 nm in Abständen von 0.5 nm aufgenommen. Dabei wurde vor der Durchführung der Messreihen eine Hintergrundsignalmessung des verwendeten Lösemittels durchgeführt und abgezogen. Die Oligonukleotide wurden jeweils in wässriger 0.15 M LiCl- oder KCl-Lösungen gelöst (Endkonzentration der Oligonukleotide 10 nmoL/mL). Die Messungen wurden dreifach in technischen Replikaten ausgeführt. Anschließend wurden in Origin 6.0 Polynomfunktionen 9. Grades anhand der Messpunkte berechnet.

### **Melting point / decomposition point (MP / DP):**

Unkorrigierte Schmelzpunkte und/oder Zersetzungspunkte wurden an einem *EZ-Melt* Gerät von *Stanford Research Systems* gemessen.

## 5.2 Experimentelle Vorschriften zu PROTAC-Bausteinen

### 1-Propargyltetraethylglykol (**31a**)



Die Synthese von Derivaten mit anderen Mengen der Wiederholungseinheiten ist grundsätzlich bei gleichbleibenden Verhältnissen der Reaktanden und Lösemitteln möglich. Jedoch ergaben Untersuchungen, dass sich die Anzahl an Wiederholungseinheiten maßgeblich auf Ausbeuten und Trennleistung mittels Säulenchromatographie auswirken – weswegen der Fokus hier, nebst diesen Erkenntnissen, auf der statistisch optimalen Länge von 4 Wiederholungseinheiten gelegt worden ist.

Zu einer Lösung von Tetraethylglykol (**30**, 0.77 mL, 1.13 g/mL, 4.50 mmol, 1.50 Äq) in trockenem THF (45 mL) wurde unter Argonatmosphäre bei 0 °C Natriumhydrid (60% Dispersion in Mineralöl, 0.16 g, 3.90 mmol, 1.30 Äq) portionsweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde nach vollständiger Zugabe bei 0 °C für 15 min und dann bei Raumtemperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde Propargylbromid (80%-ige Lösung in Toluol, 0.32 mL, 1.38 g/mL, 3.00 mmol, 1.00 Äq) tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die resultierende Suspension wurde über Kieselgur filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck vom Filtrat entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (50 mL) aufgenommen und mit gesättigter, wässriger NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (30 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde nochmal mit DCM (50 mL) gewaschen, die organischen Phasen kombiniert und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silikagel, *i*Hex:EtOAc = 1:1 → 0:1) aufgereinigt. Das Produkt **31a** (0.67 g, 2.88 mmol, 96%) wurde als leicht gelbliches Öl erhalten.

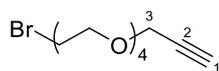
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 4.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H<sub>a/b</sub><sup>3</sup>), 3.73–3.59 (m, 16H, CH<sub>2</sub>), 2.69 (s, 1H, HO), 2.43 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H<sup>1</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 79.7, 77.4, 74.7, 72.7, 70.8, 70.7, 70.7, 70.5, 70.4, 69.2, 61.9, 58.5.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z* = 233.13844 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 233.13835).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3442 (vw), 3246 (w), 2866 (w), 2359 (vw), 2167 (vw), 2111 (vw), 1652 (vw), 1456 (w), 1349 (w), 1287 (w), 1249 (w), 1091 (s), 1032 (m), 921 (w), 885 (w), 841 (w), 667 (w).

**R<sub>f</sub> (EtOAc):** 0.20 (ANIS).

**16-Bromo-1-propargyltetraethylglycol (32a)**

Zu einer Lösung von **31a** (1.74 g, 7.50 mmol, 1.00 Äq) in trockenem DCM (75 mL) wurde unter Argonatmosphäre Triphenylphosphin (2.95 g, 11.3 mmol, 1.50 Äq) bei 0 °C zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 0 °C für 15 min gerührt. Anschließend wurde Tetrabrommethan (3.73 g, 11.3 mmol, 1.50 Äq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 0 °C für 30 min und anschließend bei Raumtemperatur für weitere 2 h gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Silikagel, DCM:MeOH = 199:1 → 4:1) aufgereinigt. Das Produkt **32a** (2.20 g, 7.50 mmol, quantitativ) wurde als rotbraunes Öl erhalten.

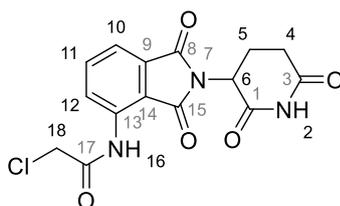
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 4.21 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 2H, H<sup>3</sup>), 3.81 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 3.70 – 3.66 (m, 12H), 3.48 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 2.43 (t,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, H<sup>1</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 79.8, 74.7, 71.3, 70.8, 70.8, 70.8, 70.7, 70.7, 70.6, 69.3, 58.6, 30.5.

**LRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 295.1 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub><sup>79</sup>Br<sup>+</sup>: 295.1)  
 $m/z$  = 297.1 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub><sup>81</sup>Br<sup>+</sup>: 297.1)

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3250 (vw), 2919 (m), 2854 (m), 2112 (vw), 1737 (vw), 1460 (w), 1349 (m), 1277 (m), 1246 (m), 1094 (vs), 1033 (s), 919 (m), 878 (m), 840 (m), 662 (s).

**R<sub>f</sub> (iHex:EtOAc = 1:1):** 0.56 (ANIS).

**POM-chloracetylchlorid (53a)**

Die Synthese von Derivaten dieser Substanz mit unterschiedlich langen Säurechloriden ist bei gleichbleibenden Verhältnissen der Reaktanden und Lösemitteln möglich.

Zu einer Lösung von Pomalidomid (**52**, 100 mg, 366  $\mu\text{mol}$ , 1.00 Äq) in trockenem THF (6 mL) wurde unter Inertgasatmosphäre Chloroacetylchlorid (100  $\mu\text{L}$ , 1.42 g/mL 1.26 mmol, 3.50 Äq) bei Raumtemperatur tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 60 °C unter Rückfluss für 90 min gerührt, anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in wenig Diethylether suspendiert, Ultraschall ausgesetzt und abfiltriert. Der Feststoff wurde zweimal mit Diethylether (2 x 2 mL) gewaschen. Das Produkt **53a** (118 mg, 337  $\mu\text{mol}$ , 92%) wurde als beiger Feststoff erhalten.

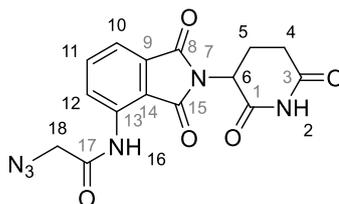
**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  [ppm] = 11.17 (s, 1H, NH<sup>2</sup>), 10.31 (s, 1H, NH<sup>16</sup>), 8.54 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H<sup>12</sup>), 7.89 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H<sup>11</sup>), 7.69 (d, J = 7.3 Hz, 1H, H<sup>10</sup>), 5.17 (dd, J = 12.8, 5.4 Hz, 1H, H<sup>6</sup>), 4.54 (s, 2H, H<sup>18a,b</sup>), 2.89 (ddd, J = 16.9, 13.8, 5.4 Hz, 1H), 2.71 – 2.53 (m, 2H), 2.11 – 2.03 (m, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  [ppm] = 173.2, 170.2, 168.3, 167.1, 166.2, 136.9, 136.1, 132.0, 126.1, 119.5, 117.8, 49.4, 43.6, 31.4, 22.4.

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** m/z = 348.03941 [M-H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>-</sup>: 348.03927).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3249 (vw), 2864 (w), 2360 (vw), 2112 (vw), 1652 (vw), 1456 (w), 1348 (w), 1227 (w), 1248 (w), 1092 (s), 1032 (m), 920 (w), 879 (w), 841 (w), 667 (m)

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 19:1):** 0.59 (UV).

**POM-acetylazid (54a)**

Zu einer Lösung von **53a** (40.0 mg, 114  $\mu\text{mol}$ , 1.00  $\text{\AA}q$ ) in trockenem THF (10 mL) wurde unter Inertgasatmosphäre bei Raumtemperatur Natriumiodid (95.0 mg, 634  $\mu\text{mol}$ , 5.50  $\text{\AA}q$ ) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 5 min gerührt. Nach vollständigem Lösen wurde anschließend Natriumazid (110 mg, 1.70 mmol, 15.0  $\text{\AA}q$ ) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 60 °C unter Rückfluss für 18 h gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen (10 mL). Die organische Phase wurde mit Wasser (10 mL) gewaschen, anschließend wurde die wässrige Phase dreimal mit DCM (3 x 10 mL) gewaschen. Die kombinierten Organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Das Produkt **54a** (41.0 mg, 114  $\mu\text{mol}$ , 100%) wurde als gelber Feststoff erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):**  $\delta$  [ppm] = 11.17 (s, 1H,  $\text{NH}^2$ ), 10.13 (s, 1H,  $\text{NH}^{16}$ ), 8.52 (d,  $J = 8.4$ , 1H,  $\text{H}^{12}$ ), 7.87 (dd,  $J = 8.4, 7.3$ , 1H,  $\text{H}^{11}$ ), 7.67 (d,  $J = 7.2$ , 1H,  $\text{H}^{10}$ ), 5.17 (dd,  $J = 12.8, 5.4$ , 1H,  $\text{H}^{6*}$ ), 4.33 (s, 2H,  $\text{H}_{a/b}^{18}$ ), 2.89 (ddd,  $J = 15.7, 13.5, 5.4$ , 1H), 2.63 (d,  $J = 3.4$ , 1H), 2.57 (d,  $J = 12.4$ , 1H), 2.14 – 2.03 (m, 2H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):**  $\delta$  [ppm] = 173.3, 170.3, 167.6, 136.1, 132.0, 126.4, 119.4, 117.8, 52.3, 49.4, 31.4, 30.9.

**HRMS ( $\text{ESI}^-$ ):**  $m/z = 355.07978$  [ $\text{M-H}$ ] $^-$  (calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_6\text{O}_5^-$ : 355.07964).

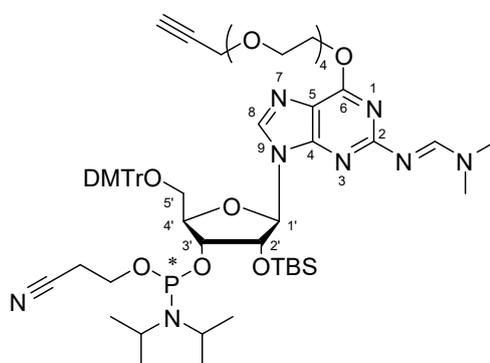
**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3249 (vw), 2864 (w), 2360 (vw), 2112 (vw), 1652 (vw), 1456 (w), 1348 (w), 1227 (w), 1248 (w), 1092 (s), 1032 (m), 920 (w), 879 (w), 841 (w), 667 (m)

**$R_f$  ( $i\text{Hex}:\text{EtOAc} = 1:1$ ):** 0.47 (ANIS).

## 5.3 Experimentelle Vorschriften zu STING-PROTACs

### 5.3.1 Synthese von O<sup>6</sup>-modifiziertem 3',3'-c-di-GMP

#### N<sup>2</sup>-DMF-5'-ODMTr-2'-OTBS-O<sup>6</sup>-Linker-Guanosin-phosphoramidit (**34**)



Zu einer Lösung von rG<sup>dmf</sup>-CE-PA (**33**, 1.00g, 1.05 mmol, 1.00 Äq) in trockenem 1,4-Dioxan (10 mL) wurde PPh<sub>3</sub> (412 mg, 1.57 mmol, 1.50 Äq), welches zuvor mit Toluol (je 100 mL) co-evaporiert wurde, zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde drei Vakuumzyklen unterworfen, anschließend wurde (243 mg, 1.05 mmol, 1.00 Äq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt und nach 5 min wurde zu der nun dickflüssigen Reaktionsmischung DEAD (40% in Toluol, 760 µL, 1.57 mmol, 1.50 Äq) langsam tropfenweise zugegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt und bei ebendieser Temperatur über Nacht gerührt. Die nun orangene Reaktionsmischung wurde unter verminderten Druck eingengt und mittels Säulenchromatographie (Silikagel, HPLC-grade Lösemittel + 0.1% Pyridin, *i*Hex:EtOAc = 1:1 → 0:1, dann EtOAc:MeOH = 1:0 → 4:1) aufgereinigt. Es wurde **34** als gelber Schaum in einem Diastereomergemisch von 2 Diastereomeren erhalten (1.21 g, 1.04 mmol, 99%).

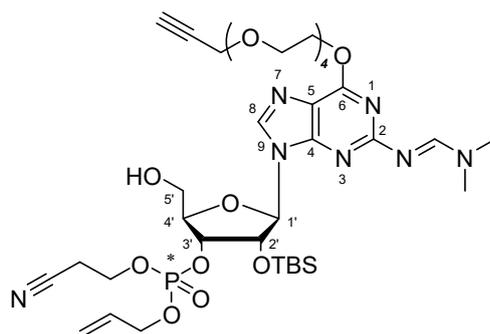
<sup>31</sup>P-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 150.4, 149.7.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 1169.5942 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>60</sub>H<sub>86</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>PSi<sup>+</sup>: 1169.5867).

LRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 1169.2 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>60</sub>H<sub>86</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>PSi<sup>+</sup>: 1169.6).

FT-IR (ATR, Film):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2931 (w), 1699 (m), 1628 (s), 1608 (m), 1575 (w), 1530 (m), 1493 (s), 1417 (m), 1348 (m), 1249 (s), 1201 (m), 1177 (s), 1099 (s), 1030 (s), 834 (s), 782 (s), 727 (m), 703 (m), 644 (m), 583 (m), 411 (w).

R<sub>f</sub> (EtOAc): 0.29 (ANIS).

**N<sup>2</sup>-DMF-5'-OH-2'-OTBS-O<sup>6</sup>-LinkerGuanosin-phosphat (43)**

**34** (1.30 g, 1.11 mmol, 1.00 Äq) wurde jeweils zweimal mit trockenem Pyridin, Toluol und Acetonitril (je 30 mL) co-evaporiert, unter Hochvakuum getrocknet und in trockenem Acetonitril gelöst (15 mL). Unter Argonatmosphäre wurde Allylkohol (378  $\mu$ L, 854 mg/mL, 5.56 mmol, 5.00 Äq) und BTT-Aktivator (300 mM in MeCN, 7.41 mL, 2.22 mmol, 2.00 Äq) zur Reaktionsmischung gegeben. Nach 90 min wurde TBHP (5.00 M in Decan, 667  $\mu$ L, 3.33 mmol, 3.00 Äq) zugegeben. Nach 30 min wurde das überschüssige TBHP bei 0 °C mit einer wässrigen NaHSO<sub>3</sub>-Lösung (500 mg/mL, 1.40 mL, 6.66 mmol, 6.00 Äq) gequentscht. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde unter vermindertem Druck eingengt, mit EtOAc (400 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (300 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit EtOAc (3  $\times$  400 mL) gewaschen, die kombinierten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (20 mL) und H<sub>2</sub>O (200  $\mu$ L) aufgenommen und DCA-Lösung (6% v/v in DCM, 20 mL) wurde zugegeben. Nach 15 min wurde die rote Reaktionsmischung bei Raumtemperatur mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (200 mL) gequentscht. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (400 mL) und Wasser (100 mL) verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2  $\times$  400 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 99:1  $\rightarrow$  19:1) aufgereinigt und es wurde **43** als gelber Schaum in einem Diastereomerenmischung von 2 Diastereomeren erhalten (785 mg, 822  $\mu$ mol, 88%).

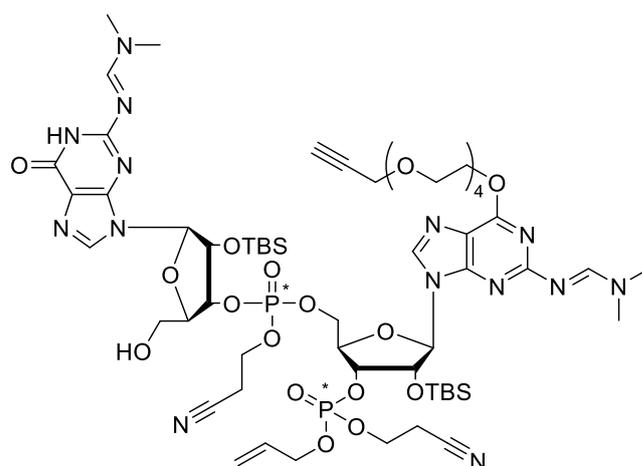
**<sup>31</sup>P-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = -1.36, -2.45.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 840.3772 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>60</sub>H<sub>86</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>PSi<sup>+</sup>: 840.3723).

**LRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 840.6 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>59</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>PSi<sup>+</sup>: 840.4).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2929 (w), 2858 (w), 2361 (w), 1690 (m), 1630 (m), 1575 (w), 1559 (w), 1532 (m), 1491 (s), 1457 (m), 1418 (m), 1368 (m), 1348 (m), 1249 (s), 1224 (m), 1204 (m), 1095 (s), 1029 (s), 1003 (s), 960 (m), 921 (m), 858 (m), 836 (s), 782 (s), 743 (m), 700 (m), 644 (m), 563 (m), 550 (m), 500 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 19:1):** 0.50 (ANIS).

Lineares 3',5'-N<sup>2</sup>-dmf<sup>2</sup>Guanosin-O<sup>6</sup>-Linker<sup>2</sup>Guanosin-3'-(allyl,cyanoethyl)phosphat (45)

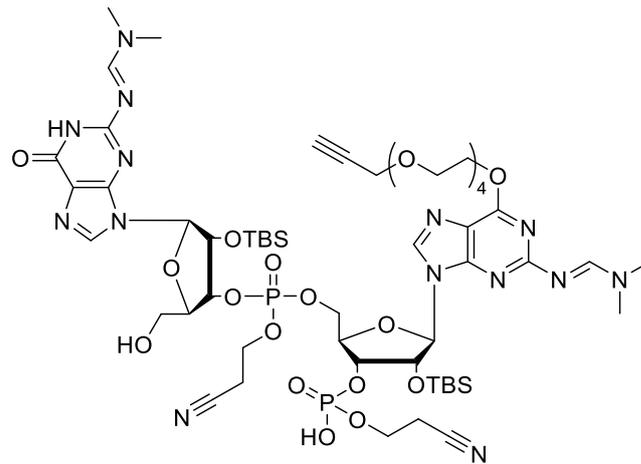
**43** (1.00 g, 1.19 mmol, 1.45 Äq) wurde jeweils zweimal mit trockenem Pyridin, Toluol und Acetonitril (je 30 mL) co-evaporiert, unter Hochvakuum getrocknet und in trockenem Acetonitril gelöst (10 mL). Unter Argonatmosphäre wurde **33** (785 mg, 822  $\mu$ mol, 1.00 Äq), gelöst in MeCN (5 mL), und BTT-Aktivator (300 mM in MeCN, 5.50 mL, 1.64 mmol, 2.00 Äq) zur Reaktionsmischung gegeben. Nach 90 min wurde TBHP (5.00 M in Decan, 493  $\mu$ L, 2.47 mmol, 3.00 Äq) zugegeben. Nach 30 min wurde das überschüssige TBHP bei 0 °C mit einer wässrigen NaHSO<sub>3</sub>-Lösung (500 mg/mL, 1.50 mL, 6.66 mmol, 6.00 Äq) gequentscht. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde unter vermindertem Druck eingengt, mit EtOAc (300 mL) verdünnt und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (200 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit EtOAc (3  $\times$  300 mL) gewaschen, die kombinierten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (20 mL) und H<sub>2</sub>O (200  $\mu$ L) aufgenommen und DCA-Lösung (6% v/v in DCM, 20 mL) wurde zugegeben. Nach 15 min wurde die rote Reaktionsmischung bei Raumtemperatur mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (200 mL) gequentscht. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (400 mL) und Wasser (100 mL) verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (4  $\times$  400 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 99:1  $\rightarrow$  9:1) aufgereinigt und es wurde **45** als gelber Schaum in einem Diastereomeregemisch von 4 Diastereomeren erhalten (770 mg, 546  $\mu$ mol, 66%).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.71, 0.55, 0.01, -0.12.

LRMS (ESI<sup>+</sup>): m/z = 1407.9 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>58</sub>H<sub>93</sub>N<sub>14</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup>: 1407.6).  
m/z = 704.7 [M+2H]<sup>2+</sup> (calcd. for C<sub>58</sub>H<sub>94</sub>N<sub>14</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>Si<sub>2</sub><sup>2+</sup>: 704.8).

FT-IR (ATR, Film):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2953 (w), 2929 (w), 2855 (w), 2361 (w), 1735 (m), 1684 (m), 1653 (m), 1631 (s), 1558 (m), 1540 (m), 1523 (s), 1496 (m), 1472 (m), 1464 (m), 1420 (m), 1348 (m), 1249 (s), 1155 (m), 1115 (m), 1094 (m), 1030 (s), 1005 (s), 836 (s), 782 (s), 744 (m), 703 (m), 668 (m), 641 (m), 559 (s), 491 (m).

**$R_f$  (DCM:MeOH = 19:1): 0.57 (ANIS).**

**Lineares 3',5'-N<sup>2</sup>-dmf-Guanosin-O<sup>6</sup>-Linker-Guanosin-3'-cyanoethyl-phosphat (46)**

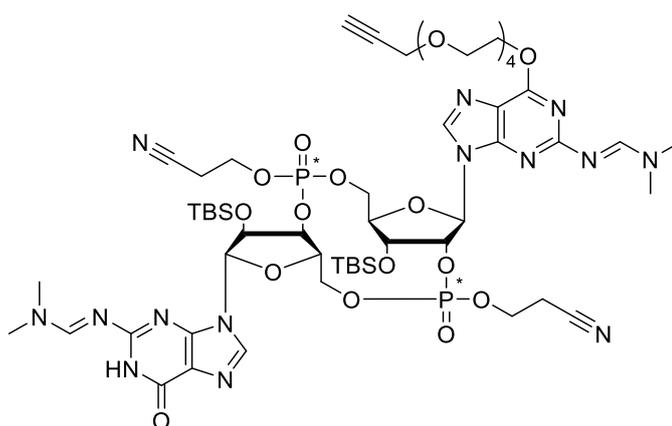
Zu einer Lösung von **45** (750 mg, 533  $\mu\text{mol}$ , 1.00 Äq) in trockenem Aceton (60 mL) wurde NaI (800 mg, 5.33 mmol, 10.0 Äq) bei Raumtemperatur hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 4 h bei 56 °C gerührt. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 99:1  $\rightarrow$  4:1) aufgereinigt. Es wurde **46** als gelber Schaum in einem Diastereomergemisch aus 2 Diastereomeren erhalten (627 mg, 458  $\mu\text{mol}$ , 86%).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.44, -0.01, -0.30.

LRMS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  = 1366.0 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>55</sub>H<sub>87</sub>N<sub>14</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>Si<sub>2</sub><sup>-</sup>: 1366.5).

FT-IR (ATR, Film):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3482 (m), 3420 (m), 3210 (w), 2929 (w), 2857 (w), 2361 (w), 1676 (w), 1622 (m), 1607 (m), 1559 (w), 1541 (m), 1507 (w), 1473 (w), 1457 (w), 1418 (w), 1374 (m), 1347 (m), 1249 (w), 1114 (m), 1058 (m), 941 (w), 892 (w), 838 (m), 785 (m), 687 (w), 668 (w), 569 (s), 432 (s),

R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 19:1): 0.07 (ANIS).

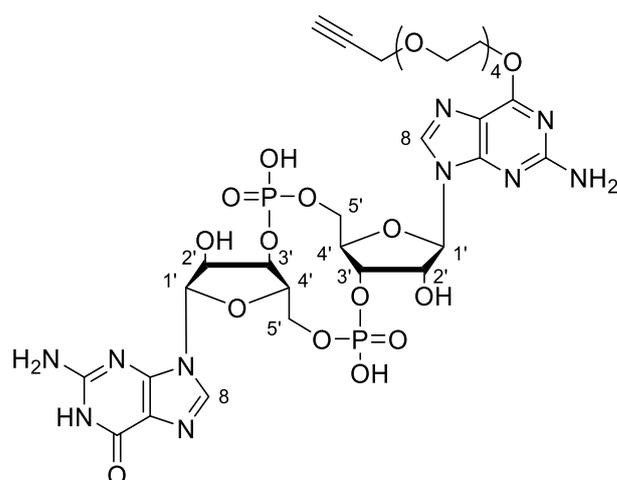
**Geschütztes zyklisches 2',3'-C8S<sup>Linker</sup>Guanosin-N6<sup>Bz</sup>Adenosin-phosphat (47)**

**46** (500 mg, 366  $\mu\text{mol}$ , 1.00  $\text{\AA}q$ ) wurde dreimal mit trockenem Pyridin (je 50 mL) co-evaporiert, am Hochvakuum getrocknet und in Pyridin angelöst (150 mL). MSNT (542 mg, 1.83 mmol, 5.00  $\text{\AA}q$ ) wurde unter Argonatmosphäre zur Reaktionsmischung zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und anschließend mit Acetonitril co-evaporiert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 49:1  $\rightarrow$  4:1) aufgereinigt und es wurde **47** als gelber Feststoff in einem Diastereomergemisch aus 4 Diastereomeren erhalten (520 mg, 90%). Das Diastereomergemisch wurde nicht aufgetrennt, da es keinen Einfluss auf die nachfolgende Synthese hat, und direkt weiterverwendet.

**LRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 1350.1$  [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>55</sub>H<sub>87</sub>N<sub>14</sub>O<sub>18</sub>P<sub>2</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup>: 1350.5).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2929 (w), 2853 (w), 2837 (w), 2361 (w), 1700 (m), 1684 (m), 1607 (m), 1571 (m), 1559 (m), 1507 (s), 1459 (m), 1446 (m), 1418 (w), 1362 (w), 1299 (m), 1247 (s), 1157 (m), 1094 (m), 1030 (s), 901 (w), 828 (s), 790 (m), 754 (m), 726 (m), 701 (s), 668 (m), 637 (m), 585 (s), 530 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 9:1):** 0.47 (ANIS).

**c-di-GMP-O<sup>64</sup> (48)**

**47** (500 mg, 707  $\mu\text{mol}$ ) wurde unter Argonatmosphäre in einer Lösung von Methylamin in absolutem EtOH (33%, 40 mL) gelöst und die Reaktionsmischung wurde für 3.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand zweimal mit Pyridin co-evaporiert und unter Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in Pyridin gelöst (5 mL), in ein Plastikgefäß transferiert und mit trockenem TEA (5 mL) verdünnt. Zur Reaktionsmischung wurde TREAT-HF (3 mL) gegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges HF wurde mit TMSOMe (3 mL) gequench, das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt, aufgenommen in wenig MeOH, aus kaltem absolutem Aceton präzipitiert. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand abdekantiert und das Rohprodukt mittels RP-HPLC aufgereinigt (TFA, 0–25% B über 45 min @1 mL/min). **48** wurde nach Lyophilisieren als weißer Feststoff erhalten (20 mg, 22.3  $\mu\text{mol}$ , 3%).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  [ppm] = 8.25 (s, 1H, H<sup>8</sup>), 7.97 (s, 1H, H<sup>8</sup>), 5.77 (s, 1H, H<sup>1'</sup>), 5.66 (s, 1H, H<sup>1'</sup>), 5.16 (ddd,  $J$  = 9.3, 7.3, 4.1 Hz, 1H, H<sup>3'</sup>), 5.09 (ddd,  $J$  = 7.7, 7.1, 4.7 Hz, 1H, H<sup>3'</sup>), 4.81 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 1H, H<sup>2'</sup>), 4.76 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H, H<sup>2'</sup>), 4.41 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, H<sup>4'</sup>), 4.35 – 4.25 (m, 3H, H<sup>4'</sup>, H<sup>5ab'</sup>), 4.15 (dq,  $J$  = 10.9, 3.3 Hz, 1H), 4.06 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.98 – 3.88 (m, 2H, H<sup>5ab'</sup>), 3.80 – 3.36 (m, 14H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 2.72 (t,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  [ppm] = 155.7 (Ar), 155.0 (Ar), 154.7 (Ar), 152.8 (Ar), 147.2 (Ar), 136.3 (C<sup>8</sup>), 134.1 (C<sup>8</sup>), 113.0 (Ar), 109.8 (Ar), 91.4 (C<sup>1'</sup>), 90.8 (C<sup>1'</sup>), 81.0 (C<sup>4'</sup>), 80.5 (C<sup>4'</sup>), 79.1 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 75.8 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 73.1 (C<sup>2'</sup>), 72.7 (C<sup>2'</sup>), 69.8 (C<sup>3'</sup>), 69.7 (C<sup>3'</sup>), 69.4 ((C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 69.4 ((C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 69.2 ((C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 68.5 ((C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 67.9, 62.3 (C<sup>5'</sup>), 61.9 (C<sup>5'</sup>), 57.8 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 42.1.

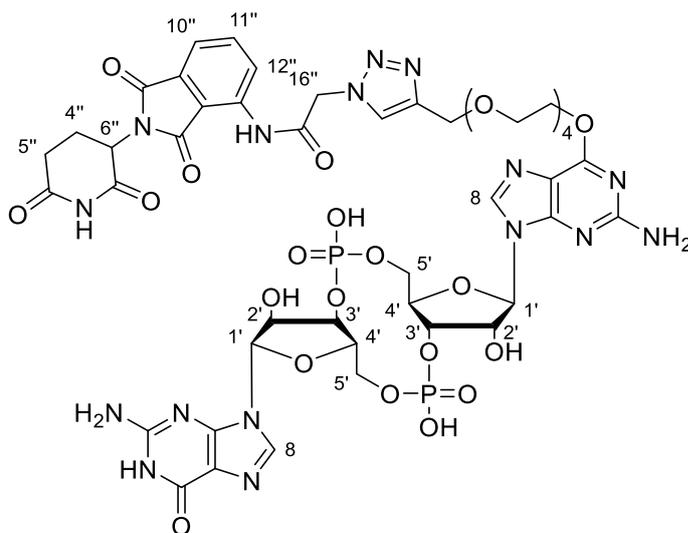
**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  [ppm] = -1.36, -2.45.

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):**  $m/z$  = 903.20834 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>10</sub>O<sub>18</sub>P<sub>2</sub><sup>-</sup>: 903.207).  
 $m/z$  = 451.10059 [M-2H]<sup>2-</sup> (calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>N<sub>10</sub>O<sub>18</sub>P<sub>2</sub><sup>2-</sup>: 451.0999).

**R<sub>t</sub> (TEAA, 0–25% B über 45 min, 5 mL/min):** 22.4 min.

*Synthese von c-di-GMP-O<sup>6</sup>4 (48) über H-Phosphonat-Eintopfreaktion:*

Unter Argonatmosphäre wurden PyrTFA (107 mg, 550  $\mu\text{mol}$ , 1.20  $\text{\AA}$ q) und H<sub>2</sub>O (17.0  $\mu\text{L}$ , 0.94  $\mu\text{mol}$ , 2.00  $\text{\AA}$ q) zu einer Lösung von **34** (540 mg, 460  $\mu\text{mol}$ , 1.00  $\text{\AA}$ q) in trockenem MeCN (4 mL) gegeben. Nach 1 min wurde tBuNH<sub>2</sub> zur Reaktionsmischung gegeben. Nach 10 min wurde die Reaktionsmischung eingengt und mit MeCN (3  $\times$  5 mL) co-evaporiert. Anschließend wurde der Rückstand in DCM (5.5 mL) aufgenommen, DCA (6% in DCM, 5.5 mL, 4.00 mmol, 8.70  $\text{\AA}$ q) und H<sub>2</sub>O (83.0  $\mu\text{L}$ , 4.60  $\mu\text{mol}$ , 10.0  $\text{\AA}$ q) wurden zur Reaktionsmischung gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Die nun rote Reaktionsmischung wurde mit Pyridin (0.66 mL) gequentscht und anschließend eingengt und mit MeCN (3  $\times$  5 mL) co-evaporiert). Das so erhaltene H-Phosphonat **49\*** wurde in trockenem MeCN (1 mL) aufgenommen, mit rG<sup>(dmf)</sup>-CE-PA (**33**, 570 mg in 3 mL MeCN, 600  $\mu\text{mol}$ , 1.30  $\text{\AA}$ q) versetzt und für 2 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde TBHP (5.00 M in Dekan, 250  $\mu\text{L}$ , 1.38  $\mu\text{mol}$ , 3.00  $\text{\AA}$ q) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde bei 0 °C wässrige NaHSO<sub>3</sub>-Lsg. (500 mg/mL, 600 mg in 1.20 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei ebendieser Temperatur für 10 min und anschließend bei Raumtemperatur für weitere 5 min gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung eingengt und der Rückstand wurde in DCM (7.4 mL) aufgenommen. DCA (6% in DCM, 7.4 mL, 4.00 mmol, 8.70  $\text{\AA}$ q) und H<sub>2</sub>O (83.0  $\mu\text{L}$ , 4.60  $\mu\text{mol}$ , 10.0  $\text{\AA}$ q) wurden zur Reaktionsmischung gegeben und die Reaktionsmischung wurde für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Die nun rote Reaktionsmischung wurde mit Pyridin (0.66 mL) gequentscht, unter vermindertem Druck eingengt und mit Pyridin (15 mL) nochmals co-evaporiert. Das so erhaltene lineare Dinukleotid **50\*** wurde in Pyridin (8mL) aufgenommen und DMOCP (303 mg, 1.60 mmol, 3.50  $\text{\AA}$ q) wurde zugegeben. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurden H<sub>2</sub>O (294  $\mu\text{L}$ , 16.3 mmol, 35.0  $\text{\AA}$ q) und I<sub>2</sub> (152 mg, 600  $\mu\text{mol}$ , 1.30  $\text{\AA}$ q) zugegeben und die braune Reaktionsmischung wurde für 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in eine wässrige NaHSO<sub>3</sub>-Lsg. (1.40 g/mL, 102 g in 72 mL) geschüttet, für 5 min gerührt und anschließend NaHCO<sub>3</sub> (1.83 g) als Feststoff vorsichtig zugegeben. Nach weiteren 5 min Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit einer 1:1 Mischung aus EtOAc und Et<sub>2</sub>O dreimal (v/v, 3  $\times$  60 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden eingengt und nochmals dreifach mit EtOAc (3  $\times$  5 mL) co-evaporiert. Das so erhaltene zyklische Dinukleotid **51\*** wurde in MeCN (2.5 mL) aufgenommen und mit tBuNH<sub>2</sub> (2.5 mL) versetzt, nach 10 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung eingengt, mit MeCN co-evaporiert (3  $\times$  3 mL) und anschließend in MeNH<sub>2</sub> (33% in absolutem EtOH, 50 mL) aufgenommen. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 90 min gerührt, eingengt und mit einer 2:1-Mischung aus Pyridin und NEt<sub>3</sub> (v/v, 3  $\times$  3 mL) co-evaporiert. Der Rückstand wurde in Pyridin (2 mL) und NEt<sub>3</sub> (7 mL) aufgenommen, auf 50 °C erhitzt und mit TREAT-HF (4.5 mL, 27.5 mmol, 60.0  $\text{\AA}$ q) versetzt und bei ebendieser Temperatur für 3 h gerührt. Nach abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung langsam mit Aceton und TMSOMe (je 15 mL) versetzt. Sowohl der entstandene Niederschlag als auch der Überstände wurden mittels RP-HPLC aufgereinigt (TFA, 0–25% B über 45 min @1 mL/min). **48** (16.6 mg, 18.4  $\mu\text{mol}$ , 4%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**c-di-GMP-O<sup>6</sup>4-POM (CDG-O<sup>6</sup>4-POM, 55)**

Die folgende Reaktion wurde unter Argonatmosphäre durchgeführt, alle Lösungen wurden vor der Verwendung frisch hergestellt und entgast und der Reaktionsfortschritt mittels RP-LCMS kontrolliert. In einem Mikroreaktionsgefäß wurde zu **48** (11.3 mg, 11.9  $\mu\text{mol}$ , 1.00 Äq) und THPTA (25.9 mg, 59.6  $\mu\text{mol}$ , 5.00 Äq) eine Lösung von **54a** (8.49 mg, 23.8  $\mu\text{mol}$ , 2.00 Äq) in DMSO (600  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Weiteres DMSO (600  $\mu\text{L}$ ) und Reinstwasser (400  $\mu\text{L}$ ) wurden zugegeben, anschließend wurde wässrige  $\text{CuSO}_4$ -Lsg. (100 mM, 119  $\mu\text{L}$ , 11.9  $\mu\text{mol}$ , 1.00 Äq) zugegeben. Nach vollständiger Vermischung wurde zur blauen Reaktionsmischung wässrige NaAsc-Lsg. (1.00 M, 95.3  $\mu\text{L}$ , 8.00 Äq) zugegeben. Die gelbe Reaktionsmischung wurde bei 30 °C gerührt, bis kein Startmaterial mehr gefunden wurde (ca. 3 h). Nach Verdünnen und Gefriertrocknen, wurde das Rohprodukt mittels RP-HPLC aufgereinigt (TFA, 0–50% B über 45 min @1 mL/min). **55** wurde als weißer Feststoff erhalten (4 mg, 10.7  $\mu\text{mol}$ , 26%).

**<sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  [ppm] = 8.39 (s, 1H, H<sup>8</sup>), 8.18 (s, 1H, H<sup>8</sup>), 8.12 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, H<sup>12''</sup>), 7.65 – 7.59 (m, 1H, H<sup>11''</sup>), 7.52 (dd,  $J$  = 7.2, 6.0 Hz, 1H, H<sup>10''</sup>), 5.87 (s, 1H, H<sup>1'</sup>), 5.62 (d,  $J$  = 13.1 Hz, 1H, H<sup>1'</sup>), 5.53 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, H<sup>16''</sup>), 5.16 (ddd,  $J$  = 13.0, 5.7, 2.2 Hz, 1H, H<sup>6''</sup>), 5.04 (s, 1H, H<sup>2'</sup>), 4.93 (t,  $J$  = 3.6 Hz, 1H, H<sup>3'</sup>), 4.79 – 4.74 (m, 2H, H<sup>3'</sup>), 4.73 (s, 2H), 4.51 (d,  $J$  = 9.6, 1H, H<sup>4'</sup>), 4.41 – 4.33 (m, 4H, H<sup>4'</sup>/H<sup>5'</sup>), 4.02 (s, 3H, H<sup>5'</sup>), 3.82 (dd,  $J$  = 12.5, 3.0 Hz, 1H, H<sup>5'</sup>), 3.77 – 3.72 (m, 2H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.72 – 3.65 (m, 3H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.65 – 3.58 (m, 11H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.19 (q,  $J$  = 7.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C=CH), 2.94 – 2.83 (m, 2H, H<sup>4''</sup>), 2.67 – 2.59 (m, 1H, H<sup>5''</sup>), 2.21 (dtt,  $J$  = 13.0, 5.4, 2.4 Hz, 1H, H<sup>5''</sup>), 1.27 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C=CH).

**<sup>13</sup>C-NMR (201 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  [ppm] = 175.7, 175.6, 175.6, 171.5, 171.4, 171.4, 168.0, 167.9, 167.9, 167.9, 166.3, 155.4, 155.1, 155.1, 154.9, 147.4, 146.9, 146.8, 144.4, 136.2, 135.9, 135.8, 134.4, 134.2, 131.1, 131.1, 126.5, 126.4, 119.9, 119.7, 117.7, 117.5, 111.6, 91.2, 90.9, 80.9, 80.6, 80.5, 73.2, 73.1, 72.7, 69.9, 69.9, 69.7, 69.6, 69.6, 69.5, 69.5, 69.4, 69.3, 69.3, 69.0, 68.0, 63.2, 63.1, 62.3, 62.0, 61.9, 61.4, 52.7, 52.7, 49.1, 49.1, 49.1, 49.0, 46.6, 42.7, 30.6, 30.6, 24.5, 21.9, 21.8, 19.2, 8.2.

**<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  [ppm] = 0.00, -0.03.

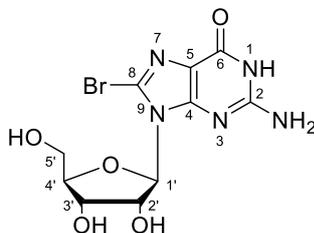
**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 1259.2960$  [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>53</sub>N<sub>16</sub>O<sub>23</sub>P<sub>2</sub><sup>-</sup>: 1259.2945).  
 $m/z = 629.14394$  [M-2H]<sup>2-</sup> (calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>52</sub>N<sub>16</sub>O<sub>23</sub>P<sub>2</sub><sup>2-</sup>: 629.14333).

**R<sub>t</sub> (TFA, 0–40% B über 45 min, 5 mL/min):** 38.0 min.

**ε (257 nm):** 25500 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### 5.3.2 Synthese von C<sup>8</sup>-modifiziertem 3',3'-c-di-GMP

#### 8-Bromoguanosin (56)



Zu einer Suspension von Guanosin (**6**, 2.82 g, 10.0 mmol, 1.00 Äq) in Wasser (70 mL) wurde elementares Brom (0.54 mL, 3.12 g/mL, 10.5 mmol, 1.05 Äq) gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die resultierende Suspension wurde filtriert und das Lösemittel des Filtrats mit NaHSO<sub>3</sub> gequentscht. Der Rückstand wurde mit eiskaltem Aceton (2 × 20 mL) und eiskaltem Wasser (2 × 20 mL) gewaschen. Anschließend wurde der Rückstand zweimal mit Aceton co-evaporiert und am Hochvakuum über Nacht getrocknet. Das Produkt **56** (3.10 g, 8.65 mmol, 86%) wurde als leicht rosafarbener amorpher Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 10.82 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 6.50 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.68 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H<sup>1</sup>), 5.46 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, OH<sup>2'</sup>), 5.10 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, OH<sup>3'</sup>), 5.01 (q, *J* = 6.1 Hz, 1H, H<sup>2'</sup>), 4.92 (dd, *J* = 6.7, 5.3 Hz, 1H, OH<sup>5'</sup>), 4.13 (td, *J* = 5.3, 3.3 Hz, 1H, H<sup>3'</sup>), 3.85 (td, *J* = 5.3, 3.3 Hz, 1H, H<sup>4'</sup>), 3.65 (dt, *J* = 11.8, 5.3 Hz, 1H, H<sub>a</sub><sup>5'</sup>), 3.56 – 3.45 (m, 1H, H<sub>b</sub><sup>5'</sup>).

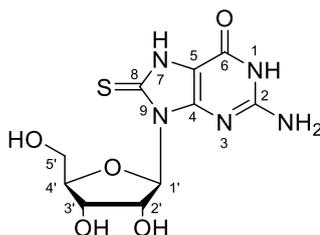
**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 155.5, 153.5, 152.1, 121.3, 117.5, 89.7 (C<sup>1</sup>), 85.9 (C<sup>4</sup>), 70.6 (C<sup>3'</sup>), 70.3 (C<sup>2'</sup>), 62.1 (C<sup>5'</sup>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z* = 362.00959 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub><sup>79</sup>BrN<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 362.01001).  
*m/z* = 364.00753 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub><sup>81</sup>BrN<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 364.01001).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3448 (w), 3326 (w), 3213 (w), 2914 (w), 1697 (m), 1634 (m), 1600 (m), 1568 (m), 1516 (m), 1481 (m), 1418 (w), 1349 (m), 1296 (m), 1282 (m), 1211 (w), 1121 (m), 1073 (m), 1047 (m), 986 (w), 905 (m), 867 (m), 779 (w), 751 (w), 696 (m), 659 (m).

**R<sub>f</sub>** (DCM:EtOAc = 4:1) = 0.54 (UV).

**MP:** 204.4 °C.

**8-Thioguanosin (57)**

Zu einer Suspension von **56** (3.10 g, 8.56 mmol, 1.00 Äq) in absolutem Ethanol (35 mL) wurde Thioharnstoff (1.30 g, 17.1 mmol, 2.00 Äq) gegeben und bei 85 °C über Nacht gerührt. Die Suspension wurde abfiltriert und der Rückstand wurde mit eiskaltem Wasser (2 × 20 mL) gewaschen. Anschließend wurde der Rückstand mit einer Mischung aus Methanol und Aceton (4:1, 50 mL) co-evaporiert. Das Produkt **57** (2.14 g, 6.79 mmol, 79%) wurde als leicht grauer amorpher Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 12.93 (s, 1H, NH<sup>7</sup>), 11.02 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 6.54 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.24 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H<sup>1</sup>), 5.26 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, OH<sup>2'</sup>), 4.95 (q, *J* = 5.8 Hz, 1H, H<sup>2'</sup>), 4.88 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, OH<sup>3'</sup>), 4.76 (dd, *J* = 6.6, 5.4 Hz, 1H, OH<sup>5'</sup>), 4.21 (td, *J* = 5.7, 4.4 Hz, 1H, H<sup>3'</sup>), 3.79 (dt, *J* = 6.1, 4.5 Hz, 1H, H<sup>4'</sup>), 3.65 (dt, *J* = 11.7, 5.0 Hz, 1H, H<sub>a</sub><sup>5'</sup>), 3.49 (dt, *J* = 12.2, 6.3 Hz, 1H, H<sub>b</sub><sup>5'</sup>).

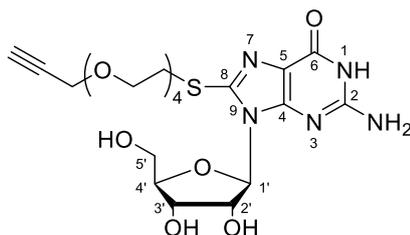
**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 155.5–152.1 (3 Signale: C<sup>2</sup>/C<sup>6</sup>/C<sup>8</sup>), 121.2–117.5 (2 Signale: C<sup>4</sup>/C<sup>5</sup>), 89.7 (C<sup>1</sup>), 85.9 (C<sup>4'</sup>), 70.5 (C<sup>3'</sup>), 70.3 (C<sup>2'</sup>), 62.0 (C<sup>5'</sup>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z* = 316.07123 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>32</sup>S<sup>+</sup>: 316.07156).  
*m/z* = 317.03611 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>33</sup>S<sup>+</sup>: 317.07492).  
*m/z* = 319.03406 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>34</sup>S<sup>+</sup>: 318.07072).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3361 (w), 3079 (w), 2927 (w), 1717 (m), 1634 (m), 1596 (m), 1538 (vw), 1489 (m), 1442 (w), 1360 (w), 1318 (w), 1247 (w), 1120 (w), 1076 (w), 1044 (w), 985 (vw), 924 (w), 907 (w), 856 (w), 763 (m), 744 (w), 689 (m), 667 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM:EtOAc = 4:1):** 0.54 (UV).

**MP:** 206.4 °C.

**8-(Propargyltetraethylenglykol)thioguanosin (58a)**

Zu einer Lösung von **57** (0.10 g, 0.32 mmol, 1.00 Äq) in trockenem DMF (45 mL) wurde Natriumhydrid (60%-ige Dispersion in Mineralöl, 28.7 mg, 0.72 mmol, 2.25 Äq) portionsweise bei 0 °C zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 0 °C für 1 h und anschließend bei Raumtemperatur für 1 h gerührt. Anschließend wurde **32a** (0.11 g, 0.38 mmol, 1.20 Äq) tropfenweise zur Reaktionsmischung gegeben und bei 50 °C über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt anschließend mittels Säulen-chromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 99:1 → 39:1 → 16:1 → 9:1 → 6:1) aufgereinigt. Das Produkt **58a** (0.15 g, 0.29 mmol, 91%) wurde als gelber kristalliner Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 10.72 (s, 1H, N<sup>1</sup>H), 6.42 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.66 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, H<sup>1</sup>), 5.40 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 1H, OH<sup>2'</sup>), 5.09 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 1H, OH<sup>3'</sup>), 4.98 (dd,  $J$  = 6.8, 5.2 Hz, 1H, OH<sup>5'</sup>), 4.88 (q,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, H<sup>2'</sup>), 4.13 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 4.09 (td,  $J$  = 5.3, 3.3 Hz, 2H, H<sup>3'</sup>), 3.83 (td,  $J$  = 5.2, 3.2 Hz, 1H, H<sup>4'</sup>), 3.69 – 3.60 (m, 3H, H<sub>a</sub><sup>5'</sup>/(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.57 – 3.47 (m, 15H, H<sub>b</sub><sup>5'</sup>/(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.43 (t,  $J$  = 2.4 Hz, CH<sub>2</sub>C≡CH).

