

# **Konjugate des Antisense-Oligonucleotids Oblimersen mit Estrogenrezeptor- $\alpha$ -Agonisten und -Antagonisten zur Anwendung gegen hormonresponsiven Brustkrebs**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

von

**Manuel Johann Hawner, M.Sc.**

Saarbrücken

2023

**Tag des Kolloquiums:** 14. Dezember 2023

**Dekan:** Prof. Dr. Ludger Santen

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Christian Ducho  
Prof. Dr. Marc Schneider

**Akad. Mitglied:** Dr. Michael Ring

**Vorsitz:** Prof. Dr. Alexandra K. Kiemer

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.03.2018 bis zum 01.04.2019 in der Arbeitsgruppe für Organische und Makromolekulare Chemie von Prof. Dr. Gerhard Wenz und in der Zeit vom 01.04.2019 bis zum 29.04.2022 in der Arbeitsgruppe für Pharmazeutische und Medizinische Chemie von Prof. Dr. Christian Ducho an der Universität des Saarlandes durchgeführt.





## Zusammenfassung

Moderne therapeutische Ansätze zur Behandlung seltener oder schwer zu kurierender Erkrankungen beinhalten immer mehr zielgerichtete Therapien. Dies kann durch Verwendung von organ-, gewebe- oder zellspezifischen Kleinmolekülen (*engl.* small molecules, SM) realisiert werden, welche definierte Rezeptoren auf Zellen zum Ziel haben. Die entsprechenden, kovalent an therapeutische Biooligomere wie z.B. DNA angebotenen Konjugate können über das Konzept des aktiven Targetings gezielt an den Ursprung von Krankheiten dirigiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden modifizierte Derivate des endogenen Estrogenrezeptor-Alpha-(ER $\alpha$ )-Agonisten Estradiol (E2) und Estron (E1) sowie solche, die von dem selektiven Estrogenrezeptor-Modulator (SERM) 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) abgeleitet sind, verwendet. Mit diesen Liganden wurde versucht, hormon-responsive Brustkrebszellen anzugreifen. Durch Verwendung hetero-bifunktionaler Spacer wurden die Liganden mit dem gegen das B-Zellen-Lymphom 2-Protein (BCI2) gerichtete therapeutische Antisense-Oligonucleotid (ASO) Oligomeren kovalent verbunden. Mit der kupferfreien, ringspannungs-vermittelten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) an CPG-gebundenen, einzelsträngigen Oligonucleotiden (ssONs) konnte diese Konjugate postsynthetisch realisiert werden. Die Liganden wurden darüber hinaus mit einem fluoreszenzbasierten Verdrängungs-Assay auf ihre Rezeptoraffinität getestet. Final wurden die erhaltenen Konjugate auf ihre anti-proliferativen Eigenschaften und ihre Fähigkeit, die Apoptose zu stimulieren, in Zellkultur untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Verbindungen in ER $\alpha$ -überexprimierenden T47D-Zellen und ER $\alpha$ -defizitären HepG2-Zellen getestet und die biologische Wirksamkeit anhand der Caspase-Aktivität gemessen. Hierbei konnte Zellspezifität für ER $\alpha$ -überexprimierende T47D-Zellen nachgewiesen werden. Erste Untersuchungen zur Zellaufnahme der Konjugate wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie in beiden Zelllinien durchgeführt. Die Konjugate zeigten eine mehrfache Steigerung der biologischen Aktivität im Vergleich zu etablierten Standards und zusätzlich eine erhöhte zelluläre Internalisierung im Vergleich zu nicht-konjugierten, einzelsträngigen Oligonucleotiden (ssONs), was mutmaßlich auf rezeptorvermittelte Endozytose zurückzuführen ist.



## Abstract

Modern therapeutic approaches are developing towards targeted therapies of diseases. This can be achieved using organ/tissue/cell-specific small molecules (SM) for targeting certain cellular receptors in order to deliver covalently attached therapeutics specifically to the origin of diseases via the concept of active targeting. Herein, conjugates of the endogenous estrogen receptor alpha ( $ER\alpha$ ) agonists estradiol (E2) and estrone (E1) as well as such derived from the selective estrogen receptor modulator (SERM) 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) were chosen to target the estrogen receptor in hormone-responsive breast cancer cells. These ligands were covalently coupled to the therapeutic antisense oligonucleotide (ASO) oblimersen directed against BCL2 using strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC) post-synthetically on CPG-bound single-stranded oligonucleotides (ssONs). Ligands were subsequently tested for receptor affinity using a fluorescence-based competition assay. Additionally, the obtained conjugates were evaluated for their anti-proliferative properties and their ability to stimulate programmed cell death, i.e. apoptosis. For this purpose, the compounds were tested in  $ER\alpha$ -overexpressing T47D cells as well as  $ER\alpha$ -deficient HepG2 cells and the biological efficacy was measured based on caspase activity. Initial studies on cellular uptake of the conjugates were performed using fluorescence microscopy in both cell lines. The conjugates showed a multiple increase in biological activity compared to established standards and additionally increased cellular internalization relative to non-conjugated ONs, which was presumably based on by receptor-mediated uptake. The synthesis of the key building blocks for ligand construction, solid-phase oligonucleotide synthesis (SPOS), ligand attachment to ONs and biological evaluation of resultant conjugates are presented in this dissertation.



## Danksagung

Allen Voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Christian Ducho und Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenz für die außerordentliche Möglichkeit danken, meine Dissertation in gleich zwei Arbeitskreisen anfertigen zu dürfen. Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Marc Schneider für die Übernahme der Rolle des Zweitgutachters dieser Arbeit. Herrn Dr. Stefan Boettcher, Herrn Dr. Klaus Hollemeyer und Frau Stefanie Weck danke ich für die gute Zusammenarbeit und Übernahme von massenspektrometrischen Messungen. Frau Prof. Dr. Alexandra Kiemer und Frau Dr. Charlotte Dahlem danke ich für die gute Zusammenarbeit und Übernahme der Biologischen Testungen meiner Zielverbindungen. Herrn Priv.-Doz. Dr. Martin Frotscher und Dr. Matthias Engel danke ich für die zahlreichen Diskussionen und Unterstützung zu verschiedenen Themen rund um die Rezeptorbiologie. Ein besonderer Dank gilt meinen zahlreichen und ebenso lieben Mentoren und Kollegen, welche mich auf der gesamten Reise an der Universität des Saarlandes bis hin zur Anfertigung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben! Insbesondere danke ich Frau Dr. Melissa Wojtyniak, die mich in die tiefsten Tiefen des Oligo-Kaninchenbaus geführt hat. Nathalie Kagera, Martina Jankowski, Blandine Boßmann, Lothar Jager und Devid Hero danke ich für die Unterstützung in allen technischen Fragen und lehrreiche Stunden im Labor! Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Wenz und Ducho danke ich für die großartige Zeit und das motivierende Arbeitsklima, ganz egal, in welcher Phase wir uns befanden. Wir haben immer das Beste aus Allem gemacht, insbesondere bei der Vorbereitung, Durchführung und Nachsorge der zahlreichen Saalpraktika. Danke für die tolle Zeit mit euch! Viel von euch sind gute Freunde geworden. Nur um einige meiner Labor-Buddys zu nennen; Steffi, Kapf, Betzi, Perry und Felix, danke euch für die tolle gemeinsame Zeit auch abseits des Labors ;-). Ohne meine vielen jungen Padawane, die ich während meiner Promotion betreuen durfte, hätte ich wohl nie gelernt, dass Lehre sehr viel Spaß machen kann. Dank geht an Philipp Leidinger, Erik Kosche, Philip Jochum und Arblend Maray für die tolle Zuarbeit während eurer Praktika. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden im Fünften Raum, meiner Herzdame Viktoria und v.A. meinen Kameraden der Freiwilligen Feuerwehr in Saarlouis – ihr schafft es immer wieder, mich zu erden und einzufangen. Allen Lesern dieser Arbeit wünsche ich nun eine angenehme und interessante Beschäftigung mit dieser Lektüre!



## Abkürzungverzeichnis

°C	Grad Celsius
2'-MOE	2'- <i>O</i> -Methoxyethyl
2'-OMe	2'- <i>O</i> -Methyl
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACE-Cl	Chlorameisensäure-1-chlorethylester
ADC	Antikörper-Wirkstoff-Konjugat ( <i>engl.</i> antibody-drug conjugate)
AEBS	Antiestrogen-Bindungsstelle
AF2	Transaktivierungsregion am C-Terminus ( <i>engl.</i> Activation Function 2)
Ago2	Argonautprotein 2
AML	akute myeloische Leukämie
Äq.	Äquivalente
AS	Antisense
ASGPR	Asialoglycoproteinrezeptor
ASO	Antisense-Oligonucleotid
BCI2	B-Zellen-Lymphom-2-Protein
BMT	5-Benzylmercaptotetrazol
br	breites Signal
BRCA1	Brustkrebsgen 1 ( <i>engl.</i> breast cancer, early-onset 1)
BRCA2	Brustkrebsgen 2 ( <i>engl.</i> breast cancer, early-onset 2)
BSA	Bovines Serumalbumin
Cap A	Capping-Reagenz in Kanal A
Cap B	Capping-Reagenz in Kanal B
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CoB	Coaktivatoren-Bindungsstelle
CPG	poröses Glas ( <i>engl.</i> controlled pore glass)
CPP	zellpenetrierende Peptiden ( <i>engl.</i> cell-penetrating peptides)
CR	vollständige Remission ( <i>engl.</i> complete remission)
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
Cy5	Cyanin-5-Farbstoff
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBCO	Dibenzocyclooctin
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DDTT	3-[(Dimethylaminomethylen)amino]-3 <i>H</i> -1,2,4-dithiazol-5-thion
DEAD	Diethylazadicarboxylat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMD	Duchenne-Muskeldystrophie
DMSO	Dimethylsulfoxid

DMTr	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
DODAC	Diocetadecyldimethylammoniumchlorid
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DOTAP	Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan
DOX	Doxorubicin
DOXSF	DOX-5-formylsalicylamid
ds	doppelsträngig
E <sub>1</sub>	Estron
E <sub>2</sub>	17β-Estradiol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EE	frühe Endosomen ( <i>engl.</i> early endosomes)
EE, EtOAC	Essigsäureethylester
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur ( <i>engl.</i> European Medicines Agency)
ERα	Estrogenrezeptor-Alpha
ESCRT	<i>engl.</i> endosomal sorting complexes required for transport
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und Andere
FDA	US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel ( <i>engl.</i> Food and Drug Administration)
G3139	Kennung des von Genta Incorporated konzipierten Antisense Oligonucleotids gegen die Blc-2 Initiationssequenz
G4126	Kennung des von Genta Incorporated konzipierten Mismatch Oligonucleotids gegen G3139
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GPGR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie ( <i>engl.</i> high resolution mass spectrometry)
IE1/2	<i>engl.</i> immediate-early proteins 1&2
ILV	intraluminale Vesikel
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante in [Hz]
K	Kelvin
K <sub>a</sub>	Gleichgewichtskonstante
LBD	Ligandbindungsdomäne
LBPA	Bisoleoyl-lysobisphosphorsäure
LDL	Lipoprotein geringer Dichte ( <i>engl.</i> low density lipoprotein)
LE	späte Endosomen ( <i>engl.</i> late endosomes)
IgH	<i>engl.</i> immunoglobulin heavy-chain
LNA	verbrückte Nucleinsäure ( <i>engl.</i> locked nucleic acid)
LNP	Lipid-Nanopartikel
LY	Lysosomen
M	molar
m	Masse, multiplett (NMR)
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MeOH	Methanol
miRNA	MicroRNA



---

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>engl.</i> messenger ribonucleic acid)
MS	Massenspektrometrie
MVB	multivesikuläre Körper ( <i>engl.</i> multi vesicular bodies)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nM	nanomolar
nm	Nanometer
ON	Oligonucleotid
OS	Gesamtüberlebensrate ( <i>engl.</i> overall survival)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	2-Cyanoethyl- <i>N,N</i> -diisopropylchlorphosphoramidit
PDC	Protein-Wirkstoff-Konjugat ( <i>engl.</i> Protein-drug conjugate)
PE	Petrolether
PFS	progressionsfreies Überleben ( <i>engl.</i> progression-free survival)
PGR	Progesteronrezeptor
PMO	Morpholino-Oligonucleotide ( <i>engl.</i> phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide)
PN	2-Cyanoethyl- <i>N,N,N',N'</i> -tetraisopropylphosphorodiamidit
PO	Phosphat
ppm	Faktor $10^{-6}$ ( <i>engl.</i> parts per million)
pre-mRNA	Primärtranskript ( <i>engl.</i> precursor messenger ribonucleic acid)
PT	Phosphorthioat
Rabs	Rab-Proteine ( <i>engl.</i> Ras-related in brain protein)
RBA	relative Bindungsaffinität, bezogen auf E <sub>2</sub>
RE	Rückführende Endosomen ( <i>engl.</i> recycling endosomes)
RES	retikuloendotheliales System
RGD	Einbuchstaben-Code der Aminosäure-Sequenz L-Arginin, L-Glycin und L-Asparaginsäure
RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>engl.</i> ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase H	Ribonuklease Hybrid ( <i>engl.</i> Ribonuclease H)
Rt	Raumtemperatur
Rt	Raumtemperatur
S	Entropie
SERD	selektiver Estrogenrezeptor-Degrader
SERM	selektiver Estrogenrezeptor-Modulator
siRNA	kleine eingreifende RNA ( <i>engl.</i> small interfering RNA)
SM	Kleinmoleküle ( <i>engl.</i> small molecules)
SPAAC	spannungsvermittelte Azid-Alkin Cycloaddition ( <i>engl.</i> strain-promoted azide-alkine-cycloaddition)
SPOS	Oligonucleotid-Festphasensynthese ( <i>engl.</i> solid-phase oligonucleotide synthesis)
SSO	Spleiß-schaltende Oligonucleotide ( <i>engl.</i> splice-switching oligonucleotides)
ssON	<i>engl.</i> single-strand oligonucleotide
T	Temperatur
t	Triplett

---

<i>t</i>	<i>tert.</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl
TCA	Trichloressigsäure ( <i>engl.</i> trichloroacetic acid)
TEG	Triethylenglycol
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
THF	Tetrahydrofuran
TI AS	Translation-Initiation
TLR9	Toll-like Rezeptor 9
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TPP	Triphenylphosphin
TRPV1	<i>engl.</i> Transient Receptor Potential Vanilloid 1
t-SNARE	<i>engl.</i> target synaptosome-associated protein receptor
TΔS	entropischer Kompensationsfaktor
UV	Ultravioletter Bereich
v-SNARE	<i>engl.</i> vesicle synaptosome-associated protein receptor
$\Delta G^\circ$	freie Reaktionsenthalpie
$\Delta G^{37^\circ\text{C}}$	freie Reaktionsenthalpie bei 37°C
$\Delta H^\circ$	Standardbildungsenthalpie
$\Delta S$	Entropieänderung
$\Delta S^\circ$	Standardentropie
$\theta$	Theta, mRNA-Belegung