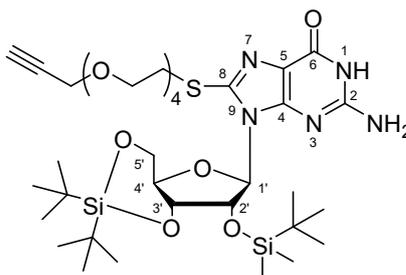
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 88.9 (C<sup>1</sup>), 86.4 (C<sup>2</sup>), 79.7, 79.5, 79.2, 77.6 (Alkin-CH), 70.2 – 69.0 (4 Signale: C<sup>3'</sup>/C<sup>4'</sup>/C<sup>5'</sup>/(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 57.9, 55.4.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 552.17350 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>9</sub>S<sup>+</sup>: 552.17347).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3286 (m), 2922 (m), 2114 (vw), 1674 (s), 1645 (m), 1613 (m), 1517 (m), 1447 (m), 1351 (m), 1300 (m), 1199 (m), 1080 (s), 1028 (m), 983 (m), 924 (m), 885 (m), 835 (m), 802 (m), 781 (m), 663 (m).

**R<sub>f</sub> (MeOH:DCM 1:9) = 0.34 (CAM).**

**MP = 178.9 °C.**

**3',5'-DTBS-2'-TBS-8-(Propargyltetraethylglykol)thioguanosin (59)**

Zu einer Lösung von **58a** (10.3 g, 54.2 mmol, 1.00 Äq) in trockenem DMF (4 mL) wurde unter Argonatmosphäre bei 0 °C Di-*tert*-butylsilylbis(trifluoromethanesulfonate) (0.10 mL, 1.40 g/mL 0.32 mmol, 1.10 Äq) tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung wieder auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Imidazol (0.11 g, 1.59 mmol, 6.00 Äq) und Rühren für 10 min bei 0 °C wurde *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (0.12 g, 0.79 mmol, 3.00 Äq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in einer Mischung aus DCM und EtOAc (50 mL, 4:1) aufgenommen und mit gesättigten, wässrigen Lösungen von NH<sub>4</sub>Cl, NaHCO<sub>3</sub> und NaCl (je 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, EtOAc/MeOH = 100:0 → 19:1) aufgereinigt. Es wurde **59** (0.10 g, 0.13 mmol, 48%) als gelblich viskoses Öl erhalten.

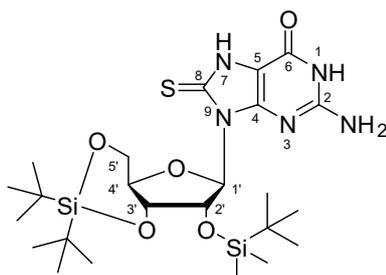
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 12.05 (s, 1H, N<sup>1</sup>H), 5.82 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, *H*), 5.74 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.91 (dd, *J* = 8.7, 5.4 Hz, 1H, H<sup>3'</sup>), 4.66 (dd, *J* = 5.4, 1.1 Hz, 1H, H<sup>2'</sup>), 4.41 (q, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>a</sub><sup>5'</sup>), 4.19 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 4.08–4.00 (m, 2H, H<sub>b</sub><sup>5'</sup>/H<sup>4'</sup>), 3.75 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.72–3.57 (m, 12H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.49–3.36 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2.43 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 1.12 (s, 9H, *t*Bu), 1.04 (s, 9H, *t*Bu), 0.89 (s, 8H, *t*Bu), 0.09 (d, *J* = 7.8 Hz, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 158.1, 153.1, 152.5, 145.2, 117.8, 92.5 (C<sup>1'</sup>), 79.7, 75.2 (C<sup>3'</sup>), 74.7 – 74.5 (3 Signale: CH<sub>2</sub>C≡CH / C<sup>2'</sup>/C<sup>4'</sup>), 70.6, 70.6, 70.5, 70.4, 69.7, 69.1, 67.6 (C<sup>5'</sup>), 58.4 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 32.6, 31.0, 27.6, 27.5, 27.0, 25.9, 22.9, 20.3, 18.5, -4.3 – -5.1 (2 Signale: Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**HRMS (EI<sup>+</sup>):** *m/z* = 784.38028 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>62</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>SSi<sub>2</sub><sup>+</sup>: 784.38013).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3343 (w), 2930 (w), 2857 (w), 1682 (m), 1629 (m), 1594 (m), 1519 (w), 1463 (w), 1360 (m), 1290 (w), 1251 (w), 1165 (m), 1104 (m), 1058 (m), 1020 (m), 938 (w), 905 (w), 826 (m), 779 (m), 753 (m).

**R<sub>f</sub> (EtOAc):** 0.15 (ANIS).

**3',5'-DTBS-2'-TBS-8-Thioguanosin (58b)**

Zu einer Lösung von **57** (2.00 g, 6.34 mmol, 1.00 Äq) in trockenem DMF (94 mL) wurde unter Argonatmosphäre bei 0 °C Di-*tert*-butylsilylbis(trifluoromethanesulfonate) (2.48 mL, 1.40 g/mL 7.61 mmol, 1.20 Äq) tropfenweise über 10 min zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung wieder auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Imidazol (2.59 g, 38.1 mmol, 6.00 Äq) und Rühren für 10 min bei 0 °C wurde *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (2.87 g, 19.0 mmol, 3.00 Äq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in DCM (250 mL) aufgenommen und mit gesättigten, wässrigen Lösungen von NH<sub>4</sub>Cl, NaHCO<sub>3</sub> und NaCl (je 2 × 200 mL) gewaschen. Die kombinierten wässrigen Phasen wurden mit EtOAc (250 mL) gewaschen, die kombinierten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silikagel, *i*Hex/EtOAc/MeOH = 1:1:0 → 1:2:0 → 0:1:0 → 0:7:1) aufgereinigt. Es wurde **58b** (3.03 g, 5.45 mmol, 86%) als gelber Schaum erhalten.

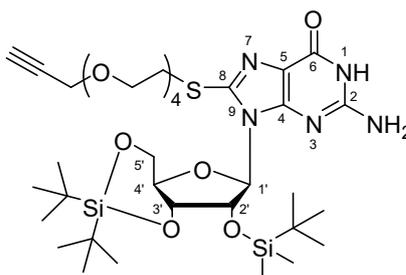
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 12.22 (s, 1H, NH<sup>7</sup>), 11.70 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 6.42 (s, 1H, H<sup>1</sup>), 5.42 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.98 (dd, *J* = 9.0, 5.3 Hz, 1H, H<sup>3</sup>), 4.68 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 4.39 (dd, *J* = 8.2, 4.2 Hz, 1H, H<sub>a</sub><sup>5</sup>), 4.10–3.94 (m, 2H, H<sub>b</sub><sup>5</sup>/H<sup>4</sup>), 1.09 (s, 9H, *t*Bu), 1.03 (s, 9H, *t*Bu), 0.90 (s, 9H, *t*Bu), 0.18–0.03 (m, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 166.7, 152.8, 152.6, 150.6, 105.4, 92.4 (C<sup>1</sup>), 75.2 (C<sup>3</sup>), 74.8 (C<sup>4</sup>), 74.2 (C<sup>2</sup>), 67.7 (C<sup>5</sup>), 27.7, 27.2, 26.1, 26.0, 26.0, 23.0, 20.5, 18.6, –4.2––4.9 (2 Signale: Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**HRMS (EI<sup>+</sup>):** *m/z* = 570.26021 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>SSi<sub>2</sub><sup>+</sup>: 570.25962).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2929 (w), 2855 (w), 1686 (w), 1626 (w), 1471 (w), 1435 (w), 1386 (w), 1360 (w), 1250 (w), 1165 (w), 1132 (w), 1105 (w), 1059 (m), 1004 (w), 938 (w), 827 (m), 776 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 9:1):** 0.50 (CAM).

**3',5'-DTBS-2'-TBS-8-(Propargyltetraethylglykol)thioguanosin (59)**

Zu einer Lösung von **58b** (2.85 g, 5.00 mmol, 1.10 Äq) in trockenem THF (100 mL) wurde Natriumhydrid (60%-ige Dispersion in Mineralöl, 180 mg, 4.54 mmol, 1.00 Äq) portionsweise bei 0 °C zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 0 °C für 30 min gerührt. Anschließend wurde **32a** (1.47 g, 4.99 mmol, 1.10 Äq) tropfenweise zur Reaktionsmischung gegeben bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in DCM (600 mL) aufgenommen und mit gesättigten, wässrigen Lösungen von NH<sub>4</sub>Cl, NaHCO<sub>3</sub> und NaCl (je 400 mL) gewaschen. Die kombinierten wässrigen Phasen wurden mit DCM (2 × 400 mL) gewaschen, die kombinierten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, EtOAc/MeOH = 100:0 → 99:1 → 9:1) aufgereinigt. Es wurde **59** (2.66 g, 3.39 mmol, 75%) als gelber Schaum erhalten.

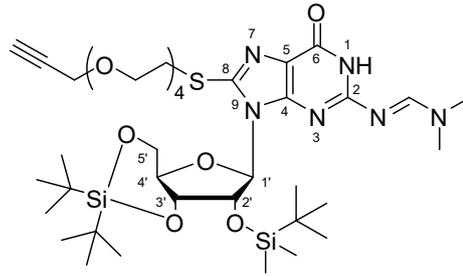
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 12.05 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 5.82 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H<sup>1</sup>), 5.74 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.91 (dd, *J* = 8.7, 5.4 Hz, 1H, H<sup>3'</sup>), 4.66 (dd, *J* = 5.4, 1.1 Hz, 1H, H<sup>2'</sup>), 4.41 (q, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>a</sub><sup>5'</sup>), 4.19 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 4.08 – 4.00 (m, 2H, H<sub>b</sub><sup>5'</sup>/H<sup>4'</sup>), 3.75 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.72 – 3.57 (m, 12H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.49 – 3.36 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2.43 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 1.12 (s, 9H, *t*Bu), 1.04 (s, 9H, *t*Bu), 0.89 (s, 8H, *t*Bu), 0.09 (d, *J* = 7.8 Hz, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 158.1, 153.1, 152.5, 145.2, 117.8, 92.5 (C<sup>1</sup>), 79.7, 75.2 (C<sup>3'</sup>), 74.7 – 74.5 (3 Signale: CH<sub>2</sub>C≡CH / C<sup>2'</sup>/C<sup>4'</sup>), 70.6, 70.6, 70.5, 70.4, 69.7, 69.1, 67.6 (C<sup>5'</sup>), 58.4 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 32.6, 31.0, 27.6, 27.5, 27.0, 25.9, 22.9, 20.3, 18.5, -4.3 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.1 (Si-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z* = 784.38088 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>62</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>SSi<sub>2</sub><sup>+</sup>: 784.38013).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3312 (w), 2929 (w), 2857 (w), 2359 (vw), 2116 (vw), 1681 (m), 1629 (m), 1593 (m), 1519 (w), 1462 (w), 1360 (m), 1291 (w), 1251 (w), 1103 (m), 1060 (m), 1023 (m), 969 (w), 938 (w), 826 (m), 778 (m), 686 (m).

**R<sub>f</sub> (EtOAc):** 0.30 (CAM).

**N2-DMF-3',5'-DTBS-2'-TBS-8-(Propargyltetraethylglykol)thioguanosin (62)**

Zu einer Lösung von **59** (18.0 g, 23.0 mmol, 1.00 Äq) in trockenem MeOH (150 mL) wurde unter Argonatmosphäre Dimethylformamid-dimethylacetal (12.2 mL, 0.89 g/mL, 91.8 mmol, 4.00 Äq) zugegeben und für 5 h bei 50 °C gerührt. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt, und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 1:0 → 99:1 → 49:1 → 19:1 → 9:1) aufgereinigt. Es wurde **62** (15.6 g, 18.6 mmol, 81%) als gelber Schaum erhalten.

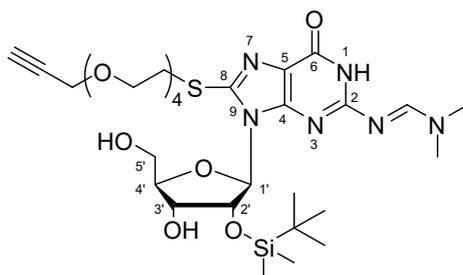
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 8.94 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 8.45 (s, 1H, N=CH-N), 5.87 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sup>1</sup>), 4.83 (dd, *J* = 5.7, 1.4 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 4.58 (dd, *J* = 9.1, 5.4 Hz, 1H, H<sup>3</sup>), 4.43 (q, *J* = 2.9 Hz, 1H, H<sub>a</sub><sup>5'</sup>), 4.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 4.08–3.96 (m, 2H, H<sub>b</sub><sup>5'</sup>/H<sup>4</sup>), 3.80 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.74–3.59 (m, 13H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.54 (td, 2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.13 (d, *J* = 16.2 Hz, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.43 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 1.07 (s, 9H, *t*Bu), 1.04 (s, 9H, *t*Bu), 0.86 (s, 9H, *t*Bu), 0.06 (d, *J* = 14.8 Hz, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 157.5, 156.9, 155.8, 151.7, 146.1, 120.8, 92.5 (C<sup>1</sup>), 79.8, 75.9 (C<sup>3</sup>), 74.7 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 74.6 (C<sup>4</sup>), 74.1 (C<sup>2</sup>), 70.7–69.2 (6 Signale: (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 67.6 (C<sup>5</sup>), 58.5 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 41.6 (N-CH<sub>3</sub>), 35.4 (N-CH<sub>3</sub>), 32.5, 27.9, 27.7, 27.7, 27.2, 26.0, 22.8, 20.5, 18.6, 1.2, -4.2 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.1 (Si-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z* = 839.42133 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>38</sub>H<sub>67</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>SSi<sub>2</sub><sup>+</sup>: 839.42233).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2932 (vw), 2857 (vw), 1683 (w), 1629 (w), 1533 (w), 1423 (vw), 1347 (w), 1291 (vw), 1252 (vw), 1110 (w), 829 (w), 783 (vw).

**R<sub>f</sub> (EtOAc):** 0.14 (ANIS).

**N2-DMF-2'-TBS-8-(Propargyltetraethylglykol)thioguanosin (63)**

Zu einer Lösung von **62** (1.50 g, 1.79 mmol, 1.00 Äq) in trockenem DCM (35 mL) wurde unter Argonatmosphäre OLAH-Reagenz (70% HF in Pyridin, 0.60 mL, 1.10 g/mL, 18.0 mmol, 10.0 Äq) bei 0 °C zugegeben und bei 0 °C für 2.5 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit Methoxytrimethylsilan gequenchst und mit DCM (60 mL) verdünnt. Die Reaktionsmischung wurde mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (3 × 50 mL) gewaschen. Die kombinierten wässrigen Phasen wurden mit DCM (100 mL) gewaschen und die kombinierten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 99:1 → 48:1 → 32:1 → 24:1) aufgereinigt. Es wurde **63** (0.95 g, 1.36 mmol, 76%) als gelbes viskoses Öl erhalten.

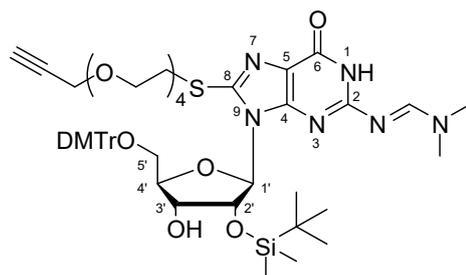
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 9.75 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 8.38 (s, 1H, N=CH-N), 5.83 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H<sup>1'</sup>), 5.40 – 5.31 (m, 1H), 5.13 (dd, *J* = 7.4, 5.2 Hz, 1H, H<sup>2'</sup>), 4.98 (s, 1H, OH<sup>5'</sup>/OH<sup>3'</sup>), 4.28 – 4.25 (m, 1H, H<sup>3'</sup>), 4.24 (q, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.18 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.88 – 3.73 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.73 – 3.62 (m, 1H), 3.66 – 3.55 (m, 13H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.55 – 3.39 (m, 2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.15 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.08 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.88 (s, 1H), 2.49 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 1.58 (s, 1H), 1.25 (td, *J* = 14.0, 7.4 Hz, 5H), 1.03 – 0.93 (m, 1H), 0.84 (s, 9H, *t*Bu), -0.13 (s, 3H, Si-CH<sub>3</sub>), -0.21 (s, 3H, Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 158.5, 157.2, 157.1, 151.8, 147.0, 130.1, 121.7, 89.5 (C<sup>1</sup>), 86.9, 80.2, 74.5, 73.8 (C<sup>2</sup>), 72.8 (C<sup>3</sup>), 70.9, 70.9, 70.8, 70.8, 70.7, 69.9, 69.6, 63.5, 60.6, 58.6 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 51.6, 50.7, 41.5 (N-CH<sub>3</sub>), 35.2 (N-CH<sub>3</sub>), 34.3, 33.0, 32.3, 30.1, 30.0, 29.7, 29.7, 29.5, 27.5, 26.1, 26.0, 25.8, 25.7, 25.3, 23.1, 18.2, 14.4, 14.3, -5.0 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.3 (Si-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z* = 699.32058 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>SSi<sup>+</sup>: 699.32020).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3260 (vw), 2929 (vw), 2855 (vw), 2166 (vw), 1683 (w), 1632 (w), 1532 (w), 1424 (vw), 1349 (w), 1296 (vw), 1252 (vw), 1115 (w), 839 (w), 783 (vw), 721 (vw), 672 (vw).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 19:1):** 0.44 (ANIS).

**N2-DMF-5'-DMTr-2'-TBS-8-(Propargyltetraethylglykol)thioguanosin (66a)**

Es wurde **63** (6.74 g, 9.64 mmol, 1.00 Äq) zweimal mit trockenem Pyridin co-evaporiert und in trockenem Pyridin (100 mL) gelöst. Anschließend wurde Dimethoxytritylchlorid (4.08 g, 12.1 mmol, 1.25 Äq), welches zuvor unter Hochvakuum getrocknet wurde, zur Reaktionsmischung gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit DCM (1 L) verdünnt und mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (200 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurden mit DCM (500 mL) gewaschen und die kombinierten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH:Pyridin = 198:1:1 → 197:2:1 → 196:3:1 → 195:4:1 → 190:9:1) aufgereinigt. Es wurde **66a** (6.39 g, 7.35 mmol, 76%) als gelber Schaum erhalten.

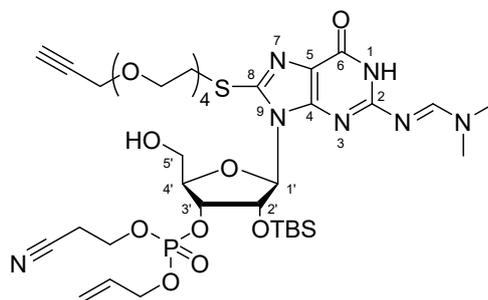
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 11.50 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 8.31 (s, 1H, N=CH-N), 7.32 (dt, *J* = 6.7, 1.4 Hz, 2H, Ar), 7.27 – 7.21 (m, 2H, Ar), 7.21 – 7.16 (m, 5H, Ar), 6.85 – 6.76 (m, 4H, Ar), 5.77 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H<sup>1</sup>), 5.15 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, OH<sup>3</sup>), 5.02 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 4.32 (q, *J* = 5.9 Hz, 1H, H<sup>3</sup>), 4.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.99 (q, *J* = 4.9 Hz, 1H, H<sup>4</sup>), 3.72 (d, *J* = 3.1 Hz, 6H, Ar-OCH<sub>3</sub>), 3.66 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.55 – 3.46 (m, 12H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.42 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.41 – 3.30 (m, 1H, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.20 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, H<sub>a/b</sub><sup>4</sup>), 2.99 (d, *J* = 16.1 Hz, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.76 (s, 9H, *t*Bu), 0.05 (s, 3H, Si-CH<sub>3</sub>), -0.11 (s, 3H, Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ [ppm] = 158.0, 157.6, 156.6, 156.4, 144.9, 135.6, 135.5, 129.8 – 126.6 (5 Signale: Ar), 119.9, 113.1 (Ar), 88.7 (C<sup>1</sup>), 85.2, 83.0 (C<sup>4</sup>), 80.4, 77.2 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 72.9 (C<sup>2</sup>), 69.8, 69.8, 69.7, 69.6 (C<sup>3</sup>), 69.5, 69.0 (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 68.5, 63.2 (C<sup>5</sup>), 57.5 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 55.0 (2 Signale: Ar-OCH<sub>3</sub>), 40.7 (N-CH<sub>3</sub>), 34.7 (N-CH<sub>3</sub>), 31.6, 25.6 (*t*Bu), 18.0, 4.7 (Si-CH<sub>3</sub>), 5.4 (Si-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z* = 1001.45167 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>51</sub>H<sub>69</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>SSi<sub>2</sub><sup>+</sup>: 1001.45088).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2929 (w), 2360 (s), 2324 (m), 1628 (s), 1529 (s), 1421 (m), 1345 (m), 1298 (m), 1249 (s), 1176 (m), 1111 (s), 1033 (s), 917 (v), 830 (s), 782 (m), 756 (s), 729 (s), 701 (s), 668 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH 19:1):** 0.44 (ANIS).

**N2-DMF-5'-OH-2'-TBS-8-(Propargyltetraethylglykol)thioguanosin-3'-(allyl, cyanoethyl)phosphat (67a)**

**66a** (6.00 g, 5.99 mmol, 1.00 Äq) wurde zweimal mit trockenem Pyridin (je 100 mL) und zweimal mit trockenem Acetonitril (je 100 mL) co-evaporiert, unter Hochvakuum getrocknet und in trockenem DCM gelöst (90 mL). Zu Reaktionsmischung wurde unter Argonatmosphäre 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidit (2.28 mL, 1.47 g/mL, 7.19 mmol, 1.20 Äq) bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 5 min wurde PyrTFA (1.39 g, 7.19 mmol, 1.20 Äq), welches zuvor unter Hochvakuum getrocknet wurde, zur Reaktionsmischung gegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden Allylalkohol (2.04 mL, 1.42 g/mL, 30 mmol, 5.00 Äq) und BTT-Aktivator (300 mM in MeCN, 40 mL, 12.0 mmol, 2.00 Äq) zur Reaktionsmischung gegeben. Nach 90 min wurde TBHP (5.00 M in Decan, 3.60 mL, 18.0 mmol, 3.00 Äq) zugegeben. Nach 30 min wurde das überschüssige TBHP bei 0 °C mit einer wässrigen NaHSO<sub>3</sub>-Lösung (500 mg/mL, 8.34 mL, 36.0 mmol, 6.00 Äq) gequentscht. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (300 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (300 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit EtOAc (3 × 150 mL) gewaschen, die kombinierten organischen Phasen wurden über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (150 mL) und H<sub>2</sub>O (1.62 mL) aufgenommen und DCA-Lösung (6% v/v in DCM, 150 mL) wurde zugegeben. Nach 15 min wurde die rote Reaktionsmischung bei Raumtemperatur mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (600 mL) gequentscht. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (500 mL) und Wasser (100 mL) verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 × 200 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 49:1 → 19:1) und es wurde **67a** als gelber Schaum in einem Diastereomergemisch von 2 Diastereomeren erhalten (2.30g, 2.64 mmol, 44%). Das Diastereomergemisch wurde nicht aufgetrennt und direkt weiterverwendet.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 9.24 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 8.38 (s, 1H, N=CH-N), 5.98 (ddt,  $J$  = 17.2, 10.4, 5.7 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.84 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 3.0 Hz, 1H, H<sup>1</sup>), 5.42 (ddq,  $J$  = 17.1, 2.7, 1.5 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.33 (ddq,  $J$  = 10.4, 3.8, 1.2 Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.18 (ddt,  $J$  = 7.7, 5.3, 3.0 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 5.04 – 4.98 (m, 1H), 4.65 (dddd,  $J$  = 10.1, 8.7, 5.0, 1.4 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 4.50 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 4.40 (dq,  $J$  = 10.8, 1.8 Hz, 1H), 4.36 – 4.23 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 4.19 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C $\equiv$ CH), 3.90 – 3.80 (m, 2H), 3.80 – 3.72 (m, 3H), 3.72 – 3.67 (m, 4H, H<sup>4</sup>/(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.67 – 3.61 (m, 10H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.61 – 3.52 (m, 1H, H<sup>5</sup>), 3.52 – 3.41 (m, 1H, H<sup>5</sup>), 3.22 – 3.14 (m, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.10 (dd,  $J$  = 4.7, 2.6 Hz, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.81 (td,  $J$  = 6.2, 3.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.43 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C $\equiv$ CH), 1.28 (ddd,  $J$  = 16.6, 6.8, 3.0 Hz, 4H), 1.25 (s, 1H), 1.03 – 0.91 (m, 2H), 0.79 (dd, 9H, *t*Bu), -0.11 (s, 3H, Si-CH<sub>3</sub>), -0.21 (s, 3H, Si-CH<sub>3</sub>).

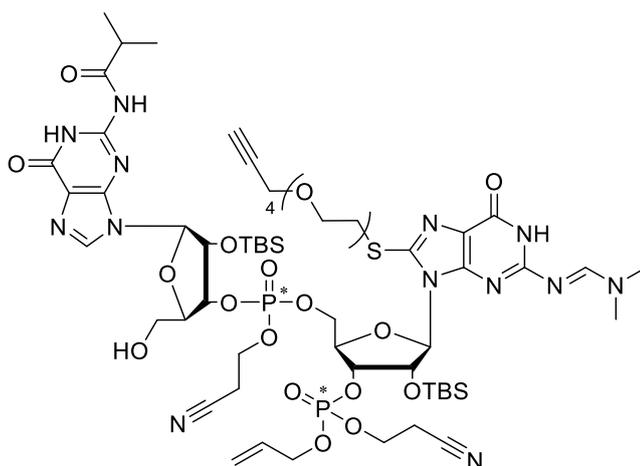
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 158.1, 156.9, 151.3, 147.5, 132.3, 132.2 (OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 129.5, 129.1, 128.2, 122.0, 119.8, 119.7 (OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 116.7, 89.1 (C<sup>1</sup>), 85.4, 80.1, 78.8, 74.9 (CH<sub>2</sub>C $\equiv$ CH), 72.7 (C<sup>2</sup>), 72.5, 71.0 – 69.4 (8 Signale: OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>/(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 62.8, 62.6, 62.5, 62.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 60.6, 58.8 (CH<sub>2</sub>C $\equiv$ CH), 46.8, 41.8 (N-CH<sub>3</sub>), 37.4, 35.7 (N-CH<sub>3</sub>), 32.9 (C<sup>5</sup>), 32.8 (C<sup>5</sup>), 30.1, 28.2, 26.2, 26.0, 25.9 (*t*Bu), 23.2, 22.9, 22.6, 20.3, 20.1, 20.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 18.4, 18.4, 18.3, -4.6, -4.7, -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.0 (Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = -1.65, -1.73.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 872.34829 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>59</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>PSSi<sup>+</sup>: 872.34438).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2930 (w), 2854 (w), 1685 (m), 1631 (m), 1529 (m), 1423 (m), 1349 (m), 1293 (m), 1253 (m), 1092 (s), 1029 (s), 1031 (m), 925 (m), 837 (s), 780 (m), 729 (s), 647 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 19:1):** 0.22 (ANIS).

Lineares 3',5'-N<sup>2</sup><sup>i</sup>BuGuanosin-C8S<sup>Linker</sup>Guanosin-3'-(allyl, cyanoethyl)phosphat (**69**)

**67a** (2.50 g, 2.87 mmol, 1.00 Äq) wurde zweimal mit trockenem Pyridin (je 100 mL) und zweimal mit trockenem Acetonitril (je 100 mL) co-evaporiert, unter Hochvakuum getrocknet und in trockenem Acetonitril gelöst (20 mL). Zu Reaktionsmischung wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung von rG<sup>i</sup>Bu-CE-PA (**68**, 4.18 g, 4.31 mmol, 1.50 Äq) in trockenem Acetonitril (20 mL) bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 10 min wurde BTT-Aktivator (300 mM in MeCN, 19.1 mL, 5.74 mmol, 2.00 Äq) zur Reaktionsmischung gegeben. Nach 90 min wurde TBHP (5.00 M in Decan, 1.55 mL, 8.61 mmol, 3.00 Äq) zugegeben. Nach 30 min wurde das überschüssige TBHP bei 0 °C mit einer wässrigen NaHSO<sub>3</sub>-Lösung (500 mg/mL, 3.56 mL, 17.2 mmol, 6.00 Äq) gequenchet. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (100 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit EtOAc (3 × 25 mL) gewaschen, die kombinierten organischen Phasen wurden über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (25 mL) und H<sub>2</sub>O (3 mL) aufgenommen und DCA (6% v/v in DCM, 25 mL) wurde zugegeben. Nach 15 min wurde die rote Reaktionsmischung bei Raumtemperatur mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (150 mL) gequenchet. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (450 mL) und Wasser (150 mL) verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 × 300 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 49:1 → 4:1) und es wurde **69** als gelber Schaum in einem Diastereomergemisch aus 4 Diastereomeren erhalten (2.58 g, 1.78 mmol, 62%). Das Diastereomergemisch wurde nicht aufgetrennt, da es keinen Einfluss auf das Endprodukt hat, und direkt weiterverwendet.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 12.28 (s, 1H), 9.22 (s, 1H), 8.56 (s, 1H, , N=CH-N), 7.86 (s, 1H), 5.96 (dtd,  $J$  = 17.1, 10.3, 5.1 Hz, 1H), 5.89-5.80 (m, 1H), 5.66 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.47 - 5.26 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.22 - 4.73 (m, 1H), 4.64 - 4.22 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 4.18 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.83 - 3.72 (m, 3H), 3.68 - 3.66 (m, 18H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.64-3.57 (m, 3H), 3.11 - 3.06 (m, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.90 - 2.72 (m, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.44 (dtt,  $J$  = 3.3, 2.4, 1.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 2.14 - 2.13 (m, 2H), 1.24 (d,  $J$  = 3.9 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.90 - 0.79 (m, 9H, tBu), 0.73 (s, 8H, tBu), 0.24- -0.42 (m, 11H, 2 × Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

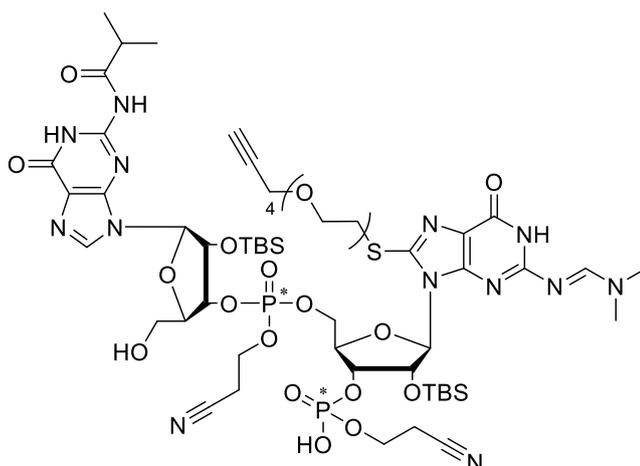
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 139.4, 132.1, 129.2, 128.9, 120.0, 119.9, 119.9, 119.9, 113.7, 90.1, 89.9, 89.6, 85.1, 81.2, 79.9, 79.6, 79.3, 78.0, 77.2, 75.2, 74.9, 74.4, 73.8, 73.8, 72.3, 71.5, 70.9, 70.7, 69.9, 69.6, 69.4, 67.5, 67.0, 66.8, 62.7, 62.0, 60.6, 60.4, 58.6, 55.6, 54.0, 51.1, 46.7, 41.7, 41.7, 36.4, 35.6, 32.7, 29.9, 28.0, 25.9, 25.8, 25.8, 25.8, 25.8, 23.2, 22.5, 20.9, 20.0, 19.8, 19.3, 1.1, -4.5, -4.7, -5.0, -5.3.

**<sup>31</sup>P-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = -1.64, -1.85, -2.51, -2.64.

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):**  $m/z$  = 1488.51089 [M+Cl]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>59</sub>H<sub>93</sub>N<sub>13</sub>ClO<sub>20</sub>P<sub>2</sub>SSi<sub>2</sub><sup>-</sup>: 1488.50883).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2930 (w), 1683 (m), 1630 (m), 1607(m) 1558 (m), 1532 (m), 1347 (m), 1251 (m), 1029 (s), 838 (s), 780 (s), 668 (s).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 19:1):** 0.34 (ANIS).

Lineares 3',5'-N<sup>2</sup><sup>i</sup>BuGuanosin-C8S<sup>Linker</sup>Guanosin-3'-cyanoethyl-phosphat (70)

Zu einer Lösung von **69** (2.50 g, 1.72 mmol, 1.00 Äq) in trockenem Aceton (200 mL) wurde NaI (2.58 g, 17.2 mmol, 10.0 Äq) bei Raumtemperatur hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 56 °C gerührt. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 99:1 → 4:1) aufgereinigt. Es wurde ein **70** als gelber Schaum in einem Diastereomergemisch aus 2 Diastereomeren erhalten (872 mg, 616 µmol, 36%). Das Diastereomergemisch wurde nicht aufgetrennt, da es keinen Einfluss auf das Endprodukt hat, und direkt weiterverwendet.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 12.28 (s, 1H), 10.24 (s, 1H), 8.57 (dd, *J* = 4.2, 1.8 Hz, 4H), 8.24 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.37 – 7.34 (m, 2H), 7.33 (dd, *J* = 3.8, 2.3 Hz, 2H), 7.32 (s, 1H), 5.99 (d, 1H), 5.94 – 5.88 (m, 4H), 5.41 (s, 1H), 5.24 (s, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.79 (s, 1H), 4.49 (m, 1H), 4.42 – 4.42 (m, 1H), 4.34 – 4.33 (m, 8H), 4.18 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.81 – 3.74 (m, 1H), 3.66 – 3.62 (m, 16H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.61 (s, 4H), 3.60 (s, 10H), 3.44 (d, *J* = 20.6 Hz, 3H), 3.37 (m, 1H), 3.09 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.94 (s, 4H, N-CH<sub>3</sub>), 2.93 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 2.11 – 2.06 (m, 4H), 1.23 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.99 – 0.80 (m, 15H, 2 × *t*Bu), 0.22 – -0.24 (m, 12H, 2 × Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

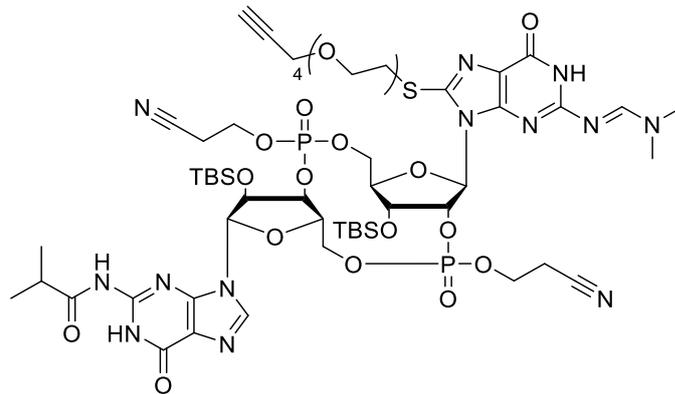
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 149.9, 149.9, 149.8, 135.9, 123.8, 89.8, 84.5, 75.5, 74.0, 70.2, 69.7, 62.8, 62.3, 60.5, 57.8, 40.8, 40.8, 34.6, 32.1, 29.7, 29.4, 29.2, 25.4, 25.4, 25.2, 22.1, 19.4, 19.1, 18.6, -5.3.

**<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm] = -1.33, -1.60, -2.02.

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** *m/z* = 1412.50319 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>56</sub>H<sub>88</sub>N<sub>13</sub>O<sub>20</sub>P<sub>2</sub>SSi<sub>2</sub><sup>-</sup>: 1412.50319).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2930 (w), 1684 (m), 1607 (m), 1559 (m), 1533 (m), 1250 (m), 1032 (s), 947 (m), 836 (s), 780 (s), 719 (w).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 19:1):** 0.07 (ANIS).

Geschütztes zyklisches 2',3'-C8S<sup>Linker</sup>Guanosin-Guanosin-phosphat (71)

**70** (872 mg, 616  $\mu\text{mol}$ , 1.00 Äq) wurde dreimal mit trockenem Pyridin (je 100 mL) co-evaporiert, und in Pyridin angelöst (200 mL). MSNT (913 mg, 3.08 mmol, 5.00 Äq) wurde unter Argonatmosphäre zur Reaktionsmischung zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und anschließend mit Acetonitril co-evaporiert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 49:1  $\rightarrow$  4:1) aufgereinigt und es wurde **71** als gelber Feststoff in einem Diastereomergemisch aus 4 Diastereomeren erhalten (520 mg, 372  $\mu\text{mol}$ , 60%). Das Diastereomergemisch wurde nicht aufgetrennt, da es keinen Einfluss auf die nachfolgende Synthese hat, und direkt weiterverwendet.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 12.09 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 5.79-5.77 (m, 2H), 4.44-4.29 (m, 4H), 4.31-4.28 (m, 4H), 4.17 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 2H), 3.96 – 2.97 (m, 16H), 2.80 (t,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 2.59 (s, 6H), 2.49 (s, 1H), 2.28– 2.12 (m, 4H), 1.26 (d, 6H, 7.4 Hz), 0.82 (s, 18H), 0.08 (s, 12H).

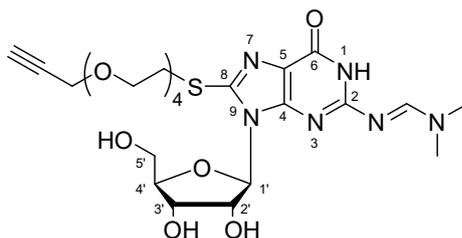
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 143.8, 130.8, 126.2, 70.5, 69.4, 58.1, 53.4, 50.5, 29.7, 25.2, 22.6, 22.3, 20.5, 18.6, 0.7.

**LRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 1397.9 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>56</sub>H<sub>88</sub>N<sub>13</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>SSi<sub>2</sub><sup>+</sup>: 1397.6).  
 $m/z$  = 699.5 [M+2H]<sup>2+</sup> (calcd. for C<sub>56</sub>H<sub>89</sub>N<sub>13</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>SSi<sub>2</sub><sup>2+</sup>: 699.3).

**LRMS (ESI<sup>-</sup>):**  $m/z$  = 1395.8 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>56</sub>H<sub>86</sub>N<sub>13</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>SSi<sub>2</sub><sup>-</sup>: 1395.6).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2930 (w), 1605 (m), 1407 (w), 1533 (w), 1250 (s), 1200 (s), 1086 (s), 842 (s), 783 (s), 677 (s).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 9:1):** 0.68 (ANIS).

5.3.3 Synthese von C<sup>8</sup>-modifiziertem 2',3'-cGAMP**N<sup>2</sup>-DMF-8-(Propargyltetraethylglykol)thioguanosin (75)**

Zu einer Lösung von **58a** (32.0 g, 60.4 mmol, 1.00 Äq) in trockenem MeOH (480 mL) wurde unter Argonatmosphäre Dimethylformamid-dimethylacetal (34.0 mL, 0.897 g/mL, 242 mmol, 4.00 Äq) zugegeben und über Nacht bei 50 °C gerührt. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt, und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 97:3 → 9:1) aufgereinigt. Es wurde **75** (20.6 g, 60.4 mmol, 58%) als gelber Schaum erhalten.

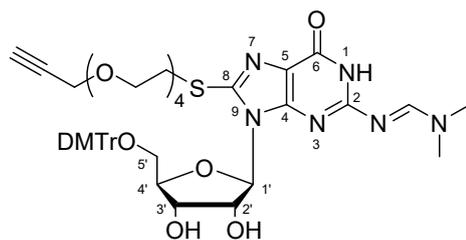
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 11.44 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 8.44 (s, 1H, N=CH-N), 5.70 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, H<sup>1'</sup>), 5.33 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 1H, OH<sup>2'</sup>), 5.17 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H, OH<sup>3'</sup>), 4.94 – 4.88 (m, 2H, H<sup>3'</sup>, H<sup>2'</sup>), 4.17 (m,  $J$  = 5.2, 3.3 Hz, 1H, OH<sup>5'</sup>), 4.14 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.88 (m,  $J$  = 4.6, 3.2 Hz, 1H, H<sup>4'</sup>), 3.71 – 3.50 (m, 16H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.41 (t,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.40 – 3.30 (m, 2H, H<sub>a/b</sub><sup>5'</sup>), 3.13 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.03 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 158.0 (C<sup>6</sup>), 156.7 (C<sup>2</sup>), 151.3 (C<sup>4</sup>), 144.4 (C<sup>8</sup>), 120.3 (C<sup>5</sup>), 88.6 (C<sup>1'</sup>), 85.6 (C<sup>4'</sup>), 80.4 (C<sup>2'</sup>), 77.1 (C<sup>3'</sup>), 71.0, 70.4, 69.8, 69.6, 69.5, 68.9, 68.5 ((C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 61.9 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 57.5 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 48.6 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 32.0 (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$  = 585.2373 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>S<sup>+</sup>: 585.2343).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3245 (m), 2920 (m), 2868 (m), 1671 (m), 1628 (s), 1530 (s), 1422 (m), 1343 (m), 1292 (m), 1084 (s), 1032 (s), 782 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM: MeOH = 9:1):** 0.30 (CAM).

**N2-DMF-5'-DMTr-8-(Propargyltetraethylglykol)thioguanosin (76)**

**75** (19.9, 34.0 mmol, 1.00 Äq) wurde zweimal mit trockenem Pyridin co-evaporiert und in trockenem Pyridin (340 mL) gelöst. Anschließend wurde Dimethoxytritylchlorid (14.4 g, 42.5 mmol, 1.25 Äq), welches zuvor unter Hochvakuum getrocknet wurde, zur Reaktionsmischung gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit DCM (110 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (80 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurden mit DCM (160 mL) gewaschen und die kombinierten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH + 0.1% Pyridin = 199:1 → 19:1) aufgereinigt. Es wurde **76** (25.1 g, 34.0 mmol, 84%) als gelber Schaum erhalten.

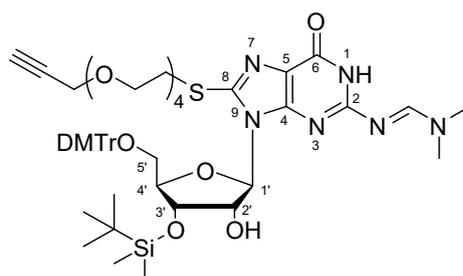
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 11.46 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 8.32 (s, 1H, N=CH-N), 7.34 – 7.28 (m, 2H, Ar), 7.26 – 7.14 (m, 7H, Ar), 6.82 – 6.75 (m, 4H, Ar), 5.75 (d,  $J$  = 4.0 Hz, 1H, H<sup>1</sup>), 5.38 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, OH<sup>2'</sup>), 5.17 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, OH<sup>3'</sup>), 4.89 (m,  $J$  = 5.7, 4.0 Hz, 1H, H<sup>3'</sup>), 4.43 (m,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, H<sup>2'</sup>), 4.13 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.95 (m,  $J$  = 6.5, 4.6 Hz, 1H, H<sup>4'</sup>), 3.72 (d,  $J$  = 3.1 Hz, 6H, Ar-OCH<sub>3</sub>), 3.71 – 3.66 (m, 2H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.56 – 3.46 (m, 14H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.41 (t,  $J$  = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.37 (m,  $J$  = 6.2 Hz, 2H, H<sub>a/b</sub><sup>5'</sup>), 3.00 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 157.9 (C<sup>6</sup>), 156.5 (C<sup>2</sup>), 151.2 (C<sup>4</sup>), 149.6 (Ar), 144.5 (C<sup>8</sup>), 136.1 (Ar), 129.7 (Ar), 123.9 (Ar), 120.0 (C<sup>5</sup>), 113.0 (Ar), 89.2 (C<sup>1</sup>), 85.2 (C<sup>4</sup>), 80.3 (C<sup>2'</sup>), 77.1 (C<sup>3'</sup>), 69.8, 69.7, 69.7, 69.6, 69.5, 68.9, 68.5 (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>, 63.4 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 57.5 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 55.0 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 31.8 (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 887.3701 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>45</sub>H<sub>55</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>S<sup>+</sup>: 887.3650).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3220 (w), 3122 (w), 2923 (w), 2867 (w), 1663 (m), 1627 (s), 1507 (s), 1447 (m), 1421 (m), 1342 (s), 1296 (m), 1247 (m), 1175 (s), 1110 (s), 1032 (s), 905 (m), 828 (m), 756 (m), 727 (s), 701 (m), 583 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 19:1):** 0.35 (ANIS).

**N2-DMF-5'-DMTr-3'-TBS-8-(Propargyltetraethylglykol)thioguanosin (66b)**

Zu einer Lösung von **76** (24.2 g, 27.3 mmol, 1.00 Äq) in trockenem DMF (420 mL) wurde unter Argonatmosphäre Imidazol (4.64 g, 68.2 mmol, 2.50 Äq) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (4.52 g, 30.0 mmol, 1.10 Äq) bei Raumtemperatur zugegeben, und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit DCM (250 mL) und EtOAc verdünnt und mit gesättigten, wässrigen Lösungen von NH<sub>4</sub>Cl gewaschen. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:*i*PrOH + 0.1% Pyridin = 99:1 → 19:1) aufgereinigt. Es wurde **66b** (14.9 g, 27.3 mmol, 55%) als gelber Schaum erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 11.48 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 8.27 (s, 1H, N=CH-N), 7.33 – 7.29 (m, 2H, Ar), 7.26 – 7.21 (m, 2H, Ar), 7.18 (m, *J* = 9.2, 2.5 Hz, 5H, Ar), 6.83 – 6.77 (m, 4H, Ar), 5.78 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H<sup>1</sup>), 5.27 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, OH<sup>2</sup>), 4.94 (m, *J* = 5.7, 4.0 Hz, 1H, H<sup>2</sup>), 4.43 (m, *J* = 5.6 Hz, 1H, H<sup>3</sup>), 4.13 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.92 (m, *J* = 5.5, 3.7 Hz, 1H, H<sup>4</sup>), 3.72 (d, *J* = 1.9 Hz, 6H, Ar-OCH<sub>3</sub>), 3.68 (m, *J* = 6.4, 1.5 Hz, 2H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.56 – 3.47 (m, 14H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.41 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.36 (m, *J* = 12.3, 5.8 Hz, 2H, H<sub>a/b</sub><sup>5</sup>), 3.00 (d, *J* = 3.3 Hz, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.78 (s, 9H, *t*Bu), 0.04 (s, 3H, Si-CH<sub>3</sub>), -0.05 (s, 3H, Si-CH<sub>3</sub>).

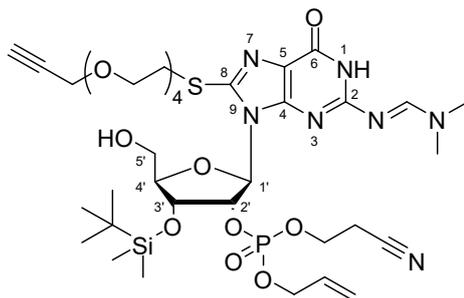
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 158.0 (C<sup>6</sup>), 156.5 (C<sup>2</sup>), 151.3 (C<sup>4</sup>), 149.6 (DMTr), 144.4 (C<sup>8</sup>), 135.9 (Ar), 129.7 (Ar), 123.9 (Ar), 120.0 (C<sup>5</sup>), 113.1 (Ar), 87.2 (C<sup>1</sup>), 85.6 (C<sup>4</sup>), 80.32 (C<sup>2</sup>), 77.1 (C<sup>3</sup>), 69.8, 69.7, 69.7, 69.6, 69.5, 69.0, 68.5 ((C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 66.1 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 57.5 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 55.0 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 31.8 (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 25.7, 17.9, -4.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.2 (Si-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z* = 1001.4576 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>51</sub>H<sub>69</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>SSi<sup>+</sup>: 699.32020).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3276 (vw), 2929 (w), 2858 (w), 1681 (m), 1628 (s), 1530 (s), 1509 (s), 1447 (m), 1421 (m), 1346 (m), 1299 (m), 1247 (s), 1176 (m), 1106 (s), 1030 (s), 829 (w), 780 (s), 756 (s), 727 (m), 702 (m), 583 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM:*i*PrOH = 24:1):** 0.12 (CAM/ANIS).