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>KENNTNISSTAND.....</b>	<b>3</b>
2.1	Biologische Prinzipien der Antisense-Technologie .....	3
2.2	Endocytotische Transportwege und Freisetzung von ON .....	8
2.3	Medizinalchemische Optimierung von ON-Therapeutika .....	12
2.3.1	Modifikationen von Oligonucleotid-Bausteinen am Beispiel zugelassener ON-Therapeutika .....	14
2.3.2	Modifizierung durch Konjugation mit endogenen Rezeptorliganden .....	20
2.4	Oblimersen und andere BCL2-ASOs in der Krebstherapie .....	27
2.5	Der Estrogenrezeptor $\alpha$ als therapeutisches Target zur Behandlung von Brustkrebs.....	32
2.6	Synthetische Ansätze zu 4-Hydroxytamoxifen-Konjugaten .....	36
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNG UND PLANUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>42</b>
3.1	Zielsetzung.....	42
3.2	Retrosynthetische Betrachtung der modularen Bausteine .....	45
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>49</b>
4.1	Synthese heterobifunktionaler Triethylenglycol-Spacer .....	49
4.2	Synthese von 4-Hydroxytamoxifen-Derivaten .....	54
4.3	Synthese der Triphenylethylen-TEG- und Estradiol-TEG-Liganden .....	59
4.3.1	Triphenylethylen-TEG-Liganden.....	59
4.3.2	Estradiol-TEG-Liganden.....	65
4.4	Bestimmung der Bindungsaffinität an Estrogenrezeptor $\alpha$ mittels Kompetitionsassay.....	67
4.4.1	Wahl und Aufbau des Assay .....	67
4.4.2	Durchführung und Ergebnisse des Assays .....	72
4.5	Synthese von 5'-modifizierten Oligonucleotid-Konjugaten .....	78
4.5.1	Aufbau von Oblimersen durch festphasengestützte Oligonucleotid- Synthese .....	78
4.5.2	Konjugationen an festphasengebundenen Oligonucleotiden und ihre Isolierung .....	83
4.5.3	mRNA-Belegungsgrad und Van't Hoff-Analyse von Heteroduplices mit ON-Konjugaten.....	87

---

4.6	Biologische Evaluierung der ON-Konjugate in ER $\alpha$ -angereicherten T47D- und ER $\alpha$ -defizitären HepG2-Zellen .....	93
4.6.1	Proliferationsraten und Caspase-Aktivität .....	93
4.6.2	Western-Blot Analyse-Analyse.....	98
4.6.3	Untersuchungen zur Zellaufnahme der ON-Konjugate.....	100
4.7	Phosphoramidate als Backbone-Modifikation in Oligonucleotiden .....	104
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>119</b>
6.1	Internalisierung des Konjugats BCl2-Tam <sub>1</sub> .....	119
6.2	Sequenz-Screening für Tam <sub>1</sub> -konjugierte ONs .....	121
6.3	Erweiterung der Konjugationsplattform von BCl2-Tam <sub>1</sub> .....	124
<b>7</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>133</b>
7.1	Allgemeines .....	133
7.1.1	Präparative Vorgehensweisen .....	133
7.1.2	Edukte und Reagenzien.....	133
7.1.3	Lösungsmittel.....	133
7.1.4	Absolute Lösungsmittel.....	134
7.1.5	Manuelle Chromatographie .....	134
7.1.6	Instrumentelle Analytik .....	135
7.1.7	Hydrolysekinetik von Phosphoramidaten .....	142
7.1.8	Hydrolyse von Dinukleotid- <i>N</i> -Alkyl-Phosphoramidaten .....	142
7.2	Oligonucleotide und ihre Konjugate .....	144
7.2.1	Reagenzien für den DNA-/RNA-Synthesizer .....	144
7.2.2	Synthese von Oligonucleotiden und ihrer Konjugate .....	145
7.3	Kompetitionsassay am Estrogenrezeptor Alpha .....	146
7.4	Biologische Testung <i>in vitro</i> .....	150
7.4.1	Zelltestung .....	150
7.5	Synthesen .....	152
7.5.1	Synthese von Triphenylethylen-Derivaten .....	152
7.5.2	Synthese von Triethylenglycol-Derivaten .....	176
7.5.3	Synthese von Triphenylethylen-Triethylenglycol-Konjugaten.....	190
7.5.4	Synthese von Estradiol-Triethylenglycol-Konjugaten .....	200
7.5.5	Synthese von Phosphoramidat-Modellsubstanzen .....	205
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>229</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>257</b>

---

9.1	Zyklenprogrammierung des DNA-Synthesizers .....	257
9.2	HPLC-Methoden Oligonucleotid-Konjugate .....	258
9.3	HPLC-Chromatogramme .....	259
9.4	Schmelzkurven der Konjugate mit komplementärer mRNA .....	265
9.5	Van't Hoff-Analyse.....	267

## 1 Einleitung

Medizinalchemische Ansätze zur Diagnose und Therapie gehen im 21. Jahrhundert neue Wege in Richtung personalisierter Medizin und gezielter Therapie vormals unheilbarer oder schwer zu behandelnden Krankheiten. Hieraus ergibt sich ein wachsender Bedarf an spezifischen Effektormolekülen, welche in Kombination mit anderen Pharmakophoren dazu genutzt werden, Oberflächenrezeptoren anzusprechen. Wirkorte, welche vorher außer Reichweite klassischer Pharmazeutika lagen, die sog. "undrug-gable targets", können nun über das Konzept des "aktiven Targetings" gezielt angesteuert werden, um Wirkstoffe an den ursächlichen Entstehungsort der Erkrankung zu befördern.<sup>[1]</sup> Hierbei hat sich die Kombination zellspezifischer, endogener Liganden mit gleichermaßen spezifischen therapeutischen Oligonucleotiden (ONs) als leistungsfähiges Instrument zur Realisierung dieses Vorhabens erwiesen. Die eingesetzten ONs sind komplementär zu genau definierten, und mutierten oder überexprimierten DNA- oder RNA-Zielsequenzen und meist in Kombination mit Transfektionsagenzien hoch aktiv; die Ausbildung einer Doppelhelix mit der Zielsequenz stört hierbei die Expression krankheitsbezogener Proteine oder Krebsmarker. Mechanismen wie Antisense (AS) oder RNA-Interferenz (RNAi) können auf diese Weise eingesetzt werden, um die ehemals unbehandelbaren, intrazellulären Proteine und Onkogene ("Targets") auf genetischer Ebene auszuschalten. Die Kombination mit endogenen Liganden wirkt an dieser Stelle unterstützend, um diese Nukleinsäure-Therapeutika an den gewünschten Zielort zu befördern. Von der FDA und der EMA wurden in den letzten fünf Jahren mehrere solcher ON-Konjugate zugelassen, welche den "Orphan Drugs" bzw. den „Arzneimittel für seltene Leiden“ zu zuordnen sind. Die Arzneimittel Givosiran<sup>[2]</sup> und Lumasiran<sup>[3]</sup> basieren hierbei auf der Konjugation einer "small interfering RNA" (siRNA) mit einem antennären Spacer-System des für den Ashwell-Morell-Rezeptor spezifischen Liganden *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc).<sup>[4]</sup>

Darüber hinaus kombinieren Konjugate von SMs mit Antikörpern (ADCs) oder Proteinen (PDC) die Spezifität monoklonaler Antikörper mit der Toxizität von Chemotherapeutika.<sup>[5]</sup> Die Kombinationsmöglichkeiten sind vielfältig, der Aufbau eines neuartigen Konjugates erfordert daher eine gründliche Projektplanung zur Auslotung, welche spezifischen Eigenschaften der einzelnen Konjugationspartner überhaupt kombiniert werden

---

können und zu welchem Zweck. Im Folgenden werden daher wichtige Aspekte und interdisziplinäre Themenfelder mit Fokus auf den Aufbau eines Konjugats zur Anwendung an hormon-responsivem Brustkrebs beschrieben, um das Handwerkzeug eines solchen Vorhabens festlegen zu können.

## 2 Kenntnisstand

### 2.1 Biologische Prinzipien der Antisense-Technologie

Erste Schritte zur kurativen Behandlung genetisch bedingter Erkrankungen wurden mithilfe sogenannter Antisense-Oligonucleotide unternommen. Die Möglichkeit, exogene und kurzkettige Desoxyribonukleinsäuren für die medizinische Behandlung zu nutzen, wurde in Verbindung mit dem Rous Sarcoma Virus entdeckt.<sup>[6]</sup> Die Gruppe um Zamecnik und Stephenson an der Harvard Medical School in Boston verwendete hierbei einzelsträngige DNA, um durch Watson-Crick-Basenpaarung einen DNA/RNA-Heteroduplex mit einer komplementären viralen mRNA zu bilden.<sup>[7]</sup> Im Allgemeinen ist das Auftreten einer unregelmäßigen biologischen Aktivität<sup>[8,9]</sup> oftmals mit einem homöostatischen Ungleichgewicht von Genen<sup>[10]</sup> oder Proteinen<sup>[11]</sup> in Zellen oder Geweben verbunden. Die mRNA stellt als grundlegender Bauplan ein attraktives Ziel dar, um das homöostatische Gleichgewicht wiederherzustellen und die Expression defekter Gene oder die Translation von Proteinprodukten abzuschalten. Synthetische Oligonucleotide entfalten ihre Wirkung hierbei in zwei verschiedenen Kompartimenten: entweder im Cytosol oder im Zellkern.<sup>[12]</sup>

Wechselwirkungen mit doppelsträngiger DNA im Zellkern mit dem Ziel eines Eingriffs in die transkribierende Aktivität werden unter dem Sammelbegriff Antigen-Mechanismus zusammengefasst und im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter ausgeführt.<sup>[13,14]</sup> Die Antisense-Wirkung hingegen findet im Cytoplasma statt, wo ASOs durch zwei verschiedene Mechanismen Einfluss auf die die Translation der mRNA nehmen können (vgl. **Abb. 2.1**).<sup>[15]</sup> Zum einen kann die maßgeschneiderte ASO-Sequenz das mRNA-Target als Heteroduplex binden und damit die Translation durch sterische Hinderung der ribosomalen Bewegung hindern (occupancy-only).<sup>[16]</sup> Andererseits ist es möglich, durch eine definierte, strukturelle Konzeption des ASOs die Endonuklease RNase H zu rekrutieren, welche die zytoplasmische RNA in DNA/RNA-Heteroduplexen selektiv erkennt und abbaut (occupancy-mediated degradation).<sup>[17]</sup> Das ASO geht aus diesem Komplex unverändert hervor, weshalb im weitesten Sinn von einer katalytischen Aktivität solcher ASOs gesprochen werden kann.<sup>[18]</sup>

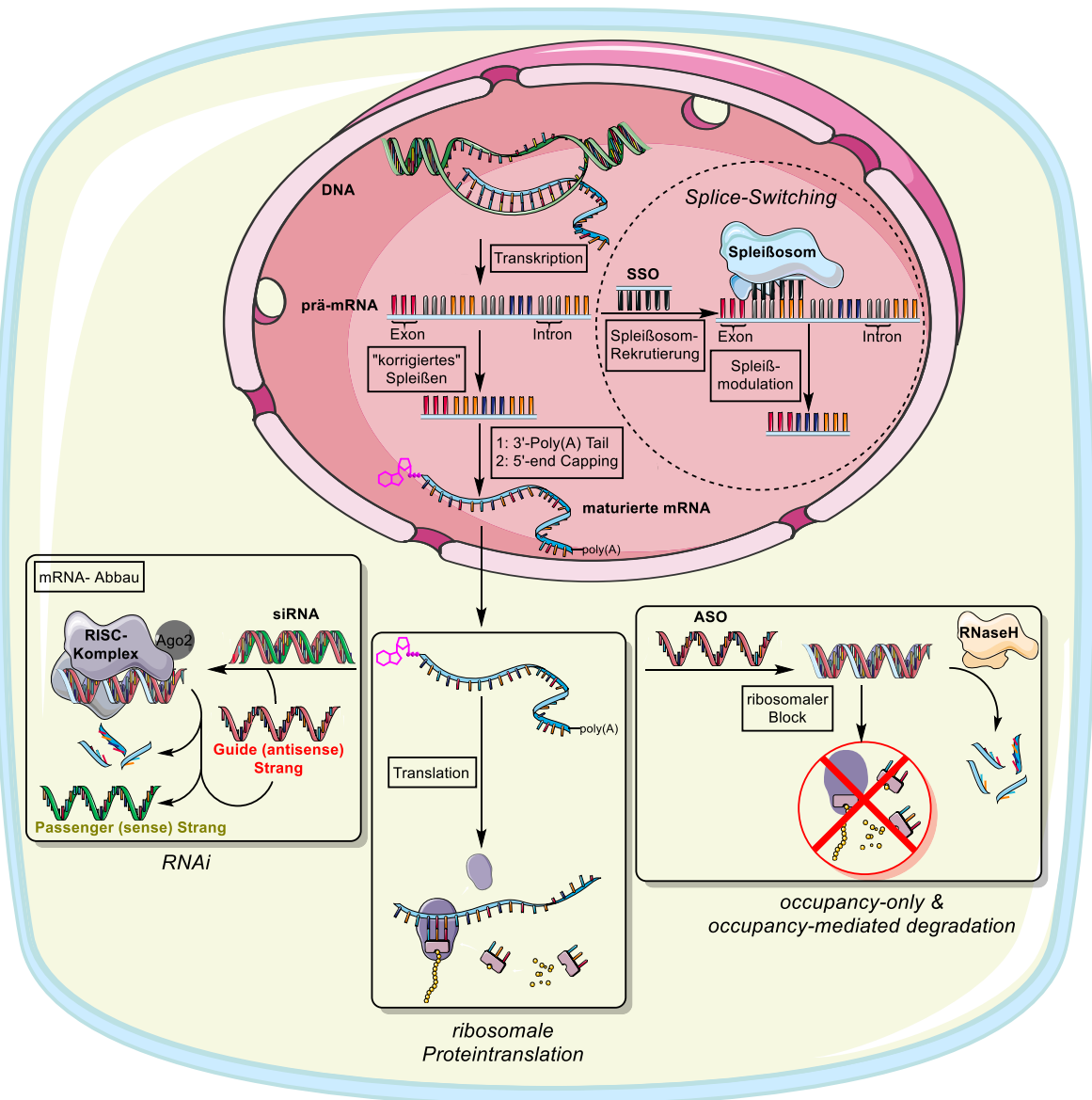
Aus empirischer Sicht begünstigen strukturelle Besonderheiten im Aufbau des ASOs einen der beiden Mechanismen.<sup>[19,20]</sup> So lassen sich einige der von der FDA und EMA



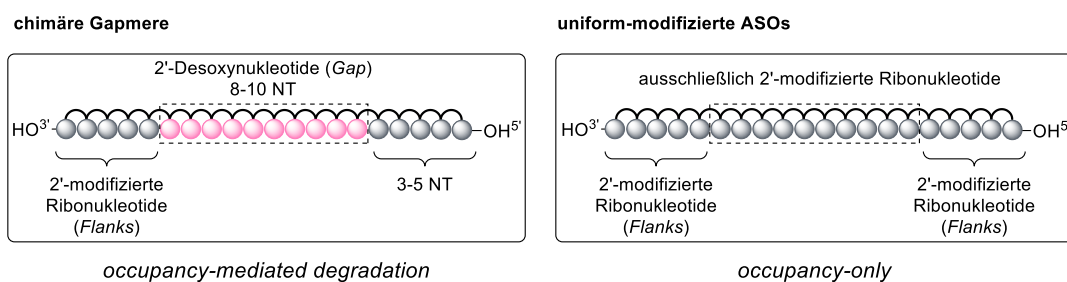
zugelassenen ASO-Therapeutika der Gruppe der sog. Chimären bzw. Gapmer-ASOs zu ordnen (**Abb. 2.4**), bei welchen eine zentrale Region innerhalb der Sequenz bestehend aus 8-10 (Desoxy-) Ribonukleotiden (Gap) von 3-5 2'-modifizierter Ribonukleotide (Flanks) flankiert wird.<sup>[21–23]</sup> Dieser strukturelle Aufbau unter Verwendung einer hinreichend großen Gap ist aus empirischer Sicht obligatorisch, damit die RNA/DNA Heteroduplex ein potentes Substrat der RNase H sein kann. Die 2'-Modifikationen werden i.d.R. so gewählt, dass die Affinität des ASO zum mRNA-Target erhöht und die proinflammatorischen Eigenschaften des ASO verringert werden. Zusätzlich schützen die Ribonukleotid-Flanken vor enzymatischem Abbau durch Exonukleasen, wodurch die Halbwertszeit und damit die Wirkdauer der ASOs verlängert werden.<sup>[24]</sup> Hierbei haben sich bestimmte Modifikationen bewährt worauf an anderer Stelle näher eingegangen wird (siehe Kapitel **2.3**). ASOs, welche gemäß dem occupancy-only Mechanismus aufgebaut sind, können auch in die Maturation des mRNA-Targets eingreifen. Hierbei sind die Spaltung der 5'-Cap-Struktur durch Hydrolyse der 5'-5'-Phosphordiesterbindung<sup>[25]</sup> und der Eingriff in die Poly-Adenylierung der prä-mRNA<sup>[26]</sup> weitere Möglichkeiten von ASOs, im Zellkern Einfluss auf die Expression nehmen zu können. Unabhängig von Aufbau der verwendeten Nukleotide verfügen ASOs meist über eine modifizierte Backbone-Struktur mit dem Ziel, neben einer erhöhten Nukleasestabilität auch eine erhöhte Bioverfügbarkeit durch Modulation der Proteinbindung zu gewährleisten.<sup>[27]</sup> Eine Modifikation, die beide Ziele ermöglicht, ist die Phosphorthioat-Modifikation (PT)<sup>[28,29]</sup>, bei welcher der doppeltgebundene Sauerstoff des natürlichen Phosphatdiesters durch Schwefel ersetzt wird. Solche ASOs werden aufgrund der proteinbindenden Eigenschaft der PT-Modifikation vorwiegend in der Leber akkumuliert.<sup>[30,31]</sup> In vier der von der FDA zugelassenen ASOs wird diese Modifikation bereits angewendet, namentlich sind dies Fomivirsen<sup>[32]</sup> (Cytomegalovirus-Retinitis), Mipomersen<sup>[32]</sup> (familiäre Hypercholesterinämie), Inotersen<sup>[33]</sup> (Behandlung von Polyneuropathien im Fall der vererbaren Transthyretin-Amyloidose) und Nusinersen<sup>[34]</sup> (5q-assoziiertes spinale Muskelatrophie). Desweiteren zählt zudem Volanesorsen (vererbbares, familiäres Chylomikronämie Syndrom, FCS) zu den klassischen, wirksamen (occupancy-only- oder occupancy-mediated-degradation-Mechanismus) ASOs.<sup>[35]</sup>

Darüber hinaus werden sog. Splice-switching ONs (SSOs) als Variante der ASOs dazu verwendet, während des Spleißvorgangs im Zellkern mit nukleärer prä-mRNA zu

**A**



**B**



**Abb. 2.1:** Grundsätzliche Wirkungsweisen eines therapeutischen ON im Zellkern und im Cytoplasma im Vergleich zu nativer Proteinexpression (A). Das Strukturdesign der ASOs lässt sich in zwei Kategorien, die chimerischen Gapmere und die uniformmodifizierten ASOs unterteilen (B).

interagieren. SSOs nehmen hierbei Einfluss auf die Auswahl der Introns und Exons und damit auf die Art und die Menge der vom Körper produzierten Proteine.<sup>[36]</sup> Sie werden daher v.A. zur Behandlung von Erbkrankheiten verabreicht, die in Folge einzelner

Genmutationen auftreten können. Im Gegensatz zu ASOs führen SSOs also eine (schadhafte) mRNA nicht dem durch die RNase H katalysierten Abbaumechanismus zu, vielmehr greifen sie bereits in deren Aufbau direkt ein. Die Ansatzpunkte für SSOs, defekte Gene auszusplesen sind daher vielfältig und werden im Folgenden kurz erläutert. Exons sind die kodierenden Abschnitte von Genen, die von Introns, den nicht kodierenden Sequenzen innerhalb der prä-mRNA, durchsetzt sind.<sup>[37]</sup> Während des Spleißvorgangs werden die Exons, welche die genetische Information in Form kurzer Nukleotid-Sequenzen und somit das Transkript der Proteine darstellen, durch einen RNA-Protein-Komplex, das Spleißosom, fusioniert. Im Verlauf werden also die Introns aus der prä-mRNA herausgeschnitten.<sup>[38]</sup> Das Spleißosom muss demnach an spezifische Spleißstellen binden, wodurch auch die Reihenfolge der Exons und ihre Kombinationsmöglichkeiten beeinflusst werden (alternatives Spleißen). Konkret ergeben sich für SSOs somit zwei zentrale Möglichkeiten, das korrekte Spleißverhalten einer defekten Zelle wiederherzustellen.<sup>[39]</sup> Zum einen kann ein exogenes SSO so konzipiert sein, dass es eine Duplex mit einer durch Mutation entstandenen „Enhancer-Sequenz“ bildet.<sup>[40]</sup> Enhancer-Sequenzen akquirieren Transkriptionsfaktoren und führen zu einer übermäßigen Expression des betreffenden mRNA-Abschnitts. Die Blockierung dieser Stelle führt dazu, dass das Spleißosom dieses (defekte) Exon überspringt und die genetische Fehlinformation im Transkript, der gereiften mRNA, nicht vorliegt.<sup>[41]</sup>

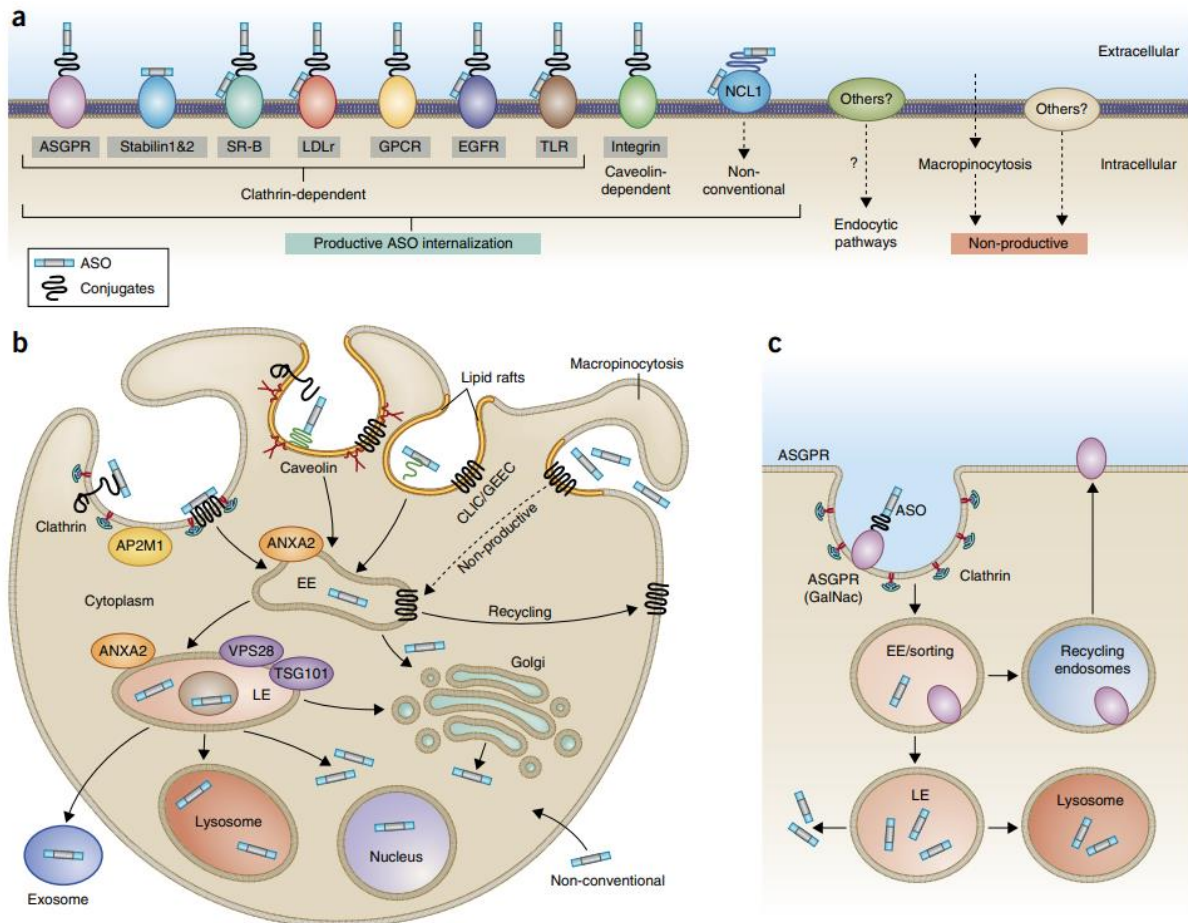
Umgekehrt können SSOs konzipiert sein, um an durch Mutation entstandene „Silencer-Sequenzen“ zu binden, welche negativ-regulierende Transkriptionsfaktoren rekrutieren. Dieser Korrekturvorgang führt zum Einschluss ursprünglich ausgelassener Exons und somit zum Einbau fehlender Bestandteile des Proteoms oder zur Bildung der korrekten Struktur eines vorher schadhafte Proteins.<sup>[42]</sup> Von der FDA zugelassene Therapeutika sind in diesem Zusammenhang das bereits genannte Nusinersen<sup>[43]</sup>, sowie vier weitere zur Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie, namentlich das SSO Eteplirsen<sup>[44]</sup> (Dystrophin Exon 51) sowie die Morpholino-ONs (phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide, PMO) Golodirsen<sup>[45]</sup> (Dystrophin Exon 53), Viltolarsen<sup>[46]</sup> (Dystrophin Exon 53) und Casimersen (Dystrophin Exon 45).<sup>[47]</sup> Eine Sonderstellung unter den SSOs nimmt Milasen ein, da es als Pionierbeispiel für personalisierte Medizin angesehen wird. Das SSO wurde speziell zur Behandlung einer seltenen Form der Spielmeyer-Vogt-Krankheit entwickelt und ist weltweit nur in einem einzigen Menschen aktiv.<sup>[48]</sup>

Die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) als grundlegender körpereigener Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression durch Fire und Mello erweiterte die Bandbreite therapeutischer ON und gab der Entwicklung neuartiger ON-Strukturen und Modifikationen neue Impulse.<sup>[49]</sup> Analog zum klassischen Antisense-Konzept ist das Target bei RNAi-Anwendungen die reife mRNA im Cytosol. Hierbei werden nicht-codierende, doppelsträngige (ds) RNA-Sequenzen mit einer Länge von 20-25 Nukleotiden dazu eingesetzt, die Expression bestimmter Proteine durch Rekrutierung eines abbauenden Enzymkomplexes zu regulieren.<sup>[50]</sup> Die ursprüngliche physiologische Funktion der RNAi ist die Abwehr bzw. Degradation exogener und viraler RNA.<sup>[51]</sup> Aus körpereigener dsRNA werden zunächst kleinere microRNAs (miRNAs) durch Dicer-Proteine herausgeschnitten, welche komplementär zu definierten Abschnitten der exogenen mRNA sind.<sup>[52]</sup> Dieser Schritt ist notwendig, um eine Interferon-vermittelte Immunantwort durch zu lange Ribonukleotid-Sequenzen zu verhindern.<sup>[53]</sup> Die resultierenden Stränge werden im Folgenden als Sense-(passenger) bzw. Antisense-(guide)-Strang bezeichnet; letzterer dieser beiden Stränge ist komplementär zur Target-mRNA, die abgebaut werden soll. Der Guide-Strang wird zusammen mit der Target-mRNA von einem Ribonukleoproteinkomplex, dem RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC), erkannt.<sup>[54]</sup> Im Verlauf der Bildung dieses Komplexes trennen verschiedene Argonaut-Proteine (Ago2) den Guide-Strang (Antisense) von dem Passenger-Strang (Sense), so dass neben der Target-mRNA nur der Guide-Strang in den RISC geladen wird.<sup>[55]</sup> Werden nun artifizielle, exogene Versionen einer miRNA gezielt zu therapeutischen Zwecken angewendet, wird die Duplex aus Guide-Strang und Passenger-Strang als "small interfering RNA" (siRNA) bezeichnet. Entscheidend für die Effektivität ist die Eignung des RISC zur Auswahl des korrekten Strangs der siRNA. Um die Auswahl in Richtung des zu favorisierenden Guide-Strangs zu dirigieren, werden oftmals nicht-kanonische Modifikationen im Backbone des Passenger-Strangs implementiert, da die RISC-Maschinerie empfindlich auf solche mit Ausschluss des betreffenden Strangs aus dem Argonaut-Komplex reagiert.<sup>[56]</sup> Andererseits führen Modifikation, welche die Duplexstabilität der siRNA selbst herabsetzen zu einer besseren Trennung der beiden Stränge durch Ago2, sodass der Einbau des Guide-Strangs in den RISC gegenüber dem Einbau des Passenger-Strangs favorisiert wird.<sup>[56,57]</sup> Eine helikale Topologie der siRNA in A-Form ist hierbei eine Grundvoraussetzung.<sup>[57]</sup> Letztlich wird die Target-mRNA zwischen den Nukleotiden 10-11 (vom 5'-

Ende aus gezählt) durch RISC gespalten<sup>[58]</sup>, wobei sich an diesen Positionen die Möglichkeit eröffnet, durch gezielte Modifikationen die Strangtrennung weiter zu verbessern (siehe hierzu Kapitel **2.3.1**). Hierdurch kann die avisierte Abschaltung eines Proteins (silencing) weiter gesteigert werden<sup>[59,60]</sup>, worauf in Kapitel **2.2** anhand einiger Beispiele näher eingegangen wird.<sup>[61–65]</sup> Von der FDA wurden bisher drei auf siRNA basierende Therapeutika zugelassen. Patisiran stellt das erste Therapeutikum dieser Art dar und ist gegen die familiäre Amyloid-Polyneuropathie Typ-I wirksam. Patisiran wird hierbei als Liposom-Komplex verabreicht.<sup>[66]</sup> Darüber hinaus wurden mit Givosiran<sup>[2]</sup> (akute intermittierende Porphyrrie), Lumasiran<sup>[3]</sup> (Hyperoxalurie) und Inclisiran<sup>[67]</sup> (Hypercholesterinämie) drei Vertreter der von Alnylam Pharmaceuticals entwickelten „Enhanced Stabilization Chemistry“ (ESC)-Plattform zugelassen, welche das Pendant zur „LICA-Plattform“ (Ligand Conjugated Antisense) von Ionis darstellt. Hierbei handelt es sich um Konjugate von siRNAs oder ASOs mit Effektor-Liganden zum Zweck einer erhöhten Bioverfügbarkeit durch rezeptorvermittelte Bereitstellung der ONs in definierten Zielgeweben. Hierauf wird in Kapitel **2.3.2** näher eingegangen.