**N<sup>2</sup>-DMF-5'-OH-3'-TBS-8-(Propargyltetraethylglykol)thioguanosin-2'-(allyl, cyanoethyl)phosphat (77)**



**66b** (8.59 g, 8.58 mmol, 1.00 Äq) wurde zweimal mit trockenem Pyridin (je 15 mL) und zweimal mit trockenem Acetonitril (je 15 mL) co-evaporiert, unter Hochvakuum getrocknet und in trockenem Acetonitril gelöst (150 mL). Zu Reaktionsmischung wurde unter Argonatmosphäre 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidit (8.18 mL, 1.47 g/mL, 25.8 mmol, 3.00 Äq) bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 5 min wurde DIPAT (4.41 g, 25.8 mmol, 3.00 Äq), welches vorher unter Hochvakuum getrocknet wurde, zur Reaktionsmischung gegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden Allylalkohol (17.9 mL, 1.42 g/mL, 257 mmol, 30.0 Äq) und BTT-Aktivator (300 mM in MeCN, 172 mL, 51.5 mmol, 6.00 Äq) zur Reaktionsmischung gegeben. Nach 90 min wurde TBHP (5.00 M in Decan, 5.15 mL, 25.7 mmol, 3.00 Äq) zugegeben. Nach 30 min wurde das überschüssige TBHP bei 0 °C mit einer wässrigen NaHSO<sub>3</sub>-Lösung (500 mg/mL, 14.4 mL, 51.5 mmol, 6.00 Äq) gequentscht. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (530 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (300 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit EtOAc (3 × 250 mL) gewaschen, die kombinierten organischen Phasen wurden über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (214 mL) und H<sub>2</sub>O (2.34 mL) aufgenommen und DCA-Lösung (6% v/v in DCM, 217 mL, 158 mmol, 18.4 Äq) wurde zugegeben. Nach 15 min wurde die rote Reaktionsmischung bei Raumtemperatur mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (870 mL) gequentscht. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (700 mL) und Wasser (140 mL) verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 × 300 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 49:1 → 9:1) und es wurde **77** als gelber Schaum in einem Diastereomeregemisch von 2 Diastereomeren erhalten (5.83 g, 6.69 mmol, 78%). Das Diastereomeregemisch wurde nicht aufgetrennt, da es keinen Einfluss auf das Endprodukt hat, und direkt weiterverwendet.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 11.51 (s, 1H, NH<sup>1</sup>), 8.45 (s, 1H, N=CH-N), 5.93 (m,  $J = 6.3, 2.5$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.76 (s, 1H, H<sup>1</sup>), 5.26 (m,  $J = 17.1, 1.5$  Hz, 1H), 5.21 – 5.14 (m, 1H, H<sup>2</sup>), 5.16 – 5.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 4.62 (m,  $J = 10.6, 5.1, 3.0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 4.49 (s, 1H, H<sup>3</sup>), 4.47– 4.31 (m, 2H, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>CN), 4.31 – 4.20 (m, 1H, H<sup>2</sup>), 4.13 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.92– 3.89 (m, 1H, H<sup>4</sup>), 3.68 (m,  $J = 7.7, 4.1$  Hz, 2H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.62 – 3.49 (m, 14H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.41 (t,  $J = 2.4$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.35 (m,  $J = 12.3, 5.8$  Hz, 2H, H<sub>a/b</sub><sup>5</sup>), 3.12 (d,  $J = 1.0$  Hz, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.03 (d,  $J = 1.3$  Hz, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 0.92 (s, 9H, *t*Bu), 0.17 – 0.11 (m, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

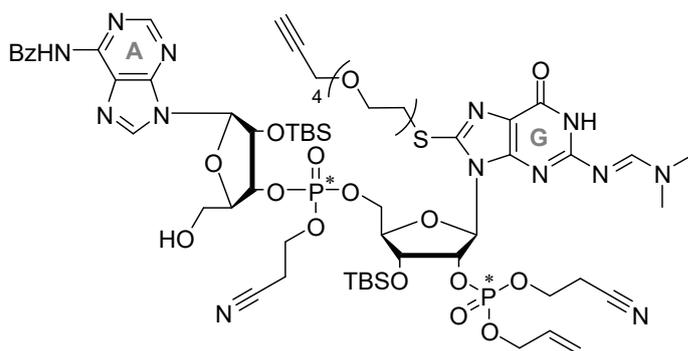
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 158.0 (C<sup>6</sup>), 157.0, 156.4 (C<sup>2</sup>), 151.3 (C<sup>4</sup>), 144.2 (C<sup>8</sup>), 128.9 (OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 128.6, 120.3 (C<sup>5</sup>), 118.3 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 118.2, 80.3 (C<sup>2</sup>), 77.1 (C<sup>3</sup>), 69.8, 69.8, 69.7, 69.6, 69.5, 68.8, 68.5 ((C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 57.5(CH<sub>2</sub>C≡CH), 54.9 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 36.0, 34.6, 32.1 (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 25.7 (*t*Bu), 17.9, -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.0 (Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 0.29, 0.00.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 872.3405$  [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>59</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>PSSi<sup>+</sup>: 872.3444).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2930 (vw), 2858 (w), 1696 (m), 1628 (m), 1530 (s), 1529 (w), 1509 (s), 1420 (m), 1347 (m), 1300 (m), 1249 (s), 1178 (m), 1107 (s), 1030 (s), 977 (s), 832 (m), 780 (m), 704 (m), 583 (m), 522 (m), 438 (m), 419 (m), 411 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 9:1):** 0.20 (ANIS).

**Lineares 3',5'-N<sup>Bz</sup>Adenosin-C8S<sup>Linker</sup>Guanosin-2'-(allyl,cyanoethyl)phosphat (79)**

**77** (5.40 g, 6.19 mmol, 1.00 Äq) wurde zweimal mit trockenem Pyridin (je 15 mL) und zweimal mit trockenem Acetonitril (je 15 mL) co-evaporiert, unter Hochvakuum getrocknet und in trockenem Acetonitril gelöst (44 mL). Zu Reaktionsmischung wurde unter Argonatmosphäre eine Lösung von rA<sup>Bz</sup>-CE-PA (**78**, 9.18 g, 9.29 mmol, 1.50 Äq) in trockenem Acetonitril (44 mL) bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 10 min wurde BTT-Aktivator (300 mM in MeCN, 41.3 mL, 12.4 mmol, 2.00 Äq) zur Reaktionsmischung gegeben. Nach 90 min wurde TBHP (5.00 M in Decan, 3.72 mL, 18.6 mmol, 3.00 Äq) zugegeben. Nach 30 min wurde das überschüssige TBHP bei 0 °C mit einer wässrigen NaHSO<sub>3</sub>-Lösung (500 mg/mL, 7.74 mL, 37.2 mmol, 6.00 Äq) gequenchet. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (280 mL) verdünnt und mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (300 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit EtOAc (3 × 150 mL) gewaschen, die kombinierten organischen Phasen wurden über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (150 mL) und H<sub>2</sub>O (1.7 mL) aufgenommen und DCA (6% v/v in DCM, 155 mL) wurde zugegeben. Nach 15 min wurde die rote Reaktionsmischung bei Raumtemperatur mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (620 mL) gequenchet. Die nun gelbe Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (500 mL) und Wasser (100 mL) verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 × 200 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 49:1 → 9:1) und es wurde ein **79** als gelber Schaum in einem Diastereomergemisch aus 4 Diastereomeren erhalten (5.48 g, 6.19 mmol, 60%). Das Diastereomergemisch wurde nicht aufgetrennt, da es keinen Einfluss auf das Endprodukt hat, und direkt weiterverwendet.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 11.76 (s, 1H, <sub>G</sub>NH<sup>1</sup>), 10.97 (s, 1H, <sub>A</sub>OH<sup>5</sup>), 9.15 (s, 1H, NHBz), 8.81 (m,  $J$  = 12.8 Hz, 1H, <sub>A</sub>H<sup>8</sup>), 8.41 (m, 1H, N=CH-N), 8.19 (s, 1H, <sub>A</sub>H<sup>2</sup>), 7.62 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, Bz), 7.54 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 3H, Bz), 6.11 – 6.02 (m, 1H, <sub>G</sub>H<sup>1</sup>), 5.91 – 5.81 (m, 1H, <sub>A</sub>H<sup>1</sup>), 5.36 – 5.28 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.25 (t,  $J$  = 9.7 Hz, 1H, <sub>A</sub>H<sup>2</sup>), 5.19 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.00 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 1H, <sub>A</sub>H<sup>3</sup>), 4.55 (s, 1H, <sub>G</sub>H<sup>3</sup>), 4.52 (s, 1H, <sub>G</sub>H<sup>2</sup>), 4.48 (d,  $J$  = 13.7 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 4.35 (s, 1H, <sub>G</sub>H<sup>5</sup>), 4.30 – 4.17 (m, 8H, 2 × OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>CN), 4.14 (s, 1H, <sub>G</sub>H<sup>4</sup>), 3.83 – 3.77 (m, 1H, <sub>A</sub>H<sup>5</sup>), 3.68 – 3.61 (m, 16H, (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 3.57 – 3.51 (m, 1H, <sub>A</sub>H<sup>5</sup>), 3.54 (t, 1H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 3.31 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.21 (s, 2H, CH<sub>2</sub>C≡CH), 1.00 – 0.93 (m, 18H, 2 × tBu), 0.19 (m, 12H, 2 × Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

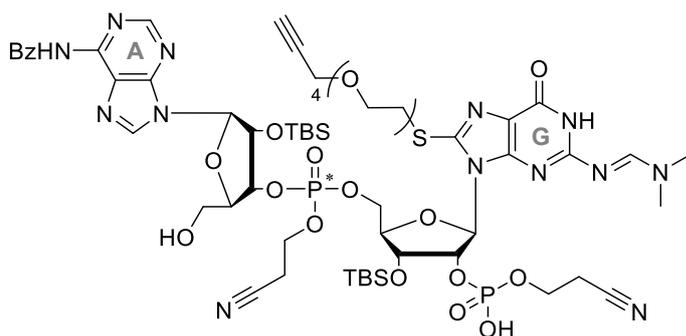
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 133.0 (Bz), 129.4 (Bz), 129.0 (Bz), 129.0 (OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 127.9 (Bz), 80.8 (<sub>G</sub>C<sup>2</sup>), 77.5 (<sub>G</sub>C<sup>3</sup>), 70.3, 70.2, 70.2, 70.1, 70.0, 69.0 ((C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>), 63.2, 58.0 (CH<sub>2</sub>C≡CH), 41.3, 36.6 (tBu), 35.2 (tBu), 26.1 (tBu), 25.7 (tBu), 25.7 (tBu), 19.5 (tBu), 18.3 (tBu), 18.2 (tBu), 18.0, 17.9, -4.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.6 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.8 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.8 (Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 0.70, 0.31, 0.13, 0.00.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  = 1472.5453 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>62</sub>H<sub>92</sub>N<sub>13</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>SSi<sub>2</sub><sup>+</sup>: 1472.5361).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3246 (vw), 2932 (w), 2858 (w), 2361 (vw), 1698 (m), 1684 (m), 1654 (m), 1628 (m), 1559 (m), 1529 (m), 1509 (s), 1490 (m), 1473 (m), 1457 (m), 1339 (m), 1251 (m), 1153 (m), 1025 (s), 1003 (s), 836 (s), 780 (s), 708 (m), 435 (m), 420 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 19:1):** 0.25 (ANIS).

lineares 3',5'-N<sup>6</sup>BzAdenosin-C8S<sup>Linker</sup>Guanosin-2'-cyanoethyl-phosphat (**80**)

Zu einer Lösung von **79** (5.02 g, 3.41 mmol, 1.00 Äq) in trockenem Aceton (400 mL) wurde NaI (5.11 g, 34.1 mmol, 10.0 Äq) bei Raumtemperatur hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 56 °C gerührt. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 19:1 → 4:1) aufgereinigt. Es wurde ein **80** als gelber Schaum in einem Diastereomergemisch aus 2 Diastereomeren erhalten (3.80 g, 3.41 mmol, 78%). Das Diastereomergemisch wurde nicht aufgetrennt, da es keinen Einfluss auf das Endprodukt hat, und direkt weiterverwendet.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 11.39 (s, 1H,  $\text{gNH}^1$ ), 11.23 (s, 1H, NHBz), 8.76 (dd,  $J = 9.0, 5.7$  Hz, 1H,  $\text{aH}^8$ ), 8.47 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H, N=CH-N), 8.22 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H,  $\text{aH}^2$ ), 8.05 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, Bz), 7.65 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, Bz), 7.55 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, Bz), 6.08 (m,  $J = 7.1, 3.1$  Hz, 1H,  $\text{gH}^1$ ), 5.86 (m,  $J = 13.5, 6.5$  Hz, 1H,  $\text{aH}^1$ ), 5.16 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H,  $\text{aH}^2$ ), 5.05 (s, 1H,  $\text{aH}^3$ ), 4.92 (t, 1H,  $J = 4.5, \text{gH}^2$ ), 4.59 (m,  $J = 4.5, 2.1$  Hz, 1H,  $\text{gH}^4$ ), 4.55 (t,  $J = 4.4$  Hz, 1H,  $\text{gH}^3$ ), 4.34 (s, 1H,  $\text{gH}^5$ ), 4.32 – 4.09 (m, 8H,  $2 \times \text{OC}_2\text{H}_4\text{CN}$ ), 3.83 – 3.77 (m, 1H,  $\text{aH}^5$ ), 3.69 (m,  $J = 6.5, 1.8$  Hz, 4H,  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 3.59 – 3.46 (m, 12H,  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 3.41 (t,  $J = 2.4$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.23 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.04 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.91 (t,  $J = 5.9$  Hz, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 0.92 (s, 9H, *t*Bu), 0.64 (s, 9H, *t*Bu), 0.18 (d,  $J = 6.3$  Hz, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.12 (d, 3H, Si-CH<sub>3</sub>), -0.30 (d, 3H, Si-CH<sub>3</sub>).

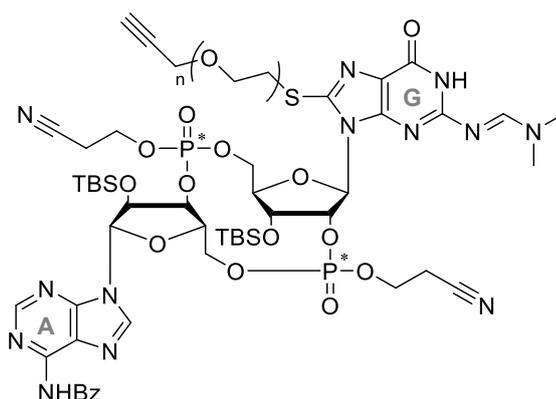
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 128.5 (Bz), 69.7, 69.7, 69.5, 68.5 ( $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 57.5 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 25.9 (*t*Bu), 25.8 (*t*Bu), 25.3 (*t*Bu), 25.2 (*t*Bu), -5.3 (Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = -0.09, -1.94, -2.50.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 1432.5161$  [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>59</sub>H<sub>88</sub>N<sub>13</sub>O<sub>19</sub>P<sub>2</sub>SSi<sub>2</sub><sup>+</sup>: 1432.5054).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3246 (vw), 2930 (w), 2858 (w), 2361 (vw), 1696 (m), 1684 (m), 1654 (m), 1629 (m), 1559 (m), 1529 (m), 1509 (m), 1490 (m), 1473 (m), 1457 (m), 1339 (m), 1250 (m), 1153 (s), 1076 (s), 1003 (s), 836 (s), 780 (s), 711 (m), 435 (m), 420 (m), 411 (m)

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 17:3):** 0.07 (ANIS).

**Geschütztes zyklisches 2',3'-C8S<sup>Linker</sup>Guanosin-N6<sup>Bz</sup>Adenosin-phosphat (81)**

**80** (3.33 g, 2.33 mmol, 1.00 Äq) wurde zweimal mit trockenem Pyridin (je 200 mL) co-evaporiert, und in Pyridin angelöst (800 mL). MSNT (3.45 g, 11.6 mmol, 5.00 Äq) wurde unter Argonatmosphäre zur Reaktionsmischung zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und anschließend mit Acetonitril co-evaporiert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silikagel, DCM:MeOH = 97:3 → 9:1) aufgereinigt und es wurde **81** als gelber Feststoff in einem Diastereomergemisch aus 4 Diastereomeren erhalten (2.74 g, 2.33 mmol, 83%). Das Diastereomergemisch wurde nicht aufgetrennt, da es keinen Einfluss auf die nachfolgende Synthese hat, und direkt weiterverwendet.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 11.47 (s, 1H,  $\text{G-NH}^1$ ), 11.25 (s, 1H, NHBz), 8.82 – 8.72 (m, 1H,  $\text{A-H}^8$ ), 8.61 – 8.55 (m, 1H, N=CH-N), 8.04 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, Bz), 7.68 – 7.62 (m, 1H, Bz), 7.55 (td,  $J = 7.9, 1.9$  Hz, 2H, Bz), 6.18 (dd,  $J = 15.8, 6.5$  Hz, 2H,  $\text{G-H}^1$ ), 5.75 (s, 1H,  $\text{A-H}^1$ ), 5.06 (s, 1H,  $\text{A-H}^3$ ), 4.83 – 4.77 (m, 1H,  $\text{G-H}^2$ ), 4.61 (s, 1H,  $\text{G-H}^4$ ), 4.32 – 4.12 (m, 8H,  $2 \times \text{OC}_2\text{H}_4\text{CN}$ ), 3.73 – 3.65 (m, 4H,  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 3.57 – 3.46 (m, 12H,  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 3.41 (t,  $J = 2.4$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.18 (d,  $J = 13.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.04 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.03 – 2.91 (m, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 0.99 – 0.88 (m, 9H, *t*Bu), 0.72 (s, 9H, *t*Bu), 0.23 – 0.15 (m, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.29 (s, 3H, Si-CH<sub>3</sub>).

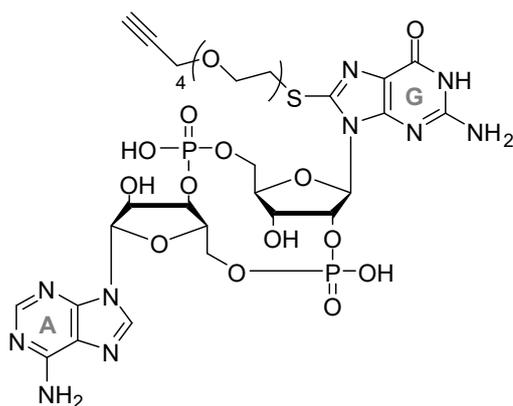
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 163.1, 146.3, 124.1, 69.7, 65.3 ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ )<sub>n</sub>, 63.9, 57.5 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 25.7 (*t*Bu).

**<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = -0.06, -1.04, -6.71, -7.02.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 1414.5056$  [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>59</sub>H<sub>86</sub>N<sub>13</sub>O<sub>18</sub>P<sub>2</sub>SSi<sub>2</sub><sup>+</sup>: 1414.4948).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2957 (w), 2927 (w), 2857 (w), 2361 (vw), 1697 (m), 1684 (m), 1654 (m), 1558 (m), 1521 (m), 1490 (m), 1458 (m), 1379 (m), 1306 (m), 1255 (m), 1179 (m), 1106 (m), 1018 (m), 980 (m), 878 (s), 833 (m), 782 (m), 710 (m), 647 (m), 445 (m), 435 (m), 405 (m).

**R<sub>f</sub> (DCM:MeOH = 9:1):** 0.65 (ANIS).

**Zyklisches 2',3'-C8S<sup>Linker</sup>Guanosin-Adenosin-monophosphat (82)**

**81** (1.00 g, 707  $\mu\text{mol}$ ) wurde unter Argonatmosphäre in einer Lösung von Methylamin in absolutem EtOH (33%, 240 mL) gelöst und die Reaktionsmischung wurde für 3.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand zweimal mit Pyridin co-evaporiert und unter Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in Pyridin gelöst (7 mL), in ein Plastikgefäß transferiert und mit trockenem THF (33 mL) verdünnt. Zur Reaktionsmischung wurde TREAT-HF (7 mL) gegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges HF wurde mit TMSOMe (17 mL) gequench, das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt, aufgenommen in wenig MeOH, aus kaltem absolutem Aceton präzipitiert. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand abdekantiert und das Rohprodukt mittels RP-HPLC aufgereinigt (TFA, 0–80% B über 45 min @ 45mL/min). **82** wurde nach Lyophilisieren als weißer Feststoff erhalten (207 mg, 225  $\mu\text{mmol}$ , 32%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 10.59 (s, 1H,  $\text{G-NH}^1$ ), 8.78 (s, 1H,  $\text{A-H}^8$ ), 8.46 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H,  $\text{A-H}^2$ ), 8.31 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{A-NH}_2$ ), 7.81 (d, 2H,  $\text{G-NH}_2$ ), 6.00 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H,  $\text{G-H}^1$ ), 5.90 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H,  $\text{A-H}^1$ ), 5.00 (q,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $\text{A-H}^3$ ), 4.89 (d, 1H,  $J = 21.3$  Hz,  $\text{G-H}^2$ ), 4.42 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H,  $\text{G-H}^3$ ), 4.36 (m, 1H,  $\text{A-H}^2$ ), 4.31 – 4.23 (m, 1H,  $\text{A-H}^4$ ), 4.18 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $\text{G-H}^4$ ), 4.13 (t,  $J = 2.1$  Hz, 2H,  $\text{G-H}_{a/b}^{5'}$ ), 4.00 (s, 2H,  $\text{A-H}_{a/b}^{5'}$ ), 3.68–3.60 (m, 2H,  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 3.56–3.47 (m, 12H,  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 3.42 (t, 1H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.25 (m,  $J = 13.3, 6.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ).

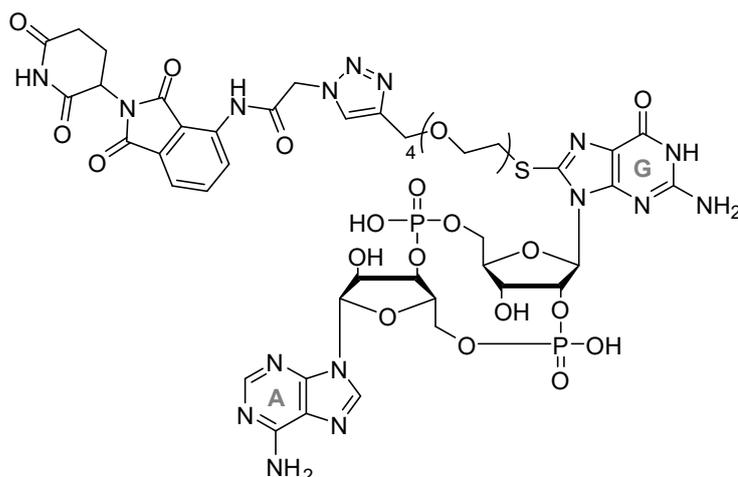
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 80.4 ( $\text{C}^2$ ), 77.2 ( $\text{C}^3$ ), 69.8, 69.7, 69.7, 69.6, 69.5, 68.5 ( $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 57.5 ( $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ).

**<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 1.56, -0.02.

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):**  $m/z = 459.0882$  [ $\text{M}-2\text{H}$ ]<sup>2-</sup> (calcd. for  $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_{10}\text{O}_{17}\text{P}_2\text{S}^{2-}$ : 459.0890).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3102 (w), 2934 (w), 2917 (w), 2882 (w), 2361 (vw), 1707 (vw), 1700 (m), 1684 (m), 1670 (m), 1654 (m), 1558 (m), 1560 (m), 1541 (m), 1507 (m), 1490 (m), 1458 (m), 1223 (s), 1201 (s), 1132 (S) 1069 (s), 1034 (s), 993 (m), 967 (m), 892 (m), 846 (m), 801 (m), 800 (m), 756 (m), 719 (m), 681 (m), 607, 443 (m), 435 (m), 407 (m).