## 2.2 Endocytotische Transportwege und Freisetzung von ON

Zellen verfügen über mehrere Wege („Pathways“) für die Internalisierung von Therapeutika biologischer Natur (**Abb. 2.2**<sup>[68]</sup>). Etwa die Hälfte dieser Mechanismen wird entweder über Clathrin-beschichtete Taschen (clathrin-coated pits), oder Dynamin-abhängige Pits gesteuert, wobei manche Mechanismen von beiden Membranproteinen abhängig sind. Zu letztgenannten zählen caveolare Wege wie Lipid Rafts mit hohem Gehalt an Sphingomyelinen, Glycosphingolipiden und Cholesterin.<sup>[69]</sup> Die (Makro-) Pino-<sup>[70]</sup> und Phagozytose<sup>[71]</sup> hingegen sind von beiden Proteinen unabhängig und es werden hauptsächlich Fluide oder nanopartikuläre Substanzen internalisiert. Letztlich sind Rezeptoren an der Zelloberfläche für die Internalisierung von ASOs oder siRNAs verantwortlich<sup>[72]</sup>, von welchen die Integrine<sup>[73]</sup> (Caveloin-abhängig), die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs, clathrin-abhängig)<sup>[74]</sup> oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (clathrin-abhängig)<sup>[1]</sup> produktive Kanäle zur Aufnahme von ONs darstellen. Nach erfolgter Internalisierung, ganz gleich welchen Ursprungs, befinden sich ONs in speziellen Endosomen, den sog. „early endosomes“ (EE). EE sind Lipidvesikel, in denen u.A. ONs zwischen den Zellkompartimenten transportiert werden<sup>[75]</sup>, wobei ein Zwischenstopp am trans-Golgi-Netzwerk (TGN) eingelegt wird.<sup>[76]</sup> Zunächst erfolgt der Transport allerdings zu



**Abb. 2.2:** Möglichkeiten der Endozytose von ONs. Clathrin- oder Caveolin-abhängige Wege gelten als produktive Internalisierungsoptionen für ASOs (a). Der endosomale Transport der ONs erfolgt durch verschiedene endosomale Spezies und wird durch eine Vielzahl von Proteinen gesteuert (b). Ein GalNAc-Konjugat wird bspw. durch Wechselwirkung des Liganden mit dem korrespondierenden ASGPR-Rezeptor internalisiert und nach Dissoziation vom Rezeptor durch Freisetzung aus den LEs in das Cytoplasma entlassen. Der Rezeptor wird durch REs wieder der Zelloberfläche zugeführt (c). Grafik entnommen aus: R. L. Juliano, X. Ming, O. Nakagawa, *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 147–157.

den sog. „late endosomes“ (LE)<sup>[77]</sup>, in welche das ON durch intraluminal Vesikel (ILV) umgeladen wird. In diesem Stadium werden LE, die mehrere ILV enthalten, gemeinhin als multivesikuläre Körper (multivesicular bodies, MVB) bezeichnet.<sup>[78]</sup> Darüber hinaus ist es den EE auch möglich, zu LEs zu reifen und den Übertragungsschritt zu umgehen.<sup>[75]</sup> ONs, welche durch Clathrin-abhängige Mechanismen internalisiert wurden, unterliegen zudem der Gefahr, über „recycling endosomes“ (RE) wieder zur Zelloberfläche transportiert zu werden.<sup>[79]</sup> Dies betrifft z.B. die G-Protein-gekoppelten LDL-Rezeptoren<sup>[80]</sup>, Transferrin<sup>[81]</sup> und den Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGP-R).<sup>[82]</sup> Gelingt den

ONs keine endosomale Freisetzung (endosomal escape) aus den LEs, verschmelzen diese mit Lysosomen (LY)<sup>[83]</sup>, in welchen die ONs letztlich enzymatisch abgebaut werden. Jeder Übertragungspunkt entlang dieser Route stellt daher eine Gelegenheit für ONs dar, ihre biologische Aktivität durch Erreichen des Zytoplasmas zu entfalten. Die endosomale Freisetzung korreliert maßgeblich mit der biologischen Wirkung von ON-Therapeutika, weshalb die Form der Endozytose auch entscheidend ist.<sup>[84]</sup> Die Freisetzung von ON aus MVB und/oder LE scheint jedoch der entscheidende endogene Prozess zur Erzielung pharmakologischer Wirkungen zu sein.<sup>[71]</sup>

Nicht-konjugierte ONs mit charakteristischen Strukturmotiven wie z.B. LNAs werden durch Gymnose aufgenommen (vgl. Kapitel **2.3.1**). Darüber hinaus sind ON-Therapeutika häufig auf zusätzliche Transfektionsmittel angewiesen. ASOs profitieren hierbei von einem PS-Backbone aufgrund zahlreicher produktiver Proteinbindungen.<sup>[71]</sup> siRNAs werden i.d.R. als Lipid-Nanopartikel (LNPs) transfiziert, wobei kationische Polymere als Transfektionsmittel zum Einsatz kommen; eine definierte molekulare Zusammensetzung ist allerdings nicht immer gewährleistet. So konnte gezeigt werden, dass sowohl in neutrale LNPs eingebettete<sup>[85]</sup> als auch solche über kationische LNPs transfizierte<sup>[86]</sup> siRNAs hauptsächlich über Pinozytose in das Endosom gelangen und die endosomale Freisetzung während der Maturierung der EEs zu LEs erfolgt. Polyplexe aus siRNA und zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) sowie Konjugate aus ihnen werden vorzugsweise über Scavenger-Rezeptoren internalisiert.<sup>[87]</sup> Analoge Beobachtungen wurden darüber hinaus mit einem SSO/CPP-Polyplex gemacht, bei welchem eine Clathrin-vermittelte Internalisierung erfolgte.<sup>[88]</sup> Allerdings sind nicht immer Fusionsprozesse der Endosomen untereinander oder mit der Formulierung ausschlaggebend für die endosomale Freisetzung. ASOs gelangen je nach Formulierung (Lipoplex oder Polyplex) über unterschiedliche Wege in das Cytosol.<sup>[89]</sup> Die Formulierung als Lipoplex zeigte z.B. eine kontinuierliche Freisetzung aus Endosomen durch einen porenbildenden Mechanismus statt eines Fusionsprozesses mit der endosomalen Membran.<sup>[90]</sup> Die Polyplex-Formulierung verursacht eine sofortige Freisetzung (burst-release) nach der Internalisierung aufgrund des „proton-sponge-Effekts“.<sup>[89]</sup> Den o.g. Beispielen liegt der gleiche Ansatz zugrunde: es werden große Mengen an Transfektionsmittel zur Internalisierung benutzt, was ein niedriges „Drug/Payload-ratio“ verursacht, also eine im Verhältnis zur Gesamtheit der transfizierten Materialien geringe Menge an therapeutisch aktiver

Substanz liefert. Dies bedingt u.A. unerwünschte Nebenwirkungen.<sup>[91]</sup> Aufgrund dessen erscheint die Modulation der zahlreichen endozytischen Pfade in Richtung eines einheitlichen Aufnahmemechanismus (v.a. die rezeptorvermittelte Aufnahme) sinnvoll und vielversprechend. Durch Einschränkung der Vielzahl unterschiedlicher Internalisierungsarten könnte der endosomale Arrest von ONs, verursacht durch ungerichtete bzw. unproduktive Verteilung über die Zellkompartimente, vermindert werden.<sup>[92]</sup> Eine Lösung bietet demnach die Konjugation von ONs mit (endogenen) Effektor-Molekülen, um zellspezifisch die Bindung an Oberflächenrezeptoren auszunutzen. Solche Konjugate werden hauptsächlich über Clathrin-vermittelte Prozesse internalisiert (self-delivery).<sup>[93,94]</sup>

Nach Rezeptorbindung beginnt sich der Ligand-Rezeptor-Komplex in einem Vesikel unter Beteiligung der GTPase Dynamin aus der Plasmamembran herauszuschneiden.<sup>[95,96]</sup> Der Transport dieser beladenen Vesikel durch die Endosomen erfolgt unter Kontrolle durch verschiedene Rab-Proteine (GTPasen)<sup>[97]</sup>, welche für die Steuerung der Vesikelmigration und der Fusionsprozesse derselben untereinander verantwortlich sind.<sup>[98]</sup> Rab5 ist hierbei für die Steuerung der Clathrin-beschichteten Vesikel zu den EE und Rab9 für den Verkehr zwischen den LE und dem Golgi-Apparat verantwortlich. Ferner interagieren Rab-Proteine mit Tethering-Proteinen, welche die Formen der Endosomen erkennen und sie an den vorgesehenen Bestimmungsort, z.B. verschiedene Golgi-Subkompartimente weiterleiten.<sup>[99]</sup> Dort leiten Vesikelmembran-gebundene v-SNARE-Proteine (vesicle synaptosome-associated protein receptor) im Zusammenspiel mit den Golgimembran-gebundenen t-SNARE-Proteinen (*target synaptosome-associated protein receptor*) schließlich die Membranfusion der Zellkompartimente ein.<sup>[100]</sup> An diesem Punkt kann durch Hemmung der Proteinkinase A der Übergang zu LYs verhindern, und die Fusion mit dem TGN bevorzugt werden.<sup>[101]</sup> Durch Interaktion der beladenen Vesikel mit dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR) bietet sich für das Cargo zudem eine weitere Möglichkeit der endosomalen Freisetzung.<sup>[102]</sup> Zusammenfassend bieten sich also im Laufe des endosomalen Transports drei vielversprechende Routen, durch welche ONs potentiell das Zytoplasma erreichen können:

1. Der Transport von den recycling endosomes zur Plasmamembran
2. Der Transport zwischen early endosomes und trans-Golgi-Netzwerk (retrograde trafficking)<sup>[103]</sup>



3. Innerhalb der multivesicular bodies, bei der Reifung von intraluminalen Vesikel bzw. den Fusionsprozessen. Die Lipiddoppelschicht ist hier durchlässig.<sup>[104]</sup>

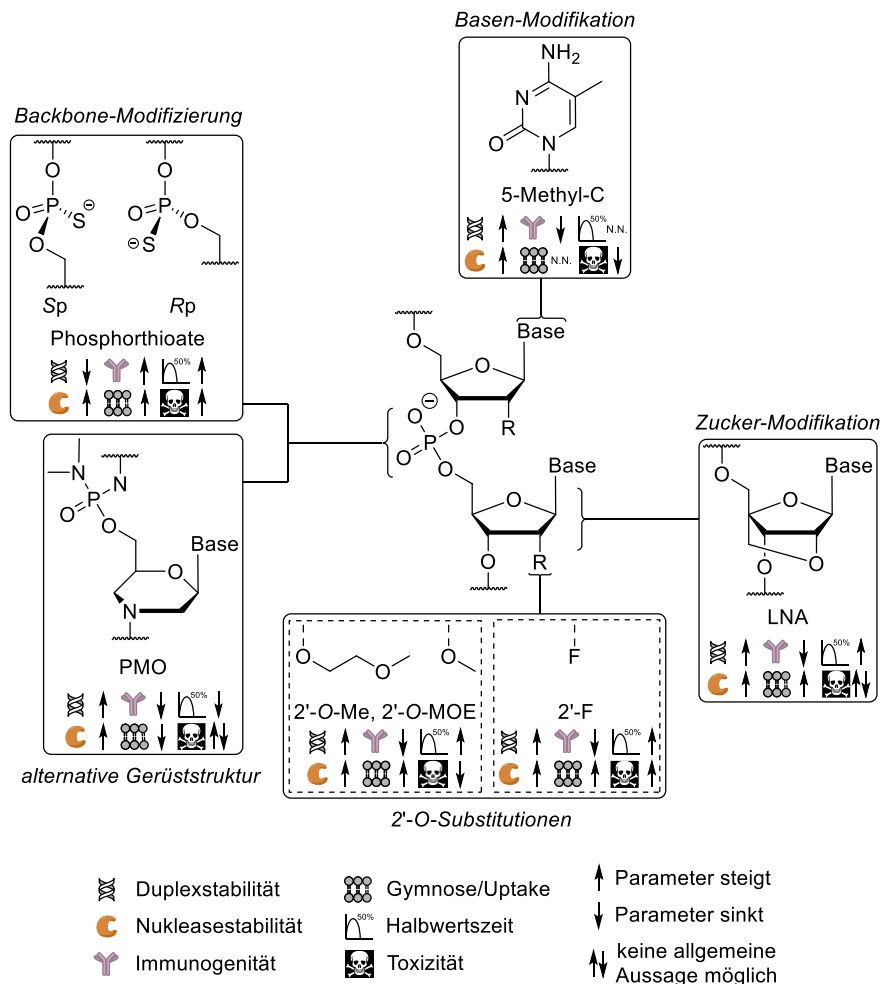
Im letzteren Fall spielten LBPA (Bisoleoyl-lysobisphosphorsäure) und die spezifischen ESCRT-Multiproteinkomplexe (endosomal sorting complexes required for transport) eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von intraluminalen ONs in das Cytosol.<sup>[105]</sup> ESCRT III fördert hierbei die Einstülpung der Membranknospen und führt zusammen mit LBPA die Vesikelbiogenese für den endosomalen Eintritt der ONs sowie die Vermittlung der Rückfusion durch.<sup>[106,107]</sup> An diesem Punkt werden intermediär einfache-Lipidschichten ausgebildet. Zudem sind die Membranen der ILVs aufgrund der starken Krümmung dieser relativ kleinen Kompartimente stark gespannt<sup>[108]</sup>, was letztendlich die endosomale Freisetzung ermöglicht.

Unter Ausnutzung dieses Clathrin-abhängigen Wegs konnte mit einem RGD-Peptid-SSO Konjugat die rezeptorvermittelte Aufnahme durch Interaktion mit Integrinen gezeigt werden; die Freisetzung des Konjugats erfolgte hierbei aus den LE unter Gymnose-ähnlichen Bedingungen.<sup>[109]</sup> Ein siRNA-Cholesterin-Konjugat wurde durch Bindung des membranständigen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) internalisiert und aus EE freigesetzt.<sup>[110]</sup> Letztlich wird in den zugelassenen siRNA-Therapeutika Givosiran<sup>[2]</sup>, Lumasiran<sup>[3]</sup> und Inclisiran<sup>[67]</sup> auf einen triantenären GalNAc-Liganden gesetzt, welcher die siRNA durch Bindung des an Hepatozyten befindlichen Asialoglycoproteinrezeptors (ASGPR) zielgerichtet in der Leber akkumulieren lässt. Die Konjugation von ONs mit solchen Effektor-Liganden ist ein äußerst innovativer Ansatz, um die Bioverfügbarkeit therapeutischer ONs zu verbessern. In Kapitel 2.3.2 werden Möglichkeiten der Anbindung solcher Liganden anhand prominenter Beispiele aufgezeigt.

### 2.3 Medizinalchemische Optimierung von ON-Therapeutika

Trotz des oftmals *in vitro* feststellbaren enormen Potenzials von ASOs, SSOs, siRNAs und anderer ON-basierten Therapeutika ist die Ernüchterung spätestens bei der Testung *in vivo* groß.<sup>[12,111]</sup> Die größte Herausforderung, welche bei der Konzeption von ON-Therapeutika überwunden werden muss und die Entwicklung hochwirksamer ON-Therapeutika erschwert, ist die Gewährleistung einer hinreichend hohen, pharmakologischen Bioverfügbarkeit. Sie definiert, nach welcher Zeit seit Verabreichung des Arzneistoffs und in welchem Umfang der Wirkstoff resorbiert wird und unverändert am

Wirkort zur Verfügung steht. Da ON-Therapeutika nicht oral verabreicht werden<sup>[112]</sup>, unterliegen sie auch nicht der von Lipinski aufgestellten „Rule of Five“<sup>[113]</sup> und zeigen somit ganz charakteristische Eigenheiten bzgl. der Pharmakokinetik. Diese Eigenheiten betreffen hauptsächlich die Verteilung, den Metabolismus und die Toxizität der ONs.<sup>[114]</sup> So sind exogene ONs häufig Substrate für Exo- und Endonukleasen, was geringe Halbwertszeiten *in vivo* zur Folge hat.<sup>[115]</sup> Ihre native, polyanionische Struktur führt aufgrund von Abstoßungseffekten mit anionischen Zellmembran-Phospholipiden zu einer schlechten Aufnahme in die Zielzellen.<sup>[116]</sup> Der extrazelluläre Abbau in Blut und Gewebe, der intrazelluläre Abbau im retikuloendothelialen System (RES) sowie die rapide renale Elimination von ONs schränken ihre therapeutische Wirksamkeit *in vivo* weiter ein und können letztlich bis hin zur Unwirksamkeit führen.<sup>[117]</sup> Empirisch wurde über die letzten Jahrzehnte daher eine *Toolbox* entwickelt, um sich dieser



**Abb. 2.3:** Ausgewählte strukturelle Modifikationen in zugelassenen, therapeutischen ASOs und siRNAs am Beispiel eines Dinukleotid-Ausschnitts. Der Einfluss der Modifikationen auf relevante, pharmakologische Parameter ist in Piktogramm-Form angegeben.

Probleme anzunehmen. Eine Übersicht der verschiedenen Möglichkeiten der chemischen ON-Modifizierung sind in **Abb. 2.3** gezeigt und stellen eine Zusammenfassung der prominentesten Beispiele da. Diese *Toolbox* kann grundlegend in vier Kategorien unterteilt werden:

1. Modifikationen der Purin-/Pyrimidin-Struktur der Nukleobasen
2. Modifikationen des nicht-verbrückenden Sauerstoffs der internukleotidischen Phosphatbrücke (First Generation ASO)
3. Modifikationen oder Austausch der Ribose- bzw. Desoxyribose-Einheit (Second Generation ASO) und
4. alternative Gerüststrukturen zum vollständigen Ersatz der internukleotidischen Phosphatbrücke (Third Generation ASO)

Jede Modifikation bewirkt eine Verbesserung in mindestens einem der o.g. Punkte, ist aber meist an bestimmte Implikationen gebunden. Je nach Art der Veränderung im Vergleich zur nativen Struktur und dem Zeitpunkt der Veröffentlichung werden mehrere Modifikationen in "Generationen" eingeteilt, die von der ersten bis zur dritten reichen und in der obigen Aufzählung den entsprechenden Kategorien zugeordnet sind.<sup>[118–121]</sup>

### **2.3.1 Modifikationen von Oligonucleotid-Bausteinen am Beispiel zugelassener ON-Therapeutika**

Eine mittlerweile als nahezu unverzichtbar geltende Modifikation, die in Fomivirsen<sup>[32]</sup> Mipomersen<sup>[32]</sup>, Inotersen<sup>[33]</sup> und Nusinersen<sup>[34]</sup> bereits verwendet wird, ist das Phosphorothioat-Backbone (PT-Backbone). Die Einführung eines nicht-verbrückenden Schwefel-Atoms in der Phosphat-Gruppe hat weitreichende Folgen in Bezug auf die Nukleasestabilität. Durch die Einführung des Schwefel-Atoms wird aus dem zentralen Phosphoratom ein stereogenes Zentrum, sodass Diastereomere, entweder in  $S_P$ - oder  $R_P$ -Konfiguration entstehen.<sup>[122]</sup> Diese zeigen unterschiedlich ausgeprägte Nukleasestabilitäten und Bindungsaffinitäten zu basenkomplementären mRNAs.<sup>[28,29]</sup> Konkret sind  $S_P$ -konfigurierte PS-ASOs nukleolytisch stabiler als  $R_P$ -konfigurierte Thioate.<sup>[123]</sup> Letztere bilden allerdings aufgrund ihrer strukturell größeren Übereinstimmung mit nativer DNA stabilere Duplices mit mRNA als es rein  $S_P$ -konfigurierte ASOs oder Gemische von  $R_P/S_P$ -ASOs vermögen.<sup>[123]</sup> Diese Effekte treten *in vivo* allerdings nicht signifikant in

Erscheinung.<sup>[29]</sup> Im Zusammenhang mit PT-Backbones ist oftmals von einer gewissen „stickiness“ die Rede, welche anhand einer Vielzahl<sup>[27]</sup> von produktiven aber auch (die Bioverfügbarkeit reduzierenden) unspezifischen Wechselwirkungen mit Plasmaproteinen wie Albumin<sup>[124]</sup> oder Heparin<sup>[125]</sup> beobachtet werden konnte. Im Allgemeinen führen diese Wechselwirkungen zu einer verlängerten Plasmahalbwertszeit und einer verringerten renalen Ausscheidung<sup>[30,126]</sup>, allerdings sind oftmals toxische Nebenwirkungen in diesem Zusammenhang zu beobachten.<sup>[127]</sup> Gapmer-Strukturen mit kombiniertem Einsatz von PT- und LNA-Modifikationen sind gymnotisch äußerst aktiv und führen zu einer aktiven Aufnahme derart modifizierter ONs durch die Zielkompartimente.<sup>[28,128]</sup> Hierbei akkumulieren vollständig PT-modifizierte ASOs hauptsächlich in den Nieren und der Leber.<sup>[129]</sup> Nachdem in *Streptomyces lividans* natürlich vorkommende PT-Modifikationen im Zusammenhang mit CpG-Motiven gefunden wurden<sup>[130]</sup> und solche Motive bekanntlich durch Aktivierung des Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) eine Immunantwort provozieren<sup>[131]</sup>, wurden PT-CpG Motive in der Synthese von ONs in der Immuntherapie angewendet; allerdings mit mäßigem Erfolg.<sup>[132,133]</sup> Nicht in allen Anwendungen ist die Stimulierung einer Immunantwort erwünscht, weshalb PT-modifizierte ONs häufig in Kombination mit anderen Modifikationen, bspw. solchen an der Ribose-Einheit implementiert werden.

Zwei besondere Modifikationen der "zweiten Generation" werden bei der Entwicklung von ASO-Gapmeren standardmäßig in der 2'-Position des Riboserings eingesetzt. Hierbei handelt es sich um sog. O-Alkylierungen, darunter die natürlich vorkommende 2'-O-Methylierung (2'-OMe)<sup>[134]</sup> und die analoge, allerdings artifizielle 2'-O-Methoxyethyl-(2'-MOE)-Gruppe.<sup>[135]</sup> Aufgrund stereoelektronischer Effekte veranlassen 2'-OMe und 2'-MOE zwar nicht wie LNAs die Aktivierung von RNase H<sup>[136]</sup>, dennoch wird aufgrund der 2'-O-Konfiguration die *N*-Typ/*Gauche*-Konformation favorisiert.<sup>[137]</sup> Dies begünstigt wiederum die Bildung einer A-Helix mit mRNA<sup>[138]</sup>, sodass eine erhöhte Nuklease-Stabilität aufgrund einer höheren Schmelztemperatur der Duplex zu beobachten ist.<sup>[139,140]</sup> Anhand von Kristallstrukturanalysen konnten durch 2'-OMe und 2'-MOE koordinierte Wassermoleküle in der Minor-Groove als zusätzliches stabilisierendes Element nachgewiesen werden.<sup>[137]</sup> Darüber hinaus zeigen 2'-OMe/2'-MOE modifizierte Gapmer ASOs keine immunostimulatorischen oder toxische Effekte<sup>[141]</sup> und weisen im Vergleich zu entsprechenden PT-ASOs eine zehnfach höhere Halbwertszeit auf,<sup>[142]</sup> was folglich zu

einer verstärkten Aufnahme und Wirkung *in vitro* und *in vivo* führt.<sup>[143]</sup>

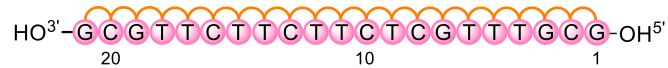
Eine in siRNAs häufig verwendete 2'-Modifikation stellt die Platzierung eines Fluor-Atoms anstelle von überwiegend in ASOs verwendeten 2'-OMe/2'-MOE-Einheiten da. 2'-F ruft aufgrund der starken Elektronegativität und der infolge dessen stark polarisierten C-F-Bindung keine immunstimulierenden Effekte hervor, analog zu 2'-OMe/2'-MOE.<sup>[144]</sup> Da 2'-F keine H-Brücken mit Wassermolekülen in der Minor-Groove eingehen kann, ist die Bildungsenthalpie stark erhöht<sup>[145]</sup>, was zu einer stärkeren Watson-Crick-Basenpaarung<sup>[146]</sup> und damit zu einer erhöhten Duplexstabilität mit komplementärer mRNA führt.<sup>[147]</sup> Aufgrund der zu 2'-OMe/2'-MOE analog eingenommenen 3'-*endo* Konformation zeigen 2'-F modifizierte siRNAs zudem eine deutlich verbesserte Stabilität gegenüber Endo- und Exonukleasen.<sup>[148]</sup> Allerdings führt die 2'-F-Modifikation vermehrt zu unspezifischen Proteininteraktion und damit zu toxischen Nebeneffekten (insbesondere bei höheren Dosierungen).<sup>[149,150]</sup> Gleichzeitig wird hierdurch die Plasmastabilität und in Folge dessen die Halbwertszeit erhöht, was letztlich in einer potenzierten Aktivität verglichen mit unmodifizierter siRNAs resultiert.<sup>[151]</sup>

Statt einer Modifizierung der Ribose-Einheit in 2'-Position ist der Ersatz der gesamten Zucker-Einheit eine Möglichkeit, ribosomales Blocking (occupancy-only) zu triggern. In diesem Fall wird durch sterische Effekte nach Bindung an die Target-Struktur eine biologische Aktivität der ASOs generiert (und weniger durch RNase H-vermittelte Aktivität). In den zugelassenen ASOs Eteplirsen<sup>[44]</sup>, Golodirsen<sup>[45]</sup>, Viltolarsen<sup>[46]</sup> und Casimersen<sup>[47]</sup> wurde daher der Ribosering durch Morpholino-Einheiten (phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide, PMO, vgl. **Abb. 2.3**) ersetzt. PMOs<sup>[152]</sup> gehören neben den Peptid-Nukleinsäuren<sup>[153,154]</sup> (auf welche an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird) zu den Modifikationen der „dritten Generation“ und weisen als grundlegende Zucker-Modifikation einen sechsgliedrigen Morpholin-Ring auf, sodass sie im entferntesten Sinne als Kongenere der Pyranosen angesehen werden können. Da die Nukleobasen analog zur nativen Furanose ebenfalls über eine  $\beta$ -N-glykosidische Bindung angeknüpft sind, kommt der Stickstoff des Morpholin-Rings in 3'-Position zum Liegen, so dass eine N3'→P5'-Internukleotid-Bindung aus Sicht der 5'→3'-Richtung ausgebildet wird. Typischerweise ist der unter physiologischen Bedingungen negativ geladene, nicht-verbrückende Sauerstoff durch eine elektroneutrale P-N-Bindung ersetzt. Bei diesem den Phosphoramidaten<sup>[155]</sup> eigenen Motiv trägt der Stickstoff lipophile,

aliphatische Alkylketten zum Zweck einer verbesserten Membrangängigkeit (siehe Kapitel 6). Aufgrund ihrer signifikanten strukturellen Unterschiede zu nativen ONs sind PMOs nicht in der Lage, den mRNA-Abbau durch RNase H oder RNAi zu initiieren.<sup>[156]</sup> Sie werden jedoch erfolgreich zur Blockade weiterer RNA-abhängiger Genregulationen eingesetzt<sup>[157]</sup>, z. B. zur Steuerung des alternativen Spleißens von prä-mRNA im Zellkern.<sup>[158]</sup> Die Struktur von PMOs begünstigt die Bildung stabilerer Duplices und zeigt darüber hinaus keine immun-aktivierenden Eigenschaften. Ferner zeigen PMOs eine hohe nukleolytische Stabilität.<sup>[159]</sup> Sie bilden mit Target-mRNA stabile Duplices<sup>[156]</sup> und sind nicht-immunogen.<sup>[160]</sup> Allerdings zeigen sie aufgrund der fehlenden Ladung im Rückgrat keine starke Proteinbindung<sup>[158]</sup> und in Folge dessen geringe Halbwertszeiten.<sup>[157]</sup> Zudem können PMOs bei höheren Dosierungen toxische Effekte hervorrufen.<sup>[161–164]</sup>

Ebenfalls zu den Modifikationen der „dritten Generation“ zählen die verbrückten Nukleinsäure-Bausteine, die sog. LNAs (*locked nucleic acids*), welche sich durch eine starre 3'-endo-Konformation auszeichnen. Dies wird durch Verbrückung der 2'-Hydroxy-Gruppe mit der C-4'-Position über eine Methylen-Gruppe erzielt<sup>[165]</sup>, wodurch die Gauche-Konformation stabilisiert wird.<sup>[166]</sup> Diese Zuckerstruktur erhöht die Duplexstabilität bei der Hybridisierung mit anderen LNA-, DNA- oder RNA-Strängen.<sup>[167,168]</sup> Darüber hinaus zeigen LNA-modifizierte ONs eine erhöhte Stabilität gegenüber dem Abbau durch Exonukleasen, wenn sie am 5'-Ende<sup>[169]</sup> oder am 3'-Ende<sup>[134]</sup> eingeführt werden. LNAs werden daher häufig in Gapmer-Strukturen verwendet, wo sie ein zentrales, meist PT-modifiziertes Gap-Segment flankieren. Dadurch wird eine erhöhte Nukleasestabilität bei gleichzeitiger Beibehaltung der RNase H-Aktivität erzielt.<sup>[21]</sup> Diese Gapmere werden aktiv von Zellen durch Gymnose aufgenommen<sup>[128,170,171]</sup> und besitzen eine erhöhte Halbwertszeit.<sup>[21]</sup> Zudem zählen LNAs zu den nicht-immunogenen Modifikationen.<sup>[172]</sup> Allerdings konnten abhängig von der Position der LNA-Modifikation innerhalb eines Stranges im Zusammenspiel mit einer PT-Gap Hepatotoxizitäten gefunden werden.<sup>[173,174]</sup> Eine Übersicht zu den von der FDA und EMA zugelassenen ON-Therapeutika ist in **Abb. 2.4** und **Abb. 2.5** gezeigt.