**R<sub>f</sub> (TFA, 0–40% B über 30 min, 45 mL/min):** 21.2 min.

**cG<sup>C8</sup>AMP-4-POM (83a)**

Die folgende Reaktion wurde unter Argonatmosphäre durchgeführt, alle Lösungen wurden vor der Verwendung frisch hergestellt und entgast und der Reaktionsfortschritt mittels LCMS kontrolliert. Zu **82** (10.0 mg, 10.9  $\mu\text{mol}$ , 1.00  $\text{\AA}q$ ) und THPTA (23.6 mg, 54.3  $\mu\text{mol}$ , 5.00  $\text{\AA}q$ ) in einem Mikroreaktionsgefäß wurde Azid **54a** (7.74 mg, 21.7  $\mu\text{mol}$ , 2.00  $\text{\AA}q$ ) gelöst in DMSO (550  $\mu\text{L}$ ) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit DMSO (128  $\mu\text{L}$ ) und Reinstwasser (224  $\mu\text{L}$ ) verdünnt, anschließend wurde wässrige  $\text{CuSO}_4$ -Lösung (100 mM, 110  $\mu\text{L}$ , 11  $\mu\text{mol}$ , 1.00  $\text{\AA}q$ ) zugegeben. Nach vollständiger Vermischung wurde zur blauen Reaktionsmischung wässrige NaAsc-Lösung (1.00 M, 88  $\mu\text{L}$ ) zugegeben und die nun gelbe Reaktionsmischung gerührt, bis kein Startmaterial mehr gefunden wurde. Die Reaktionsmischung wurde mit Reinstwasser verdünnt, gefriergetrocknet und am nächsten Tag mittels RP-HPLC aufgereinigt (TFA, 0–80% B über 45 min @ 1 mL/min). Es wurde **83a** nach Lyophilisieren als weißer Feststoff erhalten (13.7 mg, 10.7  $\mu\text{mol}$ , quantitativ).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 11.16 (s, 1H,  $\text{G-NH}^1$ ), 10.55 (s, 1H, NH), 10.20 (s, 1H, NH), 8.20 (s, 1H,  $\text{A-H}^2$ ), 8.15 (s, 1H,  $\text{A-H}^8$ ), 7.85 (m,  $J = 8.4, 7.3$  Hz, 1H, Ar), 7.76 (s, 1H, Triazol), 7.67 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, Ar), 7.21 (s, 1H, Ar), 7.11 (s, 2H,  $\text{A-NH}_2$ ), 7.01 (s, 2H,  $\text{G-NH}_2$ ), 5.95 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H,  $\text{G-H}^1$ ), 5.83 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H,  $\text{A-H}^1$ ), 5.55 (d, 2H, Triazol- $\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.15 (dd,  $J = 12.9, 5.4$  Hz, 1H,  $\text{A-H}^2$ ), 4.95 (q,  $J = 4.8$  Hz, 1H,  $\text{A-H}^3$ ), 4.57 (s, 2H,  $\text{A/G-H}_2^5$ ), 4.39 (d,  $J = 4.3$  Hz, 1H,  $\text{G-H}^3$ ), 4.36 (s, 1H), 4.28 (dt,  $J = 8.8, 3.0$  Hz, 1H,  $\text{A-H}^4$ ), 4.19 (q,  $J = 9.8$  Hz, 1H,  $\text{G-H}^4$ ), 4.15 – 4.10 (m, 1H,  $\text{G-H}^2$ ), 3.99 – 3.91 (m, 2H,  $\text{A/G-H}_2^5$ ), 3.64 (m,  $J = 6.4, 1.7$  Hz, 2H,  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 3.59 – 3.48 (m, 14H,  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 3.26 (dp,  $J = 13.1, 6.7$  Hz, 2H,  $\text{C(=O)CH}_2\text{-Triazol}$ ), 3.07 (m,  $J = 7.3, 4.7$  Hz, 1H), 2.90 (m,  $J = 17.0, 13.8, 5.4$  Hz, 1H), 2.62 – 2.52 (m, 1H), 2.08 (m,  $J = 12.9, 5.3, 2.3$  Hz, 1H).

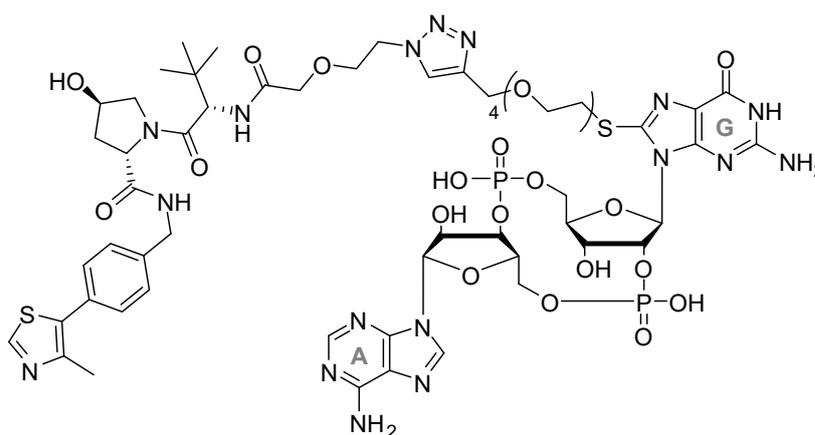
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 172.3 (NHCO), 167.1 (NHCO), 165.7 (NCO), 144.0 ( $\text{C}^8$ ), 125.7 (Ar), 119.2 (Ar), 69.8, 69.8, 69.7, 69.6, 69.0, 68.8 ( $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 63.4, 52.3, 49.0, 30.9, 22.0, 8.56.

**<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 2.06, -0.00.

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):**  $m/z = 637.1321$  [M-2H]<sup>2-</sup> (calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>52</sub>N<sub>16</sub>O<sub>22</sub>P<sub>2</sub>S<sup>2-</sup>: 637.1325).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3120 (w), 2924 (w), 2883 (w), 2125 (vw), 1770 (vw), 1706 (s), 1618 (m), 1536 (w), 1507 (m), 1478 (w), 1462 (w), 1398 (m), 1347 (m), 1294 (m), 1225(m), 1201 (m), 1132 (s) 1070 (s), 994 (m), 971 (m), 891 (m), 846 (m), 747 (m), 720 (m), 598(m), 543 (m), 445 (m), 440 (m), 426 (m), 404 (m).

**R<sub>f</sub> (LCMS: 5–80% MeCN + 0.1% (v/v) Ameisensäure über 7 min):** 4.36 min.

**c<sup>C8</sup>GAMP-4-AHPC (83b)**

Die folgende Reaktion wurde unter Argonatmosphäre durchgeführt, alle Lösungen wurden vor der Verwendung frisch hergestellt und entgast und der Reaktionsfortschritt mittels LCMS kontrolliert. Zu **82** (10.0 mg, 10.9  $\mu\text{mol}$ , 1.00 Äq) und THPTA (23.6 mg, 54.3  $\mu\text{mol}$ , 5.00 Äq) in einem Mikroreaktionsgefäß wurde Azid **84a** (12.3 mg, 22.0  $\mu\text{mol}$ , 2.00 Äq) gelöst in DMSO (550  $\mu\text{L}$ ) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit DMSO (128  $\mu\text{L}$ ) und Reinstwasser (224  $\mu\text{L}$ ) verdünnt, anschließend wurde wässrige  $\text{CuSO}_4$ -Lösung (100 mM, 110  $\mu\text{L}$ , 11.0  $\mu\text{mol}$ , 1.00 Äq) zugegeben. Nach vollständiger Vermischung wurde zur blauen Reaktionsmischung wässrige NaAsc-Lösung (1.00 M, 88  $\mu\text{L}$ ) zugegeben und die nun gelbe Reaktionsmischung gerührt, bis kein Startmaterial mehr gefunden wurde. Die Reaktionsmischung wurde mit Reinstwasser verdünnt, gefriergetrocknet und am nächsten Tag mittels RP-HPLC aufgereinigt (TFA, 0–80% B über 45 min @ 1 mL/min). Es wurde **83b** nach Lyophilisieren als weißer Feststoff erhalten (15.3 mg, 10.5  $\mu\text{mol}$ , 96%).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 10.60 (s, 1H,  $_{\text{G}}\text{NH}^1$ ), 8.98 (s, 1H, Thiazol), 8.59 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ), 8.44 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ), 8.27 (s, 1H,  $_{\text{A}}\text{H}^2$ ), 8.09 (s, 1H,  $_{\text{A}}\text{H}^8$ ), 7.40 (s, 4H, Ar), 7.12 (s, 2H,  $_{\text{A}}\text{NH}_2$ ), 7.01 (s, 2H,  $_{\text{G}}\text{NH}_2$ ), 5.99 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H,  $_{\text{G}}\text{H}^1$ ), 5.88 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H,  $_{\text{A}}\text{H}^1$ ), 4.97 (q,  $J = 4.6$  Hz, 1H,  $_{\text{A}}\text{H}^2$ ), 4.92 (t,  $J = 4.9$  Hz, 1H,  $_{\text{A}}\text{H}^3$ ), 4.60 – 4.56 (m, 2H,  $_{\text{A/G}}\text{H}_2^5$ ), 4.53 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H, Pyrrolidin), 4.50 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 4.44 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H,  $_{\text{G}}\text{H}^3$ ), 4.41 (dt,  $J = 6.5, 3.9$  Hz, 1H), 4.37 – 4.30 (m, 1H,  $_{\text{A}}\text{H}^4$ ), 4.25 (m,  $J = 16.1, 6.9$  Hz, 1H,  $_{\text{G}}\text{H}^4$ ), 4.18 – 4.13 (m, 1H,  $_{\text{G}}\text{H}^2$ ), 4.04 – 3.92 (m, 2H,  $_{\text{A/G}}\text{H}_2^5$ ), 3.89 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H, Triazol- $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.62 – 3.43 (m, 12H,  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 3.25 (m,  $J = 13.1, 6.7$  Hz, 2H, Triazol- $\text{CH}_2$ ), 2.44 (s, 3H, Methylthiazol), 2.09 – 2.02 (m, 2H, Pyrrolidin), 1.90 (m, 2H, Pyrrolidin), 0.91 (s, 9H, *t*Bu).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 171.8 (NHCO), 169.1 (NHCO), 168.2(NCO), 151.5, 147.7, 143.9 ( $_{\text{C}}\text{C}^8$ ), 139.5, 131.2, 129.7, 128.7, 127.5, 124.3 (Ar), 69.8, 69.7, 69.6, 69.2, 69.1, 69.0, 68.9, 68.8 ( $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ ), 63.5, 58.8, 56.6, 55.8, 49.2, 35.6, 26.2 (*t*Bu).

**<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 1.75, -0.00.

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):**  $m/z = 737.9000$  [M-2H]<sup>2-</sup> (calcd. for C<sub>57</sub>H<sub>75</sub>N<sub>17</sub>O<sub>22</sub>P<sub>2</sub>S<sup>2-</sup>: 737.7095).

**FT-IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3285 (w), 3081 (w), 2934 (w), 2875 (w, C-H), 2162 (vw), 2104 (vw), 1668 (s), 1626 (m), 1526 (w), 1436 (m), 1418 (m), 1370, 1347 (m), 1299 (m), 1224 (m), 1199 (m), 1129 (s), 1107 (s), 1072 (s), 1033 (m), 967 (m), 888 (m), 845 (m), 799 (m), 747 (m), 719 (m), 702 (m), 545 (m), 519 (m), 445 (m), 441 (m), 427 (m), 417 (m), 402 (m).

**R<sub>f</sub> (LCMS: 5–80% MeCN + 0.1% (v/v) Ameisensäure über 7 min):** 5.31 min.



**102 (deoxy-5'-AGTCAGTCAGTCAGTCAGTC-3')**

**102** wurde unter den zuvor genannten Bedingungen mit I<sub>2</sub> als Oxidationsmittel hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 24% erhalten, mit einer statistischen Ausbeute von 94% pro Kopplungsschritt.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):** m/z = 7352.01 calcd. C<sub>234</sub>H<sub>295</sub>N<sub>90</sub>O<sub>142</sub>P<sub>23</sub>: 7351.27.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** = 20.0 min.

**103 (deoxy-5'-GACTGACTGACTGACTGACT-3')**

**103** wurde unter den zuvor genannten Bedingungen mit I<sub>2</sub> als Oxidationsmittel hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 17% erhalten, mit einer statistischen Ausbeute von 93% pro Kopplungsschritt.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):** m/z = 7352.37 calcd. C<sub>234</sub>H<sub>295</sub>N<sub>90</sub>O<sub>142</sub>P<sub>23</sub>: 7351.27.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** = 20.0 min.

**104 (deoxy-5'-<sup>PS</sup>TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**104** wurde unter den zuvor genannten Bedingungen mit DDTT als Sulfurylierungsmittel hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 36% erhalten, mit einer statistischen Ausbeute von 96% pro Kopplungsschritt.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):** m/z = 7942.52 calcd. C<sub>240</sub>H<sub>297</sub>N<sub>96</sub>O<sub>123</sub>P<sub>23</sub>S<sub>23</sub>: 7942.75.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 29.4 min.

**105 (deoxy-5'-AGTCAGTCAGTCAGTCAGTC-3')**

**105** wurde unter den zuvor genannten Bedingungen mit DDTT als Sulfurylierungsmittel hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 16% erhalten, mit einer statistischen Ausbeute von 93% pro Kopplungsschritt.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):** m/z = 7719.43 calcd. C<sub>234</sub>H<sub>295</sub>N<sub>90</sub>O<sub>119</sub>P<sub>23</sub>S<sub>23</sub>: 7720.73.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 29.6 min.

**106 (deoxy-5'-GACTGACTGACTGACTGACTGACT-3')**

**106** wurde unter den zuvor genannten Bedingungen mit DDTT als Sulfurylierungsmittel hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 11% erhalten, mit einer statistischen Ausbeute von 91% pro Kopplungsschritt.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 7719.04$  calcd.  $C_{234}H_{295}N_{90}O_{119}P_{23}S_{23}$ : 7720.73.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 29.3 min.

**107 (deoxy-5'-<sup>PS</sup>T[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**107** wurde unter den zuvor genannten Bedingungen mit DDTT als Sulfurylierungsmittel hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 28% erhalten, mit einer statistischen Ausbeute von 95% pro Kopplungsschritt.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 8033.92$  calcd.  $C_{247}H_{303}N_{96}O_{123}P_{23}S_{23}$ : 8032.80.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 30.9 min.

**108 (deoxy-5'-<sup>PS</sup>TTAGGGT[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**108** wurde unter den zuvor genannten Bedingungen mit DDTT als Sulfurylierungsmittel hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 26% erhalten, mit einer statistischen Ausbeute von 94% pro Kopplungsschritt.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 8034.52$  calcd.  $C_{247}H_{303}N_{96}O_{123}P_{23}S_{23}$ : 8032.80.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 32.2 min.

## 5.4.2 Endstufenmodifikation der Oligonukleotide

Alle Lösungen wurden vor und nach dem Ansetzen der Reaktion mit Argon entgast und die Reaktionen wurden unter Argonatmosphäre in Mikroreaktionsgefäßen durchgeführt. 5 nmol Oligonukleotid (0.5 mM in H<sub>2</sub>O, 10 µL, 1.00 Äq) wurden mit 50 nmol des zu verknüpfenden Azids (33.0 mM in DMSO, 1.55 µL, 10.0 Äq), 75 nmol von CuBr × Me<sub>2</sub>S (100 mM in DMSO, 0.75 µL, 15.0 Äq) und 100 nmol von NaAsc (150 mM in H<sub>2</sub>O, 0.67 µL, 20.0 Äq) und versetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit DMSO (10 µL) verdünnt und anschließend unter Argonatmosphäre bei 30 °C und 2000 rpm in einem Thermoshaker der Firma Eppendorf für 18 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung in einen Amicon 3 kDa MWCO-Filter der Firma Merck Millipore transferiert, dann zweimal gewaschen, mittels RP-HPLC in einem geeigneten Puffersystem aufgereinigt, entsalzt und mittels MALDI charakterisiert. Ausbeuten wurden über das Integral des RP-HPLC-Chromatogramms bestimmt.

**109a (POM1-deoxy-5'-<sup>PS</sup>T[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**109a** wurde unter den zuvor genannten Click-Bedingungen aus Oligonukleotid **107** und **54a** hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 44% erhalten.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 8392.03$  calcd.  $C_{262}H_{315}N_{102}O_{128}P_{23}S_{23}$ : 8388.88.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 36.9 min.

**110a (POM1-deoxy-5'-<sup>PS</sup>TTAGGGT[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**110a** wurde unter den zuvor genannten Click-Bedingungen aus Oligonukleotid **108** und **54a** hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 49% erhalten.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 8392.03$  calcd.  $C_{262}H_{315}N_{102}O_{128}P_{23}S_{23}$ : 8388.88.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 35.2 min.

**109b (POM3-deoxy-5'-<sup>PS</sup>T[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**109b** wurde unter den zuvor genannten Click-Bedingungen aus Oligonukleotid **107** und **54b** hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 37% erhalten.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 8419.73$  calcd.  $C_{264}H_{319}N_{102}O_{128}P_{23}S_{23}$ : 8416.92.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 37.9 min.

**110b (POM3-deoxy-5'-<sup>PS</sup>TTAGGGT[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**110b** wurde unter den zuvor genannten Click-Bedingungen aus Oligonukleotid **108** und **54b** hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 63% erhalten.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = \text{gefunden } 8419.13$  calcd.  $C_{264}H_{319}N_{102}O_{128}P_{23}S_{23}$ : 8416.92.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 36.1 min.

**109c (VHL1-deoxy-5'-P<sup>S</sup>T[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**109c** wurde unter den zuvor genannten Click-Bedingungen aus Oligonukleotid **107** und **84a** hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 61% erhalten.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 8592.68$  calcd. C<sub>273</sub>H<sub>338</sub>N<sub>103</sub>O<sub>128</sub>P<sub>23</sub>S<sub>24</sub>: 8592.14.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 40.9 min.

**110c (VHL1-deoxy-5'-P<sup>S</sup>TTAGGGT[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**110c** wurde unter den zuvor genannten Click-Bedingungen aus Oligonukleotid **108** und **84a** hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 75% erhalten.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 8594.35$  calcd. C<sub>273</sub>H<sub>338</sub>N<sub>103</sub>O<sub>128</sub>P<sub>23</sub>S<sub>24</sub>: 8592.14.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 38.7 min.

**109d (VHL2-deoxy-5'-P<sup>S</sup>T[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**109d** wurde unter den zuvor genannten Click-Bedingungen aus Oligonukleotid **107** und **84b** hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 60% erhalten.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 8636.90$  calcd. C<sub>275</sub>H<sub>342</sub>N<sub>103</sub>O<sub>129</sub>P<sub>23</sub>S<sub>24</sub>: 8636.19.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 42.1 min.

**110d (VHL2-deoxy-5'-P<sup>S</sup>TTAGGGT[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**110d** wurde unter den zuvor genannten Click-Bedingungen aus Oligonukleotid **108** und **84b** hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 69% erhalten.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 8635.27$  calcd. C<sub>275</sub>H<sub>342</sub>N<sub>103</sub>O<sub>129</sub>P<sub>23</sub>S<sub>24</sub>: 8636.19.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 39.6 min.

**109e (VHL3-deoxy-5'-<sup>PS</sup>T[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**109e** wurde unter den zuvor genannten Click-Bedingungen aus Oligonukleotid **107** und **84c** hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 52% erhalten.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 8682.71$  calcd.  $C_{277}H_{346}N_{103}O_{130}P_{23}S_{24}$ : 8680.24.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 42.7 min.

**110e (VHL3-deoxy-5'-<sup>PS</sup>TTAGGGT[c8U]AGGGTTAGGGTTAGGG-3')**

**110e** wurde unter den zuvor genannten Click-Bedingungen aus Oligonukleotid **108** und **84c** hergestellt und mittels RP-HPLC (0.1 M TEAA, 0–40% B, 45 min) aufgereinigt. Es wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 53% erhalten.

**LRMS (MALDI-TOF, HPA):**  $m/z = 8681.82$  calcd.  $C_{277}H_{346}N_{103}O_{130}P_{23}S_{24}$ : 8680.24.  
**R<sub>t</sub> (TEAA, 0-40% B über 45 min, 1 mL/min):** 40.2 min.

## 5.5 Untersuchung der hydrolytischen Stabilität

Zur Untersuchung der Stabilität gegenüber wässriger Hydrolyse wurden folgende Substanzen hauptsächlich auf den Einfluss von Wasser, FBS, anorganischen Salzen und pH-Wert hin untersucht. Allen Untersuchungen gemein ist die Auswertung der Integrale in bestimmten Abständen gegenüber dem Integral der Ausgangssubstanz bei  $t_0$ . Hierfür wurden die Integrale prozentual mit dem der Ausgangssubstanz in der jeweiligen wässrigen Umgebung bei  $t_0$  verglichen und als Balkendiagramm aufgetragen, Ausreißer wurden ausgelassen. (siehe **Kapitel 3.3**). Die Substanzen wurden in wässrigen Lösungen der jeweiligen zu testenden Bedingungen gelöst, in einer *Shimadzu LC-2060C 3D* bei 37 °C inkubiert und in definierten Abständen über eine *EC 250/4 NUCLEODUR 100-3 C18ec* Säule von *Macherey-Nagel* mittels TEAA-Puffer bei einer Flussrate von 1 mL/min über 30 min aufgereinigt. Die injizierten Mengen und die jeweils verwendeten Gradienten ändern sich in Abhängigkeit der getesteten Substanzklasse, wurden aber innerhalb der Messreihe konstant gehalten. Für zyklische Dinukleotide wurden 5 nmol Substanz in 20 µL pro Messpunkt für die jeweilige zu testenden Bedingung gelöst (bei 6 Messpunkten also mindestens 30 nmol in 120 µL). Zur Untersuchung von CRBN-Rekruter wurden 10 nmol geklickter Substanzen und 15 nmol ungeclickter Substanzen unter ebendiesen Bedingungen injiziert. Methoden und Bedingungen für die jeweiligen Substanzen sind in den nachfolgenden **Tabellen 9** und **10** aufgelistet.

## 5.5 Untersuchung der hydrolytischen Stabilität

**Tabelle 9.** Untersuchung der Hydrolyse von CRBN-Rekrutern mittels RP-HPLC bei einer Flussrate 1 mL/min.

SUBSTANZ	Medium	Methode	Injektion	Zeitpunkte
POM-C <sub>1</sub> -N <sub>3</sub> ( <b>54A</b> )	H <sub>2</sub> O bei pH 5 und pH 8 (gepuffert)	0.1 M TEAA, 0–50% B, 30 min	15 nmol in 20 µL	0, 4, 12 h bei 37 °C
POM-C <sub>3</sub> -N <sub>3</sub> ( <b>54B</b> )	H <sub>2</sub> O bei pH 5 und pH 8 (gepuffert)	0.1 M TEAA, 0–50% B, 30 min	15 nmol in 20 µL	0, 4, 12 h bei 37 °C
POM-C <sub>1</sub> -PEG <sub>4</sub> ( <b>114A</b> )	H <sub>2</sub> O bei pH 5 und pH 8 (gepuffert)	0.1 M TEAA, 0–50% B, 30 min	10 nmol in 20 µL	0, 4, 12 h bei 37 °C
POM-C <sub>3</sub> -PEG <sub>4</sub> ( <b>114B</b> )	H <sub>2</sub> O bei pH 5 und pH 8 (gepuffert)	0.1 M TEAA, 0–50% B, 30 min	10 nmol in 20 µL	0, 4, 12 h bei 37 °C
POM-YNE ( <b>115</b> )	RPMI-1640 mit/ ohne 10% FBS	0.1 M TEAA, 0–50% B, 30 min	15 nmol in 20 µL	0, 4, 8, 12 h bei 37 °C
POM-PEG <sub>1</sub> -N <sub>3</sub> ( <b>116</b> )	RPMI-1640 mit/ ohne 10% FBS	0.1 M TEAA, 0–50% B, 30 min	15 nmol in 20 µL	0, 4, 8, 12 h bei 37 °C
POM ( <b>117</b> )	RPMI-1640 mit/ ohne 10% FBS	0.1 M TEAA, 0–50% B, 30 min	15 nmol in 20 µL	0, 4, 8, 12 h bei 37 °C
LEN ( <b>118</b> )	RPMI-1640 mit/ ohne 10% FBS	0.1 M TEAA, 0–50% B, 30 min	15 nmol in 20 µL	0, 4, 8, 12 h bei 37 °C

**Tabelle 10.** Untersuchung der CDN-Derivate mittels RP-HPLC bei einer Flussrate 1 mL/min.

SUBSTANZ	Medium	Methode	Injektion	Zeitpunkte
cGAMP ( <b>1</b> )	RPMI-1640 mit 10% FBS	0.1 M TEAA, 0–100% B, 30 min	10 nmol in 20 µL	0, 2, 4, 8, 12 h bei 37 °C
„	RPMI-1640 mit/ohne FBS (je 10%)	0.1 M TEAA, 0–100% B, 45 min	5 nmol in 20 µL	0, 4, 8, 16, 24 h bei 37 °C
CDG-O <sup>6</sup> 4-POM ( <b>55</b> )	RPMI-1640 mit 10% FBS	0.1 M TEAA, 0–30% B, 30 min	10 nmol in 20 µL	0, 2, 4, 8, 12 h bei 37 °C
„	RPMI-1640 mit 10% FBS	0.1 M TEAA, 0–100% B, 45 min	10 nmol in 20 µL	6, 10, 16 h bei 37 °C
„	RPMI-1640 mit Na <sub>2</sub> EDTA (1, 10, 100 mM)	0.1 M TEAA, 0–100% B, 30 min	5 nmol in 20 µL	0, 4, 8 h bei 37 °C
„	H <sub>2</sub> O mit verschiedenen Salzen (Na, K, Ca, Mg)	0.1 M TEAA, 0–30% B, 30 min	5 nmol in 20 µL	0, 4, 8, 12 h bei 37 °C
„	H <sub>2</sub> O bei pH 5 und pH 8 (gepuffert und ungepuffert)	0.1 M TEAA, 0–30% B, 30 min	5 nmol in 20 µL	0, 4, 8, 12 h bei 37 °C
„	RPMI-1640 bei pH 6 und pH 7.4 (gepuffert und ungepuffert)	0.1 M TEAA, 0–30% B, 30 min	5 nmol in 20 µL	0, 4, 8, 12 h bei 37 °C
cGAMP-PEG <sub>3</sub> - POM ( <b>112**</b> )	RPMI-1640 mit 10% FBS	0.1 M TEAA, 0–100% B, 45 min	10 nmol in 20 µL	6, 10, 16 h bei 37 °C
cGAMP-PEG <sub>3</sub> -YNE ( <b>113**</b> )	RPMI-1640 mit 10% FBS	0.1 M TEAA, 0–100% B, 45 min	10 nmol in 20 µL	6, 10, 16 h bei 37 °C