**Fomivirsen:**  
virale IE2 mRNA



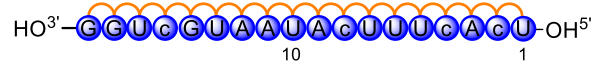
**Mipomersen:**  
apoB mRNA



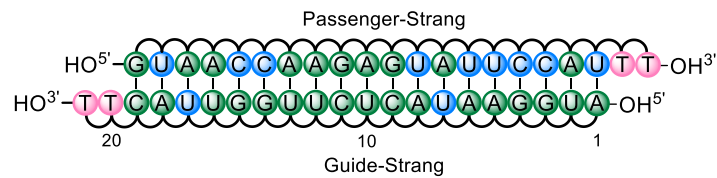
**Eteplirsen:**  
dystrophin pre-mRNA  
Exon 51



**Nusinersen:**  
SMN1 & SMN2  
pre-mRNA



**Patisiran:**  
TTR mRNA



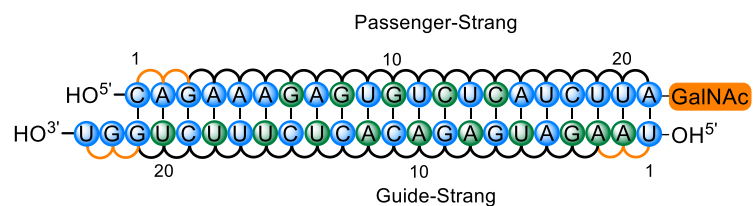
**Inotersen:**  
TTR mRNA



**Volanesorsen**  
apoC-III



**Givosiran:**  
ALAS1 mRNA



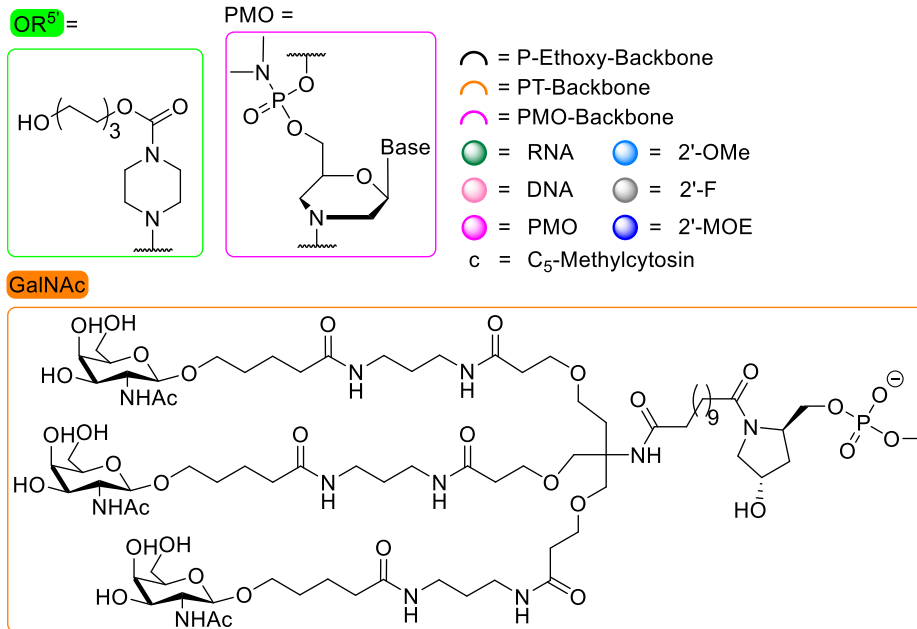
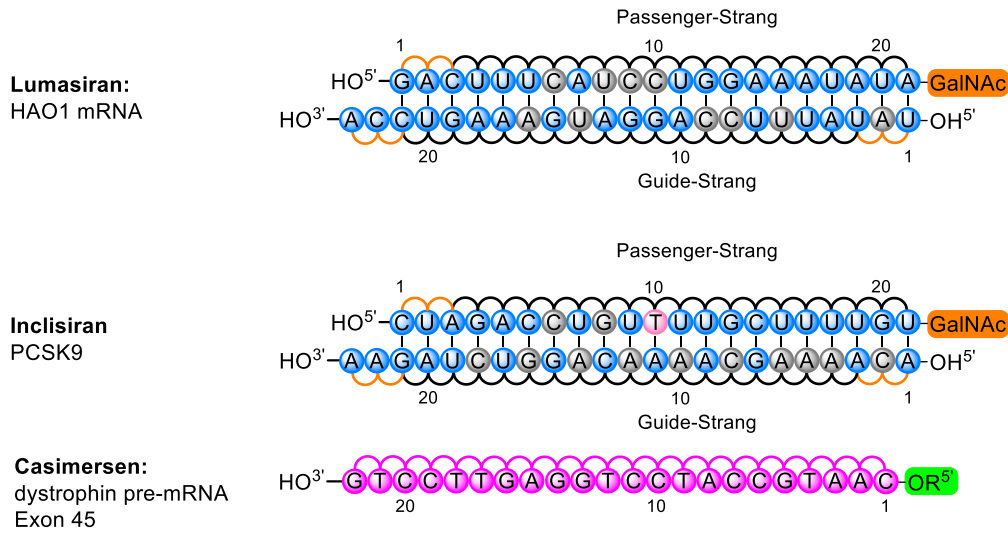
**Golodirsen:**  
dystrophin pre-mRNA  
Exon 53



**Viltolarsen:**  
dystrophin pre-mRNA  
Exon 53



**Abb. 2.4:** Name, Sequenz und Modifikationen FDA- und EMA-zugelassener ON-Therapeutika mit Angabe des Targets. Die Strukturen sind chronologisch nach dem Datum ihrer Zulassung angeordnet, von oben nach unten.



**Abb. 2.5:** Name, Sequenz und Modifikationen FDA- und EMA-zugelassener ON-Therapeutika mit Angabe des Targets. Die Strukturen sind chronologisch nach dem Datum ihrer Zulassung angeordnet, von oben nach unten (Fortsetzung **Abb. 2.4**).

Modifizierungen der kanonischen Nucleobasen lassen sich *per se* nicht einer der drei „Generationen“ zuordnen. Sie bieten allerdings hinsichtlich der Pharmakokinetik als auch der Pharmakodynamik großes Potential zur Verbesserung der Duplexstabilität, der Nucleasestabilität und der zellulären Internalisierung. Großes Augenmerk muss hierbei auf die Fähigkeit zur Basenpaarung nach Watson-Crick gelegt werden, damit eine hinreichend stabile Duplex-Struktur mit der Target-mRNA gebildet werden kann, welche als Substrat bspw. für RNase H oder den RISC-Komplex dient. Die Auswirkung der modifizierten Basen auf die Performance des ON ist streng von der Platzierung im



Guide- oder Passenger-Strang einer siRNA<sup>[175]</sup> oder an den Flanken eines ASO (5'/3'-Ende) abhängig.<sup>[176]</sup> Die Möglichkeiten für strukturelle Veränderungen an den Nucleobasen sind zahlreich und gehen über den Rahmen dieser Arbeit weit hinaus. Einen Überblick bieten die Übersichtsartikel von Herdewijn<sup>[177]</sup> und Peacock.<sup>[178]</sup> Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die in Nusinersen verwendete 5-Methyl-desoxycytosin-Modifikation (5-Me-dC, siehe **Abb. 2.3**). 5-Alkyl-Cytosin-Analoga, insbesondere das native 5-Methyl-desoxycytosin, erhöht die Schmelztemperatur mit komplementärer mRNA um 0.5 °C pro Modifikation.<sup>[179]</sup> Diese Eigenschaft ist auf die hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den planar gestapelten Nucleobasen in der Major-Groove zurückzuführen. Die Modifikation verringert die Immunogenität und verleiht zudem Nucleleasestabilität.<sup>[121]</sup> 5-Alkyl-Derivate von Uracil und Cytosin führen je nach Platzierung in der Sequenz zu einer gleichbleibenden oder verbesserten Silencing-Aktivität.<sup>[180]</sup> In saurem Milieu sind solche 5-methylierten Cytosin-Derivate allerdings anfällig für Desaminierung.<sup>[181]</sup>

### 2.3.2 Modifizierung durch Konjugation mit endogenen Rezeptorliganden

Bereits in Kapitel 2.2 wurden die ungesteuerte und schwache zelluläre Aufnahme, die ungerichtete Verteilung über die Zellkompartimente und die unzureichende Freisetzung aus den Endosomen als intrinsisches Problem nativer ONs identifiziert. Maßgeblich wurde dies auf das Fehlen definierter Struktureinheiten zurückgeführt, welche durch gezielte Wechselwirkungen mit Oberflächenrezeptoren einen gerichteten, uniformen und v.a. produktiven Transportweg für ONs in die Zelle eröffnen. Eine vielversprechende Lösung bietet die Modulation der Aufnahme über Clathrin-abhängige Internalisierungsmechanismen, konkret die rezeptorvermittelte Endozytose. Hierbei werden endogene Effektor-Moleküle als natürliche Substrate/Liganden der entsprechenden Rezeptoren als Target-Einheit und Konjugationspartner für ONs herangezogen. In solchen Konjugaten ist somit die sequenzspezifische Bindungsfähigkeit von ONs mit der Funktionalität von Rezeptorliganden kombiniert. Im Vorfeld zur Entwicklung solcher ON-Konjugate müssen hierbei mehrere Bedingungen erfüllt sein:

1. Ein geeignetes Ligand-Rezeptor-Paar muss identifiziert sein.
2. Der verwendete Ligand muss eine hohe Affinität für den spezifischen Rezeptor aufweisen und diesen zur Internalisierung veranlassen.

3. Der Rezeptor ist auf der Zelloberfläche des Zielgewebes in ausreichenden Mengen vorhanden und im Vergleich zu anderen Geweben stark überexprimiert.
4. Der Rezeptor durchläuft nach der Internalisierung einen Rückführungsprozess an die Zelloberfläche und wird lysosomal nicht abgebaut.

Dieses grundsätzliche Verständnis der biochemischen Rezeptordynamik ist für die Konstruktion eines potenten ON-SM-Konjugats unerlässlich. Ebenso wichtig ist die Wahl der Plattform zur Anbindung der Effektor-Moleküle, Fluorophore oder reaktiven Gruppen (im Folgenden unter dem Begriff „Liganden“ zusammengefasst), welche sich in verschiedene Kategorien einteilen lassen. Diese Einteilung wurde bereits in den frühen 1990er Jahren durch Goodchild<sup>[182]</sup> etabliert und bietet grundsätzlich zwei Ansätze:

1. Konjugation einer Target-Einheit im Verlauf der ON-Synthese am Synthesizer durch Implementierung eines entsprechenden Phosphoramidits im Zyklus
2. Konjugation post-synthetisch durch Reaktion zwischen reaktiven Linker-Molekülen, welche im Verlauf der SPOS eingeführt wurden, mit entsprechenden funktionellen Gruppen, welche sich am Liganden befinden.

Jeder Ansatz bietet für sich entscheidende Vorteile, birgt allerdings auch z.T. erhebliche Einschränkungen in der Auswahl potenzieller, miteinander reagierender Partner. Am prominentesten ist die Verwendung von Phosphoramiditen auf Basis der von Beaucage, Matteucci und Caruthers entwickelten P(III)-Chemie.<sup>[183,184]</sup> Dieser Monomer-basierte Ansatz beruht auf der ausschließlichen Verwendung von Bausteinen, welche mit der konventionellen Synthesizer-Chemie kompatibel sind und als Lösungen am Gerät angeschlossen werden können. Diese Herangehensweise bietet größtmögliche Kontrolle über die Anzahl und die Positionierung des Liganden innerhalb der Sequenz. Sind phosphitylierte Liganden zusätzlich mit einer DMTr-Schutzgruppe ausgestattet, kann unmittelbar nach der sauren Entschützung ein Rückschluss auf die Kupplungseffizienz durch die spezifische Absorption des Trityl-Kations gezogen werden. Etwaige Unstimmigkeiten können somit sofort behoben oder Kupplungsbedingungen angepasst werden, um eine möglichst quantitative Umsetzung mit der wachsenden ON-Kette zu ermöglichen. Bei ausreichender Menge an Monomer-Lösung ist die Synthese von Konjugaten mit unterschiedlicher Sequenz parallel und vollautomatisiert möglich. Da die SPOS eine wohletablierte und ausgereifte Technik unter Standardbedingungen darstellt, sind Nebenreaktionen (bei adäquater Verwendung entsprechender

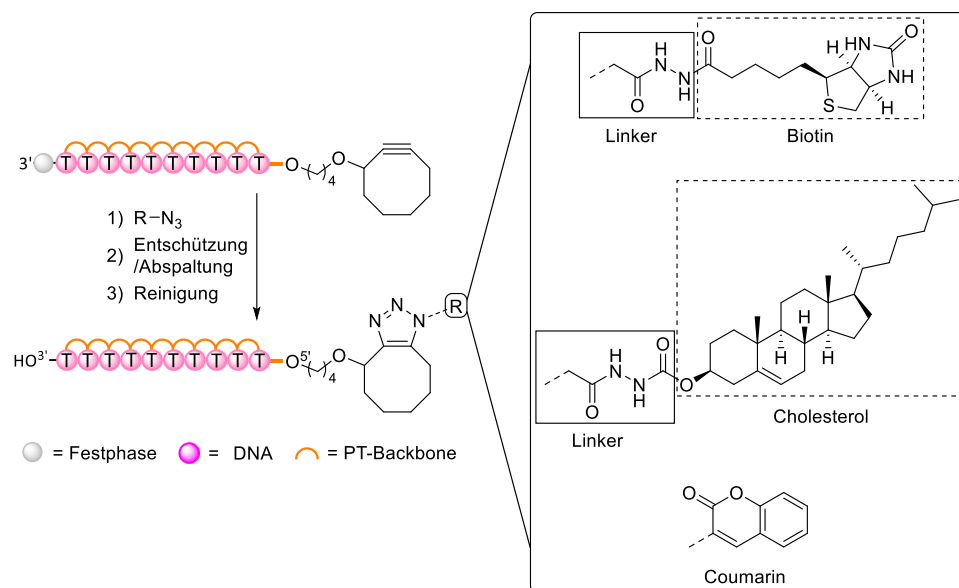
Schutzgruppen) sowohl an den Nukleotiden als auch am Liganden minimiert. Zudem gestaltet sich die Aufarbeitung und Reinigung der ON-Konjugate bei Verwendung von Festphasen zeitsparend und apparativ überschaubar. Grundsätzlich kann hierbei der einzuführende Ligand entweder an ein Standard-Nukleotid gebunden implementiert werden, oder es wird auf ein nicht-nukleosidisches Synthon zurückgegriffen. Hierin liegt allerdings ein intrinsischer Nachteil: oftmals muss für einen speziellen Liganden das entsprechende Phosphoramidit erst mühsam hergestellt werden. Hierfür ist das Vorhandensein einer Hydroxygruppe unabdinglich. Der Alkohol darf zudem nicht an essenziellen Wechselwirkungen mit dem Rezeptor beteiligt sein. Die Reaktionsbedingungen und die Schutzgruppenstrategie wurden für den konventionellen Vierschritt-Zyklus an DNA-Synthesizern zwar fortlaufend über die Jahre optimiert, die Synthese der Bausteine hingegen beruht im Prinzip allerdings immer noch auf den von Caruthers entwickelten Methoden.<sup>[184]</sup> Hierbei werden reaktive Phosphitylierungs-Reagenzien wie z.B. 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit (PCI)<sup>[185]</sup> oder das etwas mildere und selektivere 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidit (PN)<sup>[186]</sup> verwendet, welche nicht sehr lagerstabil sind und daher regelmäßig neu beschafft/synthetisiert werden müssen. Die aus ihnen gebildeten, phosphitylierten Spezies müssen unter Zuhilfenahme von Basen wie z.B. NET3 säulenchromatographisch aufwendig und schnell gereinigt werden. Ein Produktverlust durch Zersetzung bei Kontakt mit dem Silicagel kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, die Ausbeuten sind daher *per se* nicht quantitativ. Gerade bei aufwendigen Synthesen des zu phosphitylierenden Liganden sind geringe Ausbeuten im Phosphitylierungsschritt unzufriedenstellend. Lösungen dieser Reagenzien sind zudem selbst am Synthesizer nur wenige Tage lagerstabil. Die Synthese und Lagerung der Reinstoffe muss darüber hinaus unter explizitem Ausschluss von Wasser und Sauerstoff erfolgen, um die Performance der SPOS nicht negativ zu beeinflussen. Eine Lösung dieses Problems der geringen „bench stability“ bietet eine sog. „On-demand-flow-Synthese“, welche auf festphasengebundene Phosphitylierungs-Reagenzien zurückgreift und die Bereitstellung entsprechender Phosphoramidite in quantitativen Ausbeuten bei vergleichsweise geringen Reaktionszeiten und ohne zusätzliche Aufreinigungsschritte verspricht.<sup>[187]</sup>