## 6 Quellenverzeichnis

- [1] Vickaryous *et al.*, Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest. *Biol. Rev.* **2006**, *81*, 425-455.
- [2] Fisher *et al.*, The evolution of host-symbiont dependence. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15973.
- [3] Nicholson *et al.*, Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 431-438.
- [4] Martin *et al.*, The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *6*, 133-148.
- [5] Medzhitov, Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **2007**, *449*, 819-826.
- [6] Turvey *et al.*, Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S24-S32.
- [7] Janeway *et al.*, Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 197-216.
- [8] Bonilla *et al.*, Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S33-S40.
- [9] Wang *et al.*, The interaction of innate immune and adaptive immune system. *MedComm* **2024**, *5*, e714.
- [10] Iwasaki *et al.*, Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 343-353.
- [11] Lam *et al.*, A guide to adaptive immune memory. *Nat. Rev. Immunol.* **2024**, *24*, 810-829.
- [12] Vénéreau *et al.*, DAMPs from Cell Death to New Life. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 422.
- [13] Silva-Gomes *et al.*, in *Encyclopedia of Inflammatory Diseases* (Ed.: M. Parnham), Springer Basel, Basel, **2015**, pp. 1-16.
- [14] Takeuchi *et al.*, Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **2010**, *140*, 805-820.
- [15] Miller *et al.*, Cytoplasmic DNA: sources, sensing, and role in aging and disease. *Cell* **2021**, *184*, 5506-5526.
- [16] Simpson *et al.*, TREX1 – Apex predator of cytosolic DNA metabolism. *DNA Repair* **2020**, *94*, 102894.
- [17] Roers *et al.*, Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity* **2016**, *44*, 739-754.
- [18] Kumar, The Trinity of cGAS, TLR9, and ALRs Guardians of the Cellular Galaxy Against Host-Derived Self-DNA. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 624597.
- [19] Jin *et al.*, Structures of the HIN Domain:DNA Complexes Reveal Ligand Binding and Activation Mechanisms of the AIM2 Inflammasome and IFI16 Receptor. *Immunity* **2012**, *36*, 561-571.
- [20] Dvorkin *et al.*, New frontiers in the cGAS-STING intracellular DNA-sensing pathway. *Immunity* **2024**, *57*, 718-730.
- [21] Sun *et al.*, Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science* **2013**, *339*, 786-791.
- [22] Wu *et al.*, Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. *Science* **2013**, *339*, 826-830.
- [23] Zhang *et al.*, Cyclic GMP-AMP Containing Mixed Phosphodiester Linkages Is An Endogenous High-Affinity Ligand for STING. *Mol. Cell* **2013**, *51*, 226-235.
- [24] Zhang *et al.*, Structures and Mechanisms in the cGAS-STING Innate Immunity Pathway. *Immunity* **2020**, *53*, 43-53.
- [25] He *et al.*, The journey of STING: Guiding immune signaling through membrane trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2024**, *78*, 25-36.
- [26] Blest *et al.*, cGAMP the travelling messenger. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1150705.
- [27] Hopfner *et al.*, Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 501-521.
- [28] Xie *et al.*, Human cGAS catalytic domain has an additional DNA-binding interface that enhances enzymatic activity and liquid-phase condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 11946-11955.
- [29] Ablasser, Phase separation focuses DNA sensing. *Science* **2018**, *361*, 646-647.

- [30] Du *et al.*, DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling. *Science* **2018**, *361*, 704-709.
- [31] Ablasser *et al.*, cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* **2013**, *498*, 380-384.
- [32] Diner *et al.*, The Innate Immune DNA Sensor cGAS Produces a Noncanonical Cyclic Dinucleotide that Activates Human STING. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 1355-1361.
- [33] Gao *et al.*, Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] Is the Metazoan Second Messenger Produced by DNA-Activated Cyclic GMP-AMP Synthase. *Cell* **2013**, *153*, 1094-1107.
- [34] Shu *et al.*, The mechanism of double-stranded DNA sensing through the cGAS-STING pathway. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25*, 641-648.
- [35] Ishikawa *et al.*, STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **2008**, *455*, 674-678.
- [36] Burdette *et al.*, STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 19-26.
- [37] Yi *et al.*, Single Nucleotide Polymorphisms of Human STING Can Affect Innate Immune Response to Cyclic Dinucleotides. *PLoS One* **2013**, *8*, e77846.
- [38] Shang *et al.*, Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP-AMP. *Nature* **2019**, *567*, 389-393.
- [39] Shang *et al.*, Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 725-727.
- [40] Ergun *et al.*, STING Polymer Structure Reveals Mechanisms for Activation, Hyperactivation, and Inhibition. *Cell* **2019**, *178*, 290-301.e210.
- [41] Yu *et al.*, Recent progress on the activation of the cGAS-STING pathway and its regulation by biomolecular condensation. *J. Mol. Cell. Biol.* **2022**, *14*, mjac042.
- [42] Taguchi *et al.*, STING Operation at the ER/Golgi Interface. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 646304.
- [43] Mukai *et al.*, Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11932.
- [44] Liu *et al.*, Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* **2015**, *347*, aaa2630.
- [45] Tanaka *et al.*, STING Specifies IRF3 Phosphorylation by TBK1 in the Cytosolic DNA Signaling Pathway. *Science Signaling* **2012**, *5*, ra20-ra20.
- [46] Yum *et al.*, TBK1 recruitment to STING activates both IRF3 and NF- $\kappa$ B that mediate immune defense against tumors and viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118*, e2100225118.
- [47] Sun *et al.*, ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 8653-8658.
- [48] Zhong *et al.*, The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation. *Immunity* **2008**, *29*, 538-550.
- [49] Balka *et al.*, TBK1 and IKK $\epsilon$  Act Redundantly to Mediate STING-Induced NF- $\kappa$ B Responses in Myeloid Cells. *Cell Rep.* **2020**, *31*, 107492.
- [50] Venkatraman *et al.*, IKK $\epsilon$  induces STING non-IFN immune responses via a mechanism analogous to TBK1. *iScience* **2024**, *27*, 110693.
- [51] Liu *et al.*, NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 17023.
- [52] Petro, IFN Regulatory Factor 3 in Health and Disease. *J. Immunol.* **2020**, *205*, 1981-1989.
- [53] Motwani *et al.*, DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **2019**, *20*, 657-674.
- [54] Zhu *et al.*, STING: a master regulator in the cancer-immunity cycle. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 152.
- [55] Yu *et al.*, cGAS/STING signalling pathway in senescence and oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **2024**, *106-107*, 87-102.
- [56] Liu *et al.*, The cGAS-STING Pathway in Bacterial Infection and Bacterial Immunity. *Front. Immunol.* **2022**, *12*, 814709.

- [57] Zhang *et al.*, The cGAS-STING pathway in viral infections: a promising link between inflammation, oxidative stress and autophagy. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1352479.
- [58] Benoit-Lizon *et al.*, CD4 T cell-intrinsic STING signaling controls the differentiation and effector functions of T(H)1 and T(H)9 cells. *The Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **2022**, *10*, e003459.
- [59] Woo *et al.*, STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Mediates Innate Immune Recognition of Immunogenic Tumors. *Immunity* **2014**, *41*, 830-842.
- [60] Deng *et al.*, STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* **2014**, *41*, 843-852.
- [61] Hengge, Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 263-273.
- [62] Halbritter *et al.*, A Phosphotriester-Masked Dideoxy-cGAMP Derivative as a Cell-Permeable STING Agonist. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, *63*, e202416353.
- [63] Stazzoni *et al.*, Novel Poxin Stable cGAMP-Derivatives Are Remarkable STING Agonists. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202207175.
- [64] Corrales *et al.*, Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep.* **2015**, *11*, 1018-1030.
- [65] Chang *et al.*, Discovery of MK-1454: A Potent Cyclic Dinucleotide Stimulator of Interferon Genes Agonist for the Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 5675-5689.
- [66] Kim *et al.*, E7766, a Macrocyclic-Bridged Stimulator of Interferon Genes (STING) Agonist with Potent Pan-Genotypic Activity. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 1741-1744.
- [67] Ramanjulu *et al.*, Design of amidobenzimidazole STING receptor agonists with systemic activity. *Nature* **2018**, *564*, 439-443.
- [68] Gao *et al.*, Structure-function analysis of STING activation by c[G(2',5')pA(3',5')p] and targeting by antiviral DMXAA. *Cell* **2013**, *154*, 748-762.
- [69] Lu *et al.*, Activation of STING by targeting a pocket in the transmembrane domain. *Nature* **2022**, *604*, 557-562.
- [70] Shih *et al.*, Dynamic Structural Differences between Human and Mouse STING Lead to Differing Sensitivity to DMXAA. *Biophys. J.* **2018**, *114*, 32-39.
- [71] Decout *et al.*, The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 548-569.
- [72] Wang *et al.*, STING-associated vasculopathy with onset in infancy: a familial case series report and literature review. *Ann. Transl. Med.* **2021**, *9*, 176.
- [73] Frémond *et al.*, COPA syndrome, 5 years after: Where are we? *Joint Bone Spine* **2021**, *88*, 105070.
- [74] Watkin *et al.*, COPA mutations impair ER-Golgi transport and cause hereditary autoimmune-mediated lung disease and arthritis. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 654-660.
- [75] Lee-Kirsch *et al.*, Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 1065-1067.
- [76] Stetson *et al.*, Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. *Cell* **2008**, *134*, 587-598.
- [77] Glass *et al.*, Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell* **2010**, *140*, 918-934.
- [78] Yu *et al.*, TDP-43 Triggers Mitochondrial DNA Release via mPTP to Activate cGAS/STING in ALS. *Cell* **2020**, *183*, 636-649.e618.
- [79] Domizio *et al.*, The cGAS-STING pathway drives type I IFN immunopathology in COVID-19. *Nature* **2022**, *603*, 145-151.
- [80] Haag *et al.*, Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors. *Nature* **2018**, *559*, 269-273.
- [81] Hansen *et al.*, Nitro-fatty acids are formed in response to virus infection and are potent inhibitors of STING palmitoylation and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, E7768-E7775.
- [82] Vinogradova *et al.*, An Activity-Guided Map of Electrophile-Cysteine Interactions in Primary Human T Cells. *Cell* **2020**, *182*, 1009-1026.e1029.
- [83] Siu *et al.*, Discovery of a Novel cGAMP Competitive Ligand of the Inactive Form of STING. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 92-97.

- [84] Li *et al.*, The Cyclopeptide Astin C Specifically Inhibits the Innate Immune CDN Sensor STING. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 3405-3421.e3407.
- [85] Wang *et al.*, Chemical evolution of cyclic dinucleotides: Perspective of the analogs and their preparation. *Tetrahedron* **2021**, *87*, 132096.
- [86] Clivio *et al.*, (3'-5')-Cyclic Dinucleotides: Synthetic Strategies and Biological Potential. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 7354-7401.
- [87] Caruthers, Gene Synthesis Machines: DNA Chemistry and Its Uses. *Science* **1985**, *230*, 281-285.
- [88] Caruthers, The Chemical Synthesis of DNA/RNA: Our Gift to Science. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 1420-1427.
- [89] Beaucage *et al.*, Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- [90] Obexer *et al.*, Modern approaches to therapeutic oligonucleotide manufacturing. *Science* **2024**, *384*, eadl4015.
- [91] Mohammed *et al.*, Oligonucleotides: evolution and innovation. *Med. Chem. Res.* **2024**, *33*, 2204-2220.
- [92] Nielsen *et al.*, Application of 2-cyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidite for in situ preparation of deoxyribonucleoside phosphoramidites and their use in polymer-supported synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 7391-7403.
- [93] Sinha *et al.*,  $\beta$ -Cyanoethyl N,N-dialkylamino/N-morpholinomono-chloro phosphoramidites, new phosphorylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5843-5846.
- [94] Nielsen *et al.*, Polymer-supported synthesis of deoxyoligonucleotides using in-situ prepared deoxynucleoside 2-cyanoethyl phosphoramidites. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1986**, *105*, 33-34.
- [95] Michelson *et al.*, Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage. *J. Chem. Soc.* **1955**, 2632-2638.
- [96] Hall *et al.*, 644. Nucleotides. Part XLI. Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleoside phosphates. *J. Chem. Soc.* **1957**, 3291-3296.
- [97] Froehler *et al.*, Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate Intermediates. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 5399-5407.
- [98] Stawinski *et al.*, Nucleoside H-Phosphonates. XI. A Convenient Method for the Preparation of Nucleoside H-Phosphonates. *Nucleosides Nucleotides* **1990**, *9*, 129-135.
- [99] Sigurdsson *et al.*, The H-phosphonate approach to oligonucleotide synthesis. An investigation on the mechanism of the coupling step. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 1682-1688.
- [100] Cullis *et al.*, The mechanism of iodine-water oxidation of H-phosphonate diesters. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1207-1208.
- [101] Garegg *et al.*, Nucleoside H-phosphonates. III. Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the hydrogenphosphonate approach. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4051-4054.
- [102] Garegg *et al.*, Nucleoside H-phosphonates. IV. Automated solid phase synthesis of oligoribonucleotides by the hydrogenphosphonate approach. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4055-4058.
- [103] Reese *et al.*, The H-phosphonate approach to the synthesis of oligonucleotides and their phosphorothioate analogues in solution. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 1477-1486.
- [104] Hyodo *et al.*, An Improved Method for Synthesizing Cyclic Bis(3'-5')diguanylic Acid (c-di-GMP). *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, *77*, 2089-2093.
- [105] Hyodo *et al.*, Synthesis of cyclic bis(3'-5')diguanylic acid (c-di-GMP) analogs. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3089-3094.
- [106] Gaffney *et al.*, One-Flask Syntheses of c-di-GMP and the [Rp,Rp] and [Rp,Sp] Thiophosphate Analogues. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3269-3271.
- [107] Gaffney *et al.*, One-Flask Synthesis of Cyclic Diguanosine Monophosphate (c-di-GMP). *Curr. Protoc.* **2023**, *3*, e740.
- [108] Wang *et al.*, in *Methods in Enzymology*, Vol. 625 (Ed.: J. Sohn), Academic Press, **2019**, pp. 41-59.

- [109] Martí-Centelles *et al.*, Macrocyclization Reactions: The Importance of Conformational, Configurational, and Template-Induced Preorganization. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8736-8834.
- [110] Lombard *et al.*, A brief history of vaccines and vaccination. *Rev. Sci. Tech.* **2007**, 29-48.
- [111] Filler, The History, Development and Impact of Computed Imaging in Neurological Diagnosis and Neurosurgery: CT, MRI, and DTI. *Nat. Preced.* **2009**.
- [112] Wainwright, The Mystery of the Plate: Fleming's Discovery and Contribution to the Early Development of Penicillin. *J. Med. Biogr.* **1993**, *1*, 59-65.
- [113] Lu *et al.*, Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* **2020**, *27*, 1.
- [114] Seley-Radtke *et al.*, The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res.* **2018**, *154*, 66-86.
- [115] Yates *et al.*, The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res.* **2019**, *162*, 5-21.
- [116] Sahin *et al.*, mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 759-780.
- [117] Gurevich *et al.*, in *Arrestins - Pharmacology and Therapeutic Potential* (Ed.: V. V. Gurevich), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2014**, pp. 1-12.
- [118] Lipinski, Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 337-341.
- [119] Lipinski *et al.*, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- [120] Dang *et al.*, Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 502-508.
- [121] Huang *et al.*, KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 386.
- [122] Xie *et al.*, Recent advances in targeting the “undruggable” proteins: from drug discovery to clinical trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, 335.
- [123] Cohen-Kaplan *et al.*, The ubiquitin-proteasome system and autophagy: Coordinated and independent activities. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2016**, *79*, 403-418.
- [124] Samarasinghe *et al.*, Targeted protein degradation: A promise for undruggable proteins. *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28*, 934-951.
- [125] Zhao *et al.*, Targeted protein degradation: mechanisms, strategies and application. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 113.
- [126] Fire *et al.*, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
- [127] Hu *et al.*, Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 101.
- [128] Crick, Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* **1970**, *227*, 561-563.
- [129] Kaushik *et al.*, Proteostasis and aging. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1406-1415.
- [130] Mizushima *et al.*, Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **2008**, *451*, 1069-1075.
- [131] Kleiger *et al.*, Perilous journey: a tour of the ubiquitin–proteasome system. *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 352-359.
- [132] Pohl *et al.*, Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science* **2019**, *366*, 818-822.
- [133] Sakamoto *et al.*, Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 8554-8559.
- [134] Melino *et al.*, Discovery of the ubiquitin proteasome system and its involvement in apoptosis. *Cell Death Differ.* **2005**, *12*, 1155-1157.
- [135] Ciechanover, Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 79-87.

- [136] Komander *et al.*, The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 203-229.
- [137] Roy *et al.*, SPR-Measured Dissociation Kinetics of PROTAC Ternary Complexes Influence Target Degradation Rate. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 361-368.
- [138] Schneider *et al.*, The PROTActable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 789-797.
- [139] Li *et al.*, Genome-Wide and Functional Annotation of Human E3 Ubiquitin Ligases Identifies MULAN, a Mitochondrial E3 that Regulates the Organelle's Dynamics and Signaling. *PLoS One* **2008**, *3*, e1487.
- [140] Lee *et al.*, in *Molecules*, Vol. 27, **2022**.
- [141] Sasso *et al.*, Molecular Glues: The Adhesive Connecting Targeted Protein Degradation to the Clinic. *Biochemistry* **2023**, *62*, 601-623.
- [142] Ohh *et al.*, Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 423.
- [143] Gossage *et al.*, VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 55-64.
- [144] Czyzyk-Krzeska *et al.*, von Hippel-Lindau tumor suppressor: not only HIF's executioner. *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 146-149.
- [145] D'Amato *et al.*, Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 4082-4085.
- [146] Ito *et al.*, Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* **2010**, *327*, 1345.
- [147] Ito *et al.*, Molecular mechanisms of thalidomide and its derivatives. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2020**, *96*, 189-203.
- [148] Galdeano *et al.*, Structure-Guided Design and Optimization of Small Molecules Targeting the Protein-Protein Interaction between the von Hippel-Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase and the Hypoxia Inducible Factor (HIF) Alpha Subunit with in Vitro Nanomolar Affinities. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8657-8663.
- [149] Buckley *et al.*, Targeting the von Hippel-Lindau E3 Ubiquitin Ligase Using Small Molecules To Disrupt the VHL/HIF-1 $\alpha$  Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4465-4468.
- [150] Zagidullin *et al.*, Novel approaches for the rational design of PROTAC linkers. *Explor. Target. Anti-tumor Ther.* **2020**, *1*, 381-390.
- [151] Zografou-Barredo *et al.*, A beginner's guide to current synthetic linker strategies towards VHL-recruiting PROTACs. *Biorg. Med. Chem.* **2023**, *88-89*, 117334.
- [152] Lebraud *et al.*, Protein Degradation by In-Cell Self-Assembly of Proteolysis Targeting Chimeras. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 927-934.
- [153] Reynders *et al.*, PHOTACs enable optical control of protein degradation. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaay5064.
- [154] Ko *et al.*, Photoactivated Protein Degradation for Optical Control of Synaptic Function. *ACS Chem. Neurosci.* **2023**, *14*, 3704-3713.
- [155] Wang *et al.*, Supramolecular artificial Nano-AUTACs enable tumor-specific metabolism protein degradation for synergistic immunotherapy. *Sci. Adv.* **2024**, *10*, eadn8079.
- [156] Takahashi *et al.*, AUTACs: Cargo-Specific Degradation Using Selective Autophagy. *Mol. Cell* **2019**, *76*, 797-810.e710.
- [157] Ahn *et al.*, LYTACs that engage the asialoglycoprotein receptor for targeted protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* **2021**, *17*, 937-946.
- [158] Ramadas *et al.*, LYTACs: An Emerging Tool for the Degradation of Non-Cytosolic Proteins. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 2951-2953.
- [159] Jiang *et al.*, Facilitating the development of molecular glues: Opportunities from serendipity and rational design. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *263*, 115950.
- [160] Tran *et al.*, Targeted Protein Degradation: Design Considerations for PROTAC Development. *Curr. Protoc.* **2022**, *2*, e611.
- [161] Weng *et al.*, PROTAC-DB: an online database of PROTACs. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D1381-D1387.
- [162] Leissing *et al.*, Structure driven compound optimization in targeted protein degradation. *Drug Discov. Today Technol.* **2020**, *37*, 73-82.

- [163] Riching *et al.*, Translating PROTAC chemical series optimization into functional outcomes underlying BRD7 and BRD9 protein degradation. *Curr. Res. Chem. Biol.* **2021**, *1*, 100009.
- [164] Jiang *et al.*, E3 ligase ligand optimization of Clinical PROTACs. *Front. Chem.* **2023**, *11*.
- [165] Békés *et al.*, PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2022**, *21*, 181-200.
- [166] Biopharma PEG Scientific Inc., *Summary of PROTAC Degraders in Clinical Trials*, <https://www.biochempeg.com/article/282.html>, **2022**. (accessed: 2025-02-02)
- [167] Gao *et al.*, Phase 1/2 study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader, in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *J. Clin. Oncol.* **2022**, *40*, 17-17.
- [168] Snyder *et al.*, Preclinical Evaluation of Bavdegalutamide (ARV-110), a Novel PROteolysis TArgeting Chimera Androgen Receptor Degradere. *Mol. Cancer Ther.* **2025**, OF1-OF12.
- [169] Hamilton *et al.*, ARV-471, an estrogen receptor (ER) PROTAC degrader, combined with palbociclib in advanced ER+/human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2-) breast cancer: Phase 1b cohort (part C) of a phase 1/2 study. *J. Clin. Oncol.* **2022**, *40*, TPS1120-TPS1120.
- [170] Gough *et al.*, Oral Estrogen Receptor PROTAC Vepdegestrant (ARV-471) Is Highly Efficacious as Monotherapy and in Combination with CDK4/6 or PI3K/mTOR Pathway Inhibitors in Preclinical ER+ Breast Cancer Models. *Clin. Cancer Res.* **2024**, *30*, 3549-3563.
- [171] Zhu *et al.*, Development of VHL-recruiting STING PROTACs that suppress innate immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* **2023**, *80*, 149.
- [172] Liu *et al.*, Novel CRBN-Recruiting Proteolysis-Targeting Chimeras as Degradere of Stimulator of Interferon Genes with In Vivo Anti-Inflammatory Efficacy. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 6593-6611.
- [173] Dialer *et al.*, A Click-Chemistry Linked 2'3'-cGAMP Analogue. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 2089-2095.
- [174] Stazzoni, *Design and synthesis of clickable nucleic acid analogues for cancer therapy and diagnosis* (Dissertation), Ludwig-Maximilians-Universität München, **2020**.
- [175] Hong *et al.*, STING inhibitors target the cyclic dinucleotide binding pocket. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118*, e2105465118.
- [176] Jenal *et al.*, Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 271-284.
- [177] Shu *et al.*, Structure of STING bound to cyclic di-GMP reveals the mechanism of cyclic dinucleotide recognition by the immune system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 722-724.
- [178] Ganazzoli, *Design and synthesis of potential STING-degrading PROTACs via a modular click chemistry approach* (Dissertation), Ludwig-Maximilians-Universität München, **2024**.
- [179] Huisgen, 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357-396.
- [180] Kolb *et al.*, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [181] Kolb *et al.*, The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128-1137.
- [182] Fantoni *et al.*, A Hitchhiker's Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 7122-7154.
- [183] Bricelj *et al.*, E3 Ligase Ligands in Successful PROTACs: An Overview of Syntheses and Linker Attachment Points. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 707317.
- [184] Fowles *et al.*, A toxicological review of the ethylene glycol series: Commonalities and differences in toxicity and modes of action. *Toxicol. Lett.* **2017**, *278*, 66-83.
- [185] D'souza *et al.*, Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13*, 1257-1275.
- [186] Ding *et al.*, Stereoselective synthesis of 2'-modified nucleosides by using ortho-alkynyl benzoate as a gold(i)-catalyzed removable neighboring participation group. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 1814-1817.
- [187] Rajapaksha *et al.*, A guide for the synthesis of key nucleoside scaffolds in drug discovery. *Med. Chem. Res.* **2023**, *32*, 1315-1333.
- [188] Kaspar *et al.*, Route efficiency assessment and review of the synthesis of  $\beta$ -nucleosides via N-glycosylation of nucleobases. *Green Chem.* **2021**, *23*, 37-50.

- [189] Zhong *et al.*, Regioisomers in Vorbrüggen's guanine nucleoside synthesis; N9 selectivity with a glucosamine derivative and 2-N-acetyl-6-O-diphenylcarbamoylguanine. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9327-9330.
- [190] Prystaš *et al.*, Nucleic acid components and their analogues. XLIII. Synthesis of anomeric 5-iodo-2'-deoxyuridines. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 121-130.
- [191] Dong *et al.*, Characteristic roadmap of linker governs the rational design of PROTACs. *Acta Pharm. Sin. B* **2024**, *14*, 4266-4295.
- [192] Aeschi *et al.*, Assembly of [2]Rotaxanes in Water. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 4091-4103.
- [193] Fernandes *et al.*, Molecular Engineering of Trifunctional Supported Catalysts for the Aerobic Oxidation of Alcohols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 11044-11048.
- [194] Štoček *et al.*, in *Biomolecules*, Vol. 10, **2020**.
- [195] Guezane Lakoud *et al.*, Esterification and etherification of steroid and terpene under Mitsunobu conditions. *Arab. J. Chem.* **2016**, *9*, S889-S892.
- [196] Mitsunobu, The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products. *Synthesis* **1981**, *1981*, 1-28.
- [197] Swamy *et al.*, Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551-2651.
- [198] Fletcher, The Mitsunobu reaction in the 21st century. *Org. Chem. Front.* **2015**, *2*, 739-752.
- [199] Quin, in *Organophosphorus Chemistry: From Molecules to Applications*, **2019**, pp. 457-498.
- [200] Quin, *A guide to organophosphorus chemistry*, Wiley-Interscience, New York u.a., **2000**.
- [201] Kochetkov *et al.*, in *Organic Chemistry of Nucleic Acids: Part B* (Eds.: N. K. Kochetkov, E. I. Budovskii), Springer US, Boston, MA, **1972**, pp. 425-448.
- [202] Russell *et al.*, The kinetics and mechanism of the acid-catalysed detritylation of nucleotides in non-aqueous solution. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 52-57.
- [203] Veth, *Design und Synthese Prodrug-modifizierter Nukleotidanaloga für die Immunstimulation und Krebstherapie* (Dissertation), Ludwig-Maximilians-Universität München, **2022**.
- [204] Efimov *et al.*, Arylsulfonyl chlorides in the presence of N-methylimidazole as efficient condensing reagents in phosphotriester oligonucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 961-964.
- [205] Michaels *et al.*, Ligand-Assisted, Copper(II) Acetate-Accelerated Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2825-2834.
- [206] Coates *et al.*, The binding of copper(II) ions to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, *20*, 611-615.
- [207] Liebe *et al.*, Copper(II)—DNA denaturation. II. The model of DNA denaturation. *Biopolymers* **1972**, *11*, 167-184.
- [208] Hegg *et al.*, Structure-Reactivity Studies in Copper(II)-Catalyzed Phosphodiester Hydrolysis. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 2961-2968.
- [209] Tjioe *et al.*, Phosphodiester Cleavage Properties of Copper(II) Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane Ligands Bearing Single Alkyl Guanidine Pendants. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 939-953.
- [210] Humphreys *et al.*, Mechanism of C8 alkylation of guanine residues by activated arylamines: evidence for initial adduct formation at the N7 position. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 8278-8282.
- [211] Liang *et al.*, in *Molecules*, Vol. 20, **2015**, pp. 4874-4901.
- [212] Shaughnessy, in *Molecules*, Vol. 20, **2015**, pp. 9419-9454.
- [213] Wojtczak *et al.*, Synthesis and Evaluation of Diguanosine Cap Analogs Modified at the C8-Position by Suzuki-Miyaura Cross-Coupling: Discovery of 7-Methylguanosine-Based Molecular Rotors. *J. Org. Chem.* **2023**, *88*, 6827-6846.
- [214] Ebert *et al.*, Structural Insights into the Recognition of N-Aryl- and C8-Aryl DNA Lesions by the Repair Protein XPA/Rad14. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1379-1382.
- [215] Xie *et al.*, Late-stage guanine C8-H alkylation of nucleosides, nucleotides, and oligonucleotides via photo-mediated Minisci reaction. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 2549.

- [216] Du *et al.*, Synthesis of 8-alkoxy-6-alkylamino-2-alkylthiopurine nucleosides with a straightforward multiple-functionalization strategy. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 2949-2953.
- [217] Hahm *et al.*, 8-Oxoguanine: from oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification. *Exp. Mol. Med.* **2022**, *54*, 1626-1642.
- [218] Holmes *et al.*, Purine Nucleosides. VII. Direct Bromination of Adenosine, Deoxyadenosine, Guanosine, and Related Purine Nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1242-1245.
- [219] Läppchen *et al.*, Probing FtsZ and Tubulin with C8-Substituted GTP Analogs Reveals Differences in Their Nucleotide Binding Sites. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 189-199.
- [220] Chern *et al.*, Nucleosides VI: A Novel and Convenient Synthesis of Purine S-Cyclonucleosides Via Mitsunobu Reaction. *Nucleosides Nucleotides* **1993**, *12*, 941-949.
- [221] Truong *et al.*, Organocatalytic, Regioselective Nucleophilic “Click” Addition of Thiols to Propiolic Acid Esters for Polymer–Polymer Coupling. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4132-4136.
- [222] Lowe *et al.*, Thiol-yne click chemistry: A powerful and versatile methodology for materials synthesis. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 4745-4750.
- [223] Olgivie *et al.*, Isomerization of tert-butyldimethylsilyl protecting groups in ribonucleosides. *Carbohydr. Res.* **1981**, *89*, 203-210.
- [224] Quilliam *et al.*, Study of rearrangement reactions occurring during gas chromatography of tert-butyldimethylsilyl ether derivatives of uridine. *J. Chromatogr. A* **1980**, *194*, 379-386.
- [225] Govindarajan, Protecting group migrations in carbohydrate chemistry. *Carbohydr. Res.* **2020**, *497*, 108151.
- [226] Matulic-Adamic *et al.*, Synthesis and Structure of 1-Deoxy-1-phenyl- $\beta$ -d-ribofuranose and Its Incorporation into Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3909-3911.
- [227] Kempson *et al.*, A Stereocontrolled Synthesis of a Phosphorothioate Cyclic Dinucleotide-Based STING Agonist. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 8851-8861.
- [228] Chandel, Nucleotide Metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2021**, *13*.
- [229] An *et al.*, Inhibition of Cyclic GMP-AMP Synthase Using a Novel Antimalarial Drug Derivative in Trex1-Deficient Mice. *Arthritis Rheumatol.* **2018**, *70*, 1807-1819.
- [230] An *et al.*, Antimalarial Drugs as Immune Modulators: New Mechanisms for Old Drugs. *Annu. Rev. Med.* **2017**, *68*, 317-330.
- [231] An *et al.*, Cutting Edge: Antimalarial Drugs Inhibit IFN- $\beta$  Production through Blockade of Cyclic GMP-AMP Synthase–DNA Interaction. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 4089-4093.
- [232] Wang *et al.*, Suramin Potently Inhibits cGAMP Synthase, cGAS, in THP1 Cells to Modulate IFN- $\beta$  Levels. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 1301-1317.
- [233] Padilla-Salinas *et al.*, Discovery of Small-Molecule Cyclic GMP-AMP Synthase Inhibitors. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 1579-1600.
- [234] Lama *et al.*, Development of human cGAS-specific small-molecule inhibitors for repression of dsDNA-triggered interferon expression. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2261.
- [235] Vincent *et al.*, Small molecule inhibition of cGAS reduces interferon expression in primary macrophages from autoimmune mice. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 750.
- [236] Hall *et al.*, Discovery of PF-06928215 as a high affinity inhibitor of cGAS enabled by a novel fluorescence polarization assay. *PLoS One* **2017**, *12*, e0184843.
- [237] Humphries *et al.*, ADDP and PS-PPh<sub>3</sub>: an efficient Mitsunobu protocol for the preparation of pyridine ether PPAR agonists. *Beilstein J. Org. Chem.* **2006**, *2*, 21.
- [238] Neises *et al.*, Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 522-524.
- [239] Steinhagen *et al.*, Suppressive oligodeoxynucleotides containing TTAGGG motifs inhibit cGAS activation in human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **2018**, *48*, 605-611.
- [240] Spiegel *et al.*, The Structure and Function of DNA G-Quadruplexes. *Trends Chem.* **2020**, *2*, 123-136.
- [241] Parkinson *et al.*, Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* **2002**, *417*, 876-880.

- [242] Patil *et al.*, G4-PROTAC: targeted degradation of a G-quadruplex binding protein. *Chem. Commun.* **2021**, 57, 12816-12819.
- [243] Zhang *et al.*, RNA G-quadruplex structure-based PROTACs for targeted DHX36 protein degradation and gene activity modulation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **2025**, 53, gkaf039.
- [244] Peng *et al.*, G-Quadruplex RNA Based PROTAC Enables Targeted Degradation of RNA Binding Protein FMRP for Tumor Immunotherapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, 63, e202402715.
- [245] Alvarado-Urbina *et al.*, Automated Synthesis of Gene Fragments. *Science* **1981**, 214, 270-274.
- [246] Gierlich *et al.*, Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA. *Org. Lett.* **2006**, 8, 3639-3642.
- [247] Gierlich *et al.*, Synthesis of Highly Modified DNA by a Combination of PCR with Alkyne-Bearing Triphosphates and Click Chemistry. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 9486-9494.
- [248] Tölke *et al.*, Efficient Tandem Copper-Catalyzed Click Synthesis of Multisugar-Modified Oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, 63, e202405161.
- [249] Randazzo *et al.*, in *Quadruplex Nucleic Acids* (Eds.: J. B. Chaires, D. Graves), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2013**, pp. 67-86.
- [250] del Villar-Guerra *et al.*, G-Quadruplex Secondary Structure Obtained from Circular Dichroism Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 7171-7175.
- [251] Green *et al.*, Development of Single-Stranded DNA Bisintercalating Inhibitors of Primase DnaG as Antibiotics. *ChemMedChem* **2021**, 16, 1986-1995.
- [252] Ora *et al.*, Metal-Ion-Promoted Cleavage, Isomerization, and Desulfurization of the Diastereomeric Phosphoromonothioate Analogues of Uridyl(3',5')uridine. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2939-2947.
- [253] Honcharenko *et al.*, Efficient Conjugation to Phosphorothioate Oligonucleotides by Cu-Catalyzed Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Bioconjugate Chem.* **2019**, 30, 1622-1628.
- [254] Linder, The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* **2012**, 733, 83-91.
- [255] InvivoGen Europe, THP1-Dual™ Cells, <https://www.invivogen.com/thp1-dual>, 2025-02-19)
- [256] Moore *et al.*, Culture of Normal Human Leukocytes. *JAMA* **1967**, 199, 519-524.
- [257] Baker, Reproducibility: Respect your cells! *Nature* **2016**, 537, 433-435.
- [258] Kulthanan *et al.*, The pH of water from various sources: an overview for recommendation for patients with atopic dermatitis. *Asia Pac. Allergy.* **2013**, 3, 155-160.
- [259] Gaohua *et al.*, Crosstalk of physiological pH and chemical pKa under the umbrella of physiologically based pharmacokinetic modeling of drug absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2021**, 17, 1103-1124.
- [260] Ghasemi *et al.*, in *Int. J. Mol. Sci., Vol. 22*, **2021**.
- [261] Schneekloth *et al.*, Chemical Genetic Control of Protein Levels: Selective in Vivo Targeted Degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3748-3754.
- [262] Li *et al.*, A bibliometric analysis of PROTAC from 2001 to 2021. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 244, 114838.
- [263] Bricelj *et al.*, Influence of Linker Attachment Points on the Stability and Neosubstrate Degradation of Cereblon Ligands. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, 12, 1733-1738.
- [264] Wurz *et al.*, Affinity and cooperativity modulate ternary complex formation to drive targeted protein degradation. *Nat. Commun.* **2023**, 14, 4177.
- [265] Schumacher *et al.*, THE METABOLISM OF THALIDOMIDE: THE FATE OF THALIDOMIDE AND SOME OF ITS HYDROLYSIS PRODUCTS IN VARIOUS SPECIES. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1965**, 25, 338-351.
- [266] Schumacher *et al.*, THE METABOLISM OF THALIDOMIDE: THE SPONTANEOUS HYDROLYSIS OF THALIDOMIDE IN SOLUTION. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1965**, 25, 324-337.
- [267] Lopez-Girona *et al.*, Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia* **2012**, 26, 2326-2335.
- [268] Nguyen *et al.*, in *Molecules, Vol. 27*, **2022**.
- [269] Neklesa *et al.*, Abstract 5236: ARV-110: An androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer. *Cancer Res.* **2018**, 78, 5236-5236.

- [270] Goracci *et al.*, Understanding the Metabolism of Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs): The Next Step toward Pharmaceutical Applications. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11615-11638.
- [271] Norris *et al.*, Design and Synthesis of Novel Cereblon Binders for Use in Targeted Protein Degradation. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 16388-16409.
- [272] Hagner *et al.*, CC-122, a pleiotropic pathway modifier, mimics an interferon response and has antitumor activity in DLBCL. *Blood* **2015**, *126*, 779-789.
- [273] Schafer *et al.*, Cereblon modulator iberdomide induces degradation of the transcription factors Ikaros and Aiolos: immunomodulation in healthy volunteers and relevance to systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **2018**, *77*, 1516.
- [274] Burslem *et al.*, Efficient Synthesis of Immunomodulatory Drug Analogues Enables Exploration of Structure–Degradation Relationships. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1508-1512.
- [275] Ichikawa *et al.*, The E3 ligase adapter cereblon targets the C-terminal cyclic imide degron. *Nature* **2022**, *610*, 775-782.
- [276] Heim *et al.*, De-Novo Design of Cereblon (CRBN) Effectors Guided by Natural Hydrolysis Products of Thalidomide Derivatives. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 6615-6629.
- [277] Min *et al.*, Phenyl-Glutarimides: Alternative Cereblon Binders for the Design of PROTACs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 26663-26670.
- [278] Jarusiewicz *et al.*, Phenyl Dihydrouracil: An Alternative Cereblon Binder for PROTAC Design. *ACS Med. Chem. Lett.* **2023**, *14*, 141-145.
- [279] Steinebach *et al.*, Leveraging Ligand Affinity and Properties: Discovery of Novel Benzamide-Type Cereblon Binders for the Design of PROTACs. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 14513-14543.
- [280] Yang *et al.*, Simple Structural Modifications Converting a Bona fide MDM2 PROTAC Degradator into a Molecular Glue Molecule: A Cautionary Tale in the Design of PROTAC Degradators. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 9471-9487.
- [281] Yamamoto *et al.*, Discovery of CRBN as a target of thalidomide: a breakthrough for progress in the development of protein degraders. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 6234-6250.
- [282] Nguyen *et al.*, Proteolysis-targeting chimeras with reduced off-targets. *Nat. Chem.* **2024**, *16*, 218-228.
- [283] Gottlieb *et al.*, NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.

### **BioRender**

Die folgenden Abbildungen wurden erstellt mit *BioRender*:

Abbildung 0, Abbildung 1.1, Abbildung 1.2, Abbildung 1.3, Abbildung 1.4, Abbildung 1.5, Abbildung 1.12, Abbildung 1.13, Abbildung 2.1, Abbildung 3.1, Abbildung 3.41, Abbildung 3.51, Abbildung 3.54.

Abbildung 1.1. *Adaptiert von* Iwasaki, A. (2025). General Principles of the Immune Response.

<https://app.biorender.com/biorender-templates/details/t-5fcacd9aacbb9100a8316575-general-principles-of-the-immune-response>

Abbildung 1.13. *Adaptiert von* Oza, H. (2025). PROTAC: Proteolytic Targeting Chimera.

<https://app.biorender.com/biorender-templates/details/t-5f4eb8936b042500ac0dce7c-protac-proteolytic-targeting-chimera>

## 7 Abkürzungsverzeichnis

$\delta$	chemische Verschiebung
<b>A</b>	
A	Adenin, Adenosin
a	aktiv
aa	Aminosäuren, <i>amino acids</i>
Ac	Acyl, acetyl
Activator 42 <sup>®</sup>	5-[3,5-Bis (trifluormethyl)-phenyl]-1 <i>H</i> -tetrazol
AGS	Aicardi-Goutieres-Syndrom
AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANIS	Anisaldehyd
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>attenuated total reflection</i>
AUTACs	Autophagie-induzierende Chimäre, <i>autophagy targeting chimera</i>
<b>B</b>	
B	Base
bp	Basenpaar
BTT	Benzylthio-1 <i>H</i> -tetrazol
Bz	Benzoyl
<b>C</b>	
CAM	Cerammoniummolybdat
CD	Zirkulardichroismus, <i>circular dichroism</i>
c-di-AMP	<i>Bis-(3'-5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate</i>
c-di-GMP	<i>Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate</i>
CDN	zyklisches Dinukleotid, <i>cyclic dinucleotide</i>
CE	cyanoethyl
cGAMP	zyklisches Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat
cGAS	zyklische Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat-Synthase
ci	<i>commercial inactivated</i>
CLIPTACs	<i>click-formed proteolysis-targeting chimeras</i>
COPA-Syndrom	Autoimmune interstitielle Lungenerkrankung-Arthritis-Syndrom
COP-I/-II	Mantel-Protein-Komplex, <i>coat protein complex</i>
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>

---

COVID-19	Corona Virus Erkrankung, <i>corona virus disease</i>
CPG	<i>controlled porous glass</i>
CRBN	<i>cereblon</i>
CuAAC	<i>copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>

**D**

---

d	Deoxy, dublett
Da	Dalton
DAMP	Schaden-assoziierte molekulare Muster, <i>damage-associated molecular pattern</i> ,
DCA	Dichloressigsäure
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DDTT	3-(( <i>N,N</i> -Dimethylaminomethyliden)amino)-3 <i>H</i> -1,2,4-dithiazol-5-thion, <i>sulfurizing reagent II</i>
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPAT	Diisopropylammoniumtetrazolid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4,4-Dimethylaminopyridin
dmf	Dimethylformamid(-in)
DMF·DMA	Dimethylformamid-dimethylacetal
DMOCP	2-Chlor-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholiniumchlorid
DMTr	Dimethoxytrityl
DMTrCl	Dimethoxytritylchlorid
DMXAA	5,6-Dimethylxanthenone-4-essigsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
DP	<i>decomposition point</i>
ds	doppelsträngig
DTBS(OTf) <sub>2</sub>	Di- <i>tert</i> -butylsilyl-ditriplat

**E**

---

E1	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E2	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E3	Ubiquitin-transferierendes Enzym
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

---

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	<i>electron ionization</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electron mobility shift assay</i>
ENPP1	Ektonukleotid-Pyrophosphatase /Phosphodiesterase 1
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ESI	<i>electron spray ionization</i>
Et	ethyl
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol

**F**

---

FBDD	<i>fragment-based drug design</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>

**G**

---

G	Guanin, Guanosin
G <sub>4</sub>	G-Quadruplex
G <sub>tet</sub>	G-Tetrad
GTP	Guanosintriphosphat

**H**

---

h	human
HA	Säure
hi	<i>heat inactivated</i>
HIF	Hypoxie-induzierte Faktoren
HIF-1 $\alpha$	<i>hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i>
HMA	<i>hypomethylating agents</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPA	Hydroxypicolinsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high-resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HTS	<i>high-throughput screening</i>
Hz	Hertz

**I**


---

<i>i</i> Bu	Isobutyryl
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IFNs	Typ-I Interferone
<i>i</i> Hex	Isohexan
IKK	IkappaB kinase
Im	Imidazol
IMiD	<i>immunomodulatory imide drug</i>
<i>i</i> Pr	Isopropyl
IR	Infrarot
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>

**J**


---

J	Kopplungskonstante
---	--------------------

**K**


---

k	kilo
K <sub>d</sub>	Bindungsaffinität
kDa	Kilo-Dalton
KOtBu	Kalium Tertbutanolat

**L**


---

LCMS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
LRMS	<i>low resolution mass spectrometry</i>
LyTACs	<i>lysosome-targeting chimera</i>

**M**


---

M	Molar
m	Methyl, milli, Multipllett, medium, messenger
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>
Me	methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mGOF	funktionsgewinnenden Mutationen, <i>gain-of-function mutation</i>
Mp	<i>melting point</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSNT	1-(2-Mesitylsulfonyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>

**N**

---

NaAsc	Natriumascorbat
Nb	Nukleobase
Nbp	Geschützte Nukleobase
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NMI	<i>N</i> -Methylimidazol
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NNB	nicht-nukleophile Base
NTPs	Nukleosidtriphosphaten
Nu	Nukleophil
NX	Nukleosid oder Nukleotid

**O**

---

ON	Oligonukleotid
Oxyrna	Hydroxyiminocyanessigsäureethylester

**P**

---

p	Pentett
PA	Phosphoramidit
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster, <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PDB	<i>protein data base</i>
PEG	Polyethylenglykol
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
Ph	Phenyl
Phos Reagent	2-Cyanoethyl- <i>N,N,N',N'</i> -Tetraisopropylphosphordiamidit
PHOTACs	<i>photochemically targeting chimeras</i>
PI	Photoinitiator
pK <sub>a</sub>	Säurestärke
POI	<i>protein of interest</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PROTAC	Proteolyse-induzierende Chimäre, <i>proteolysis targeting chimera</i>
PRR	Mustererkennungsrezeptoren, <i>pattern recognition receptor</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
Pyr	Pyridin
PyrTFA	Pyridinium trifluoroacetat

**Q**

---

q Quartett

**R**

---

R Rest  
r ribo-  
R<sub>f</sub> *retention factor*  
RNA Ribonukleinsäure  
RNAi RNA-Interferenz  
ROS *reactive oxygen species*  
RP *reversed phase*  
rpm *rounds per minute*  
RPMI 1640 *Roswell Park Memorial Institute 1640*  
rt *reverse transcriptase*

**S**

---

s Singulett, stark  
SAR Struktur-/Wirkungsbeziehung, *structure-activity-relationship*  
SAVI STING-assoziierten Vaskulopathie mit Beginn in der Kindheit,  
*STING-associated vasculopathy with onset in infancy*,  
SHJ Silyl-Hilbert-Johnson  
siRNA Small interference RNA  
SLE *systemic Lupus erythmatoides*  
SM Startmaterial  
ss *single-stranded*  
STING *stimulator of interferon genes*

**T**

---

T Thymin, Thymidin  
t Triplett  
TBHP *tert*-Butylhydroperoxid  
TBK1 *TANK-binding kinase 1*  
TBS *tert*-Butyldimethylsilyl  
TBSCl *tert*-Butyldimethylsilylchlorid  
TBTA Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin  
tBu *tert*-Butyl  
TEA Triethylamine  
TEAA Triethylammoniumacetat  
TFA Trifluoressigsäure

THF	Tetrahydrofuran
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolyl-methyl)amin
TLC	Dünnschichtchromatographie, thin-layer chromatography
TMS	Tetramethylsilan
TMSOMe	Methoxy-trimethylsilan
TOF	<i>time of flight</i>
TPD	<i>targeted protein degradation</i>
TPSCI	2,4,6-Triisopropylbenzensulfonylchlorid
$t_R$	Retentionszeit
TREAT-HF	Triethylamin-Trihydrofluorid, $NEt_3 \cdot 3 HF$
TREX1	<i>three prime repair exonuclease 1</i>

**U**

---

U	Uracil, Uridin, atomare Masseneinheit
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	ultraviolett

**V**

---

v	<i>very</i>
VHL	<i>von Hippel-Lindau</i>
VIS	<i>visible</i>

**W**

---

w	<i>weak, schwach</i>
---	----------------------