Der ausschließlichen Verwendung von P(III)-Amiditen zur Konjugation von Liganden an ein ON gegenüber steht die Verwendung von Plattform-Chemikalien, welche die

Implementierung von Liganden über eine Vielzahl von Reaktionstypen ermöglichen. Somit ist nicht zwingend eine Phosphitylierung des Liganden bzw. das Vorhandensein von Alkohol-Gruppen voraussetzen. Die Reaktionen können hierbei „on-bead“ oder „off-bead“ erfolgen<sup>[188]</sup>, je nachdem ob die Konjugation noch an der Festphase vorgenommen werden soll, oder das vollständig entschützte ON in Lösung mit einem Liganden zur Reaktion gebracht wird. Zur Veranschaulichung dieser beiden Ansätze werden im Folgenden zwei konkrete und prominente Beispiele herangezogen<sup>[1]</sup>, welche analog zu Kapitel 2.3.1 die unterschiedlichen Positionen aufzeigen, an welchen die Konjugation eines Liganden innerhalb eines Dinukleotid-Ausschnitts erfolgen kann. Ob die Einführung eines potentiellen Liganden am 3'-Ende oder 5'-Ende erfolgt, ist hierbei für die Effektivität unerheblich.<sup>[189,190]</sup>

### 2.3.2.1 Der on-bead-Ansatz

Die Arbeit von Singh bietet anhand der Implementierung einer Reihe unterschiedlicher Liganden über die SPAAC einen Einblick in die große Versatilität bei Verwendung des on-bead-Ansatzes. Das 5'-Ende einzelsträngiger Decamere von Thymidin (dT<sub>10</sub>) wurde zunächst durch Implementierung eines Phosphoramidits einer Cyclooctin-Einheit (4-(Cyclooct-2-in-1-yloxy)butan-1-ol) mit einer Reaktions-Plattform für die kupferfreie Klick-Reaktion ausgestattet.<sup>[191]</sup> Hierbei handelt es sich um die kleinstmögliche, nicht fluorierte, monocyclische Cyclooctin-Einheit, welche im Vergleich zu anderen



**Abb. 2.6:** On-bead-Ansatz nach Singh zur Synthese 5'-konjugierter ONs auf Basis einer SPAAC-Plattform mit Azid-funktionalisierten biologisch aktiven Liganden.

SPAAC-fähigen Linkern wie DBCO eine geringere Lipophilie sowie einen geringeren sterischen Anspruch aufweist und aus einer Vierstufen Synthese leicht zugänglich ist.<sup>[192]</sup>

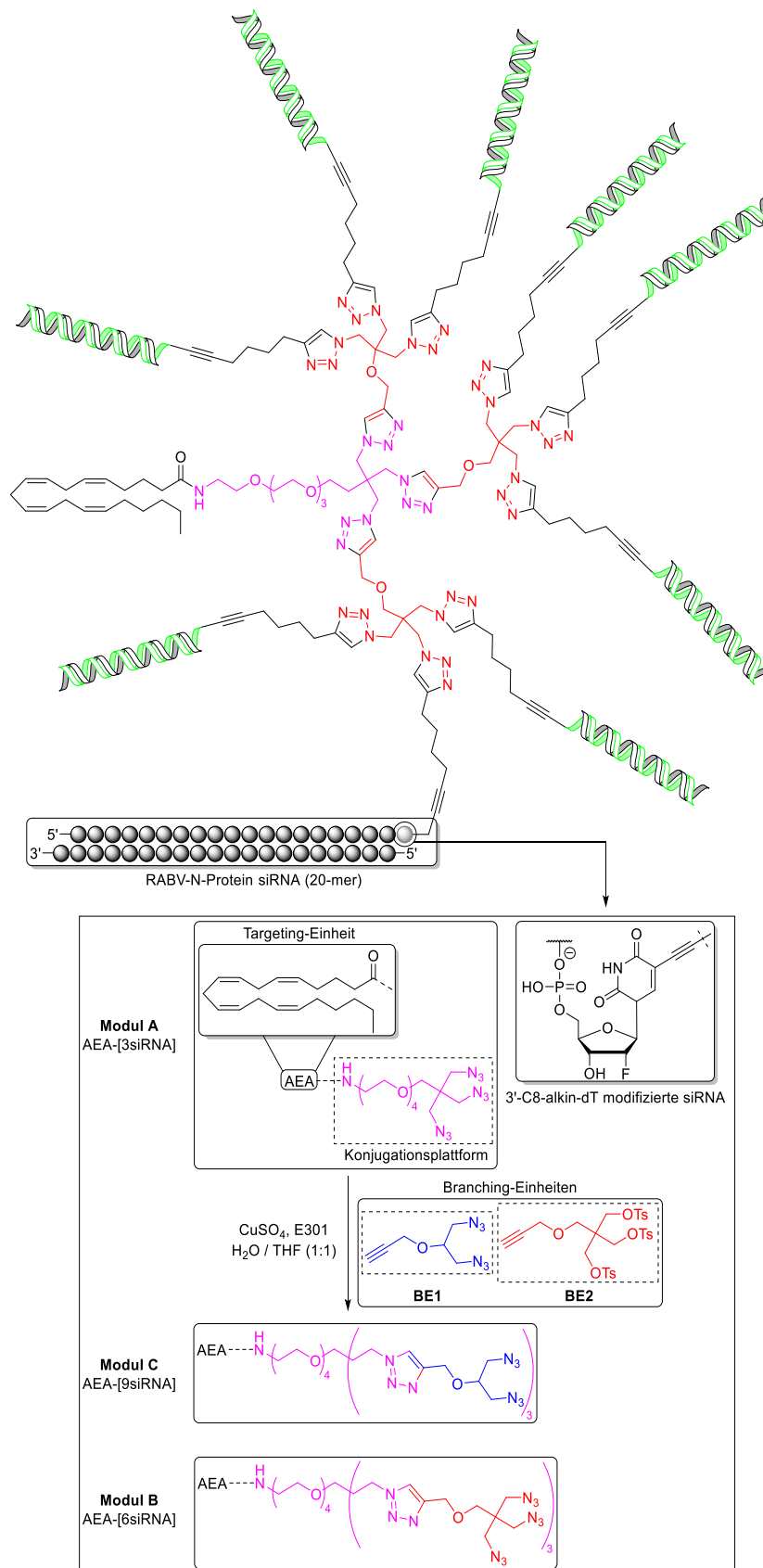
Die anschließende Reaktion des Festphasenmaterials mit Azid-Derivaten von Biotin, Coumarin oder Cholesterol konnte durch Inkubation in DMSO oder chlorierten Lösungsmitteln eine Vielzahl von Konjugaten biologisch relevanter Substanzen am 5'-Ende in hohen Ausbeuten erzeugen. Die Aufarbeitung solcher ON-Konjugate ist bei diesem Ansatz apparativ wenig anspruchsvoll. Das Waschen der Festphase genügt, um überschüssige Reagenzien oder Nebenprodukte zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Entschützung der Nucleobasen und die Spaltung vom Träger i.d.R. ammoniak-alkalisch in einem Schritt. Ein entscheidender Vorteil von on-bead Ansätzen im Vergleich zu off-bead Ansätzen ist die Freiheit in Bezug auf die Wahl des Lösungsmittels. Bei off-bead Ansätzen muss ein Lösungsmittelgemisch gefunden werden, in welchem sowohl das überwiegend hydrophile ON als auch die meist lipophilen Liganden zur Reaktion gebracht werden können. Zudem muss bei der anschließenden Reinigung per HPLC in der Methodenentwicklung Rücksicht auf die niedermolekularen Verunreinigungen genommen werden.

#### 2.3.2.2 Der off-bead-Ansatz

Ein bemerkenswertes ON-Konjugat wurde in der Arbeitsgruppe von Carell entwickelt und bildet den Anitpoden im Vergleich zu dem in Givosiran, Lumasiran und Inclisiran verwendeten antennären GalNAc-Multivalenz-Liganden (**Abb. 2.7**).<sup>[193]</sup> Ausgehend von Anandamid, einem endogenen Liganden des Vanilloids TRPV1-Rezeptors, wurden Dendrimere mit definierter Struktur und steigender Anzahl angeknüpfter siRNAs konstruiert. Ausgangspunkt dieser kupfer-katalysierten Variante der Klick-Chemie ist ein CPG-gebundenes Derivat von Uridin, welches in Position C-5 des Pyrimidinrings eine terminale C8-Alkynyl-Einheit trägt (C8-alkin-dT). Das Startnucleosid wurde am 3'-Ende des Passenger-Strangs einer siRNA implementiert, welche komplementär zu einer codierenden mRNA des Nucleoproteins (N-Protein) des Tollwutvirus ist.<sup>[193]</sup> Anandamid wurde hierbei zunächst an ein Triazid-Derivat von Pentaerythritol geknüpft, welches die grundlegende Konjugationsplattform (**Modul A**) darstellt. Die Anzahl an angeknüpften, Alkin-modifizierten siRNAs wird letztlich durch die Wahl der modularen Branching-Einheiten **BE1** und **BE2** festgelegt und ermöglicht die Anknüpfung von drei (**Modul A**), sechs (**Modul B**) oder bis zu neun (**Modul C**) siRNAs durch sukzessiv

---

durchgeführte Klick-Reaktionen. Erst nach Wahl des entsprechenden Moduls wird der Spacer samt Liganden (**Modul A**) mit dem C8-alkin-dT-dekorierten und vollständig entschützten passenger-Strang der siRNA kovalent in einer Kupfer-katalysierten Klick-Reaktion verknüpft. Anschließend erfolgen mit diesem Konjugat die Hybridisierung der Guide-Stränge und die chromatographische Aufreinigung. Mit steigender Zahl der angeknüpften siRNAs konnte in gleichem Maße auch eine steigende Reduktion des Nukleoproteinlevels nachgewiesen werden. Verglichen mit den antennären GalNAc-Konjugaten konnte also durch Verwendung einer einzigen Target-Einheit bei gleichzeitiger Anbindung mehrerer ONs der zielgerichtete Transport einer definierten Dendrimer-Struktur ohne die Verwendung von Transfektionmitteln realisiert werden. Dies verdeutlicht noch einmal konkret die zentrale Rolle der Konjugationsplattform, welche entscheidend das Potential von ON-SM-Konjugaten beeinflussen kann.



**Abb. 2.7:** Off-bead-Ansatz von Carell zu Synthese eines dendritischen siRNA-Anandamid-Konjugats. Die siRNA (grüne Doppelhelix) wird über das 3'-implementierte C8-Alkin-dT durch kupferkatalysierte Klick-Reaktion an den Azid-terminierten Spacer-Apparat geknüpft.

## 2.4 Oblimersen und andere BCI2-ASOs in der Krebstherapie

Schaut man sich die zugelassenen Therapeutika auf Basis der Antisense-Technologie noch einmal genauer an, so fällt auf, dass deren Ziel meist die Korrektur eines genetisch bedingten Fehlfunktion eines bestimmten Proteins ist. Im oben diskutierten Beispiel der Duchenne Muskeldystrophie (DMD) bewirkt ein genetischer Defekt den fälschlichen Einbau von Exon 51 in die für Dystrophin codierende mRNA, sodass die Bildung des Proteins, welches zum Erhalt des Muskelgewebes notwendig ist, gestört wird. Durch Gabe der ONs Eteplirsen<sup>[44]</sup>, Golodirsen<sup>[45]</sup>, Viltolarsen<sup>[46]</sup> oder Casimersen<sup>[47]</sup> wird das Exon ausgelassen und Dystrophin in ausreichender Menge vom Körper exprimiert. Das Gegenteil bewirkt z.B. das ON Fomivirsen, welches die Bildung der IE1 und IE2 Proteine hemmt<sup>[194]</sup> und somit in immunsuprimierten Patienten das Cytomegalievirus zurückdrängt.<sup>[195]</sup> In jedem Fall stellen diese zugelassenen ON-Therapeutika jedoch sog. „Orphan Drugs“ da. Dies sind Medikamente, welche zur Behandlung von Erkrankungen mit geringer Prävalenz eingesetzt werden und aus marktwirtschaftlicher Sicht für die pharmazeutische Industrie aufgrund der hohen Entwicklungskosten von geringer Relevanz sind.<sup>[196]</sup>

Neben Herz-Kreislaufkrankungen zählt Krebs mit der deutschlandweit zweithöchsten Prävalenz zu den Haupttodesursachen sowohl bei Männern als auch bei Frauen und bildet demnach eine ausgesprochen attraktive Möglichkeit zum Einsatz potenter ON-basierter Therapeutika.<sup>[197]</sup> Hanahan und Weinberg definierten in ihrer vielbeachteten Arbeit sechs markante, biologische Eigenheiten von Krebs (Hallmarks), welche im Laufe der Entwicklung eines Karzinoms als Ansatzpunkt zur kurativen Behandlung dienen könnten. Diese von Tumoren erworbenen Fähigkeiten umfassen die Aufrechterhaltung des proliferativen Zustands der Zellen, die Abwehr von Wachstumssuppressoren, die Induktion von Angiogenese, die Metastasierung und damit Verbreitung im Körper sowie die Ermächtigung zur replikativen Unsterblichkeit durch Eingriff in die Homöostase des programmierten Zelltods.<sup>[198]</sup> Gerade im letztgenannten Punkt zeichnet sich malignes Zellwachstum insbesondere dadurch aus, dass essentielle Mechanismen zur Entsorgung entarteter Zellen abgeschaltet werden. Die hierbei primär involvierten Proteinfamilien sind die Tumor-Nekrose-Faktoren (TNFs), die Caspasen sowie die Bcl-2-Familie, welche sowohl aus pro-apoptotisch als auch anti-apoptotisch wirkenden Proteinen, wie z.B. dem Namensgeber Bcl-2, bestehen.<sup>[199–201]</sup> Die Hemmung der Apoptose

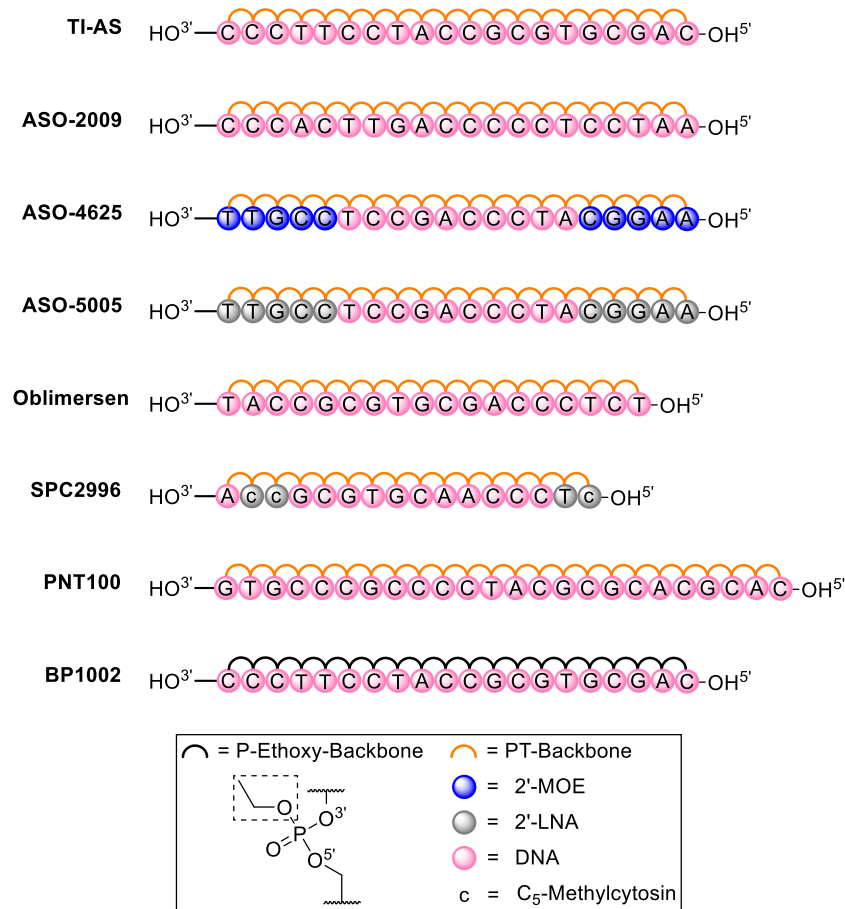


durch das Protein Bcl-2 äußert sich in der Stabilisierung der Mitochondrienmembran und verhindert damit die Ausschüttung von Initiator-Caspasen aus den Mitochondrien, welche letztlich für die Rekrutierung von Effektor-Caspasen zum Abbau der Zelle verantwortlich sind. In Krebszellen führt die Translokation des Bcl-2-Gens von Chromosom 18 zur „Immunoglobulin heavy-chain“ (IgH) auf Chromosom 14 zudem zu einer gesteigerten Expression des Bcl-2 Proteins durch den IgH-Enhancer.<sup>[202,203]</sup> Dies resultiert in niedrigen Ansprechraten von Chemotherapeutika und kürzeren Zeitenräumen ohne Tumorprogression.<sup>[204]</sup> Da Bcl-2 als intrazelluläres Protein ohne enzymatische Aktivität nur schwer mit Kleinmolekülen wie Venetoclax<sup>[205]</sup> interagiert, werden v.a. ONs in der adjuvanten Therapie eingesetzt um den Gehalt von Bcl-2 in der Zelle herunterzuregeln und in Folge eine Sensitivierung gegenüber Chemotherapeutika oder Antikörpertherapie zu erzielen.<sup>[206,207]</sup>

Einen ersten Ansatz hierzu lieferte 1990 Reed bei Untersuchungen von humanen Prekursor B-Zellen der akuten lymphatische Leukämie (697-Zellen). Ein 20-mer PT ASO (TI-AS) komplementär zu den ersten 20 Basen der Translations-Initiations Sequenz der humanen Bcl-2 mRNA zeigte vier Tage nach Inkubation eine maximale Reduktion der Zellproliferation von 50% bei einer Konzentration von 25  $\mu$ M. Ein analoges PO ASO zeigte hingegen nur ein Zehntel dieser Inhibition der Zellproliferation bei gleicher Konzentration. Dieser Maximalwert wurde zudem erst nach sechs Tagen Inkubationszeit erreicht, da auch die maximale intrazelluläre Konzentration erst nach fünf im Vergleich zu den zwei Tagen des PT ASOs erreicht wurde.<sup>[208]</sup> Zangenmeister-Wittke baute 1997 auf diesem Prinzip auf und testete insgesamt 11 Bcl-2-ASOs gleicher Länge (20-mer), welche komplementär zu verschiedenen für das Bcl-2-Protein kodierenden Stellen innerhalb der humanen Bcl-2 mRNA in SW2-Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms sind.<sup>[209]</sup> Die ausgesuchten ASOs nutzten als Target entweder die Translationsinitiations- oder -terminationsstellen bzw. die 5'- oder 3'-untranslatierten Regionen. Darüber hinaus wurde DOTAP bei allen ASOs als Transfektionsmittel eingesetzt. Hierbei zeigte ASO-2009, welches auf die Codons 141-147 des kodierenden Bereichs der Bcl-2-mRNA abzielt mit Abstand das größte Potential. Nach 24 h wurde eine Reduktion des Bcl-2-Gehalts von 82% und nach 96 h eine Reduktion von 51% bei einer Konzentration von 150 nM erzielt; das ASO wird demnach recht zügig wieder aus der Zelle ausgeschieden. Kombinationen von ASO-2009 mit den Zytostatika Etoposid, Doxorubicin sowie mit

Cisplatin zeigten in darauffolgenden Experimenten eine starke Sensitivierung der Zellen gegenüber der Chemotherapie.<sup>[210]</sup>

Von Zangemeister-Wittke wurde kurze Zeit später im Jahr 2000 das bispezifische ASO-4625 dazu verwendet, in der Brustkrebszelllinie MDA-MB231 gleich zwei anti-apoptisch wirksame Faktoren herunter zu regulieren.<sup>[211]</sup> Das ebenfalls aus der Familie der anti-apoptisch wirksame Proteine stammende Bcl-X<sub>L</sub> weist mit Bcl-2 eine Region hoher Sequenzhomologie im Bereich der Nukleotide 605-624 und 687-706 auf. In Letzterem besitzt ASO-4625 allerdings einen Basenmismatch zur Bcl-X<sub>L</sub> mRNA von drei Nukleotiden. In diesem 20-mer PT ASO wurden zudem am 5'- und 3'-Ende jeweils fünf 2'-MOE-Modifizierungen zur Erzeugung eines Gapmers eingeführt. Diese erste Form des doppelten Targetings an Bcl-2 führte in MDA-MB231-Zellen nach 40 h zu einer Reduktion der Gehalte von Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> von 25% bzw. 20% bei einer Konzentration von 600 nM.<sup>[212]</sup> Um die Duplexbildung von ASO-4625 mit der Bcl-X<sub>L</sub> mRNA trotz Basenmismatch zu verbessern, wurden anstelle der 2'-MOE-Modifikation LNA-Bausteine



**Abb. 2.8:** Schematische Darstellung der Sequenzen und Modifikationen der potentesten bisher entwickelten Bcl-2 ASOs.

verwendet und somit ASO-5005 geschaffen. In MDA-MB231 Zellen konnte nach nur 7 h Inkubationszeit bereits eine Verringerung des mRNA-Levels von Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> von 81% bzw. 78% bei einer Konzentration von 300nM festgestellt werden. Die Reduktion der Proteinlevel bei einer Konzentration von 300 nM ist ebenfalls deutlich ausgeprägt.<sup>[213]</sup> Auch hier wurde eine kombinierte Behandlung der Zellen mit dem ASO und den Zytostatika Doxorubicin und Paclitaxel vorgenommen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das LNA-modifizierte ASO-5005 (75 nM) in MDA-MB-231-Zellen in Kombination mit den Chemotherapeutika eine Steigerung der Caspase-3 Aktivität um den Faktor 3 bewirkt. Im Vergleich hierzu zeigte das 2'-MOE-modifizierte ASO-4625 unter gleichen Bedingungen nur ein Zehntel dieser Steigerung. Die Forschung an Bcl-2-ASOs nahm durch das bereits im Jahr 1995 von Genta Inc. entwickelte ASO Oblimersen (G3139) neue Maßstäbe an. Als erstes Bcl-2 ASO überhaupt wurde Oblimersen in groß angelegten Studien getestet<sup>[214]</sup> und erhielt im Jahr 2001 sowohl in den USA als auch in der EU den Orphan-Drug-Status zur Behandlung der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) und des multiplen Myeloms.<sup>[215]</sup> Das 18-mer PT-ASO bindet an die ersten sechs Codons der Startsequenz der für das Bcl-2 Protein transkribierenden mRNA und wurde im Zeitraum von 2003-2014 in insgesamt 46 klinischen Studien an verschiedenen Krebsarten getestet.<sup>[216-218]</sup> Oblimersen scheiterte in einer Phase-III-Studie, in welcher die Kombinationstherapie von Oblimersen und den Chemotherapeutika Cytabin und Daunorubicin bei über sechzigjährigen AML-Patienten untersucht wurde.<sup>[219]</sup> Als statistische Bewertungskriterien galten neben der kompletten Remission (complete remission, CR) und der progressionsfreien Überlebensrate (progression-free survival, PFS) v.A. die Gesamtüberlebensrate (overall survival, OS). Eine statistisch signifikante Verbesserung der Werte von CR, PFS oder OS konnte bei den Studienteilnehmern allerdings nicht festgestellt werden. Die Gründe hierfür können vielfältig sein, diskutiert wurden in diesem Zusammenhang die Instabilität der Formulierung oder des ASOs selbst, die unzureichende zelluläre Aufnahme und endosomale Freisetzung des ASOs.<sup>[220]</sup> In der Folge wurden verschiedene modifizierte Varianten von Oblimersen synthetisiert, um sich dieser Herausforderungen anzunehmen.<sup>[221]</sup>

Eine solche Variante stellt das von Santaris Pharma 2009 entwickelte ASO SPC2996 dar, welches im Vergleich zu G3139 um jeweils ein Nukleotid am 3'- bzw. 5'-Ende verkürzt ist und in Position 10 aus Sicht des 3'-Ende einen Basenmismatch aufweist.<sup>[222]</sup> An

beiden Enden besitzt das 16-mer jeweils zwei LNA-Modifikationen, von welchen die drei Cytosin-Basen an C5 methyliert sind. In HT1080-Zellen, einen aus Bindegeweben entstehenden fibroblastisches Sarkom, konnte die Bcl-2-Expression bei 100 nM nach neun Tagen um 90% gesenkt werden. Analog zu Oblimersen konnte in klinischen Test allerdings keine signifikante Remission bei CLL-Patienten festgestellt werden.<sup>[223]</sup> Stattdessen wurde im Zusammenhang mit SPC2996 ähnlich zu Oblimersen bei 39% der Patienten eine starke Immunantwort unter Beteiligung des Toll-like Rezeptors 9 beobachtet, welcher durch die in SPC2996 und G3139 enthaltenen CpG-Motive getriggert wird.<sup>[224]</sup> Daher wurde das von Sierra Oncology 2014 entwickelte ASO PNT100 im Vergleich zu SPC2996 in zweierlei Hinsicht optimiert.<sup>[225]</sup> Das 24-mer PO ASO wurde zum einen als amphoter Liposom transfiziert eingesetzt (PNT2258), was die Serumstabilität und damit einhergehend die Toxizität der Formulierung senkt und zum anderen den endosomalen Escape verbessern soll. Ferner ist die gewählte Sequenz nun komplementär zur P1 Promotorregion des Bcl-2 Proteins, wobei die Interferenz mit der Promotorregion die Expression von Bcl-2 durch Blockade der Transkription verhindert.<sup>[226]</sup> In einer Reihe von Tests in verschiedenen Prostata-, Lymphdrüsen, Haut- und Brustkrebszelllinien konnte ein effizientes Silencing der Bcl-2 Expression beobachtet werden.<sup>[226]</sup> In der klinischen Phase I konnte zudem die Verträglichkeit bei stark verringerter, inflammatorisch bedingter Toxizität gezeigt werden, der PFS-Wert (*engl.* progression-free survival) betrug 27%.<sup>[227]</sup> In einer Phase II Studie konnte bei 13 Patienten mit relapsiertem bzw. refraktärem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) zwar eine Ansprechrate von 54% festgestellt werden, allerdings ließ sich dieses Ergebnis bei einer größeren Probandengruppe mit diffusem, großzelligen B-Zell-Lymphom nicht reproduzieren (8%), weshalb die Entwicklung der PNT2258-Formulierung von PNT100 gestoppt wurde.<sup>[228]</sup>

Das von Reed gegen die Translations-Initiations (TI) Sequenz von Bcl-2 entwickelte ASO TI-AS wurde von Konopleva (Bio-Path) mit der *P*-Ethoxy-Modifikation ausgestattet und als Triester in der Formulierung liposomaler ASOs verwendet.<sup>[229]</sup> Dieses als BP1002 bezeichnete PT ASO zeigte in den AML-Zelllinien HL-60 und HL-60-Dox eine Reduktion des Bcl-2 Levels um ca. 50% bei einer Konzentration von 8 µM.<sup>[229]</sup> Klinische Untersuchungen der Phase I zu Behandlungen verschiedener Varianten des NHL (NCT04072458) sind zurzeit noch nicht abgeschlossen und untersuchen v.A. die Kombinationsbehandlung mit dem BH<sub>3</sub>-Mimetikum Venetoclax (ABT-199).<sup>[230]</sup> ABT-199 wurde

in einer Phase II Studie (NCT03584009) an ER $\alpha$ -positiven Brusttumoren getestet um den Effekt der Bcl-2 Reduktion auf die Parameter auf CR, PFS und OS zu eruieren. Dieser Effekt war jedoch nur schwach ausgeprägt.

In 85% aller ER $\alpha$ -positiven Brusttumoren ist das Protoonkogen Bcl-2 zwar überexprimiert<sup>[231]</sup>, bisher beschränkte man sich allerdings im Fall von Antisense-Ansätzen auf das Ziel, die Expression des z.T. an der Zelloberfläche situierten Rezeptors ER $\alpha$  zu verringern.<sup>[232]</sup> Die intrazelluläre Konzentration von proliferativ wirkendem ER $\alpha$  wurde mit der Progression von estrogenabhängigem Brustkrebs in Verbindung gebracht. Daher erscheint der Ansatz, die ER $\alpha$ -Konzentration im Zielgewebe unter ein kritisches Niveau zu senken, sehr vielversprechend. Allerdings zeigte auch schon Oblimersen vielversprechende Aktivität in Brustkrebszelllinien zur Reduktion des Bcl-2 Levels.<sup>[231,233]</sup> Zum besseren Verständnis, wie das Bcl-2 ASO Oblimersen bspw. als potenzieller Konjugationspartner mit ER $\alpha$ -Liganden im Sinne eines Targeting-Ansatzes von Nutzen sein könnte, ist eine genauere Betrachtung der Rolle von ER $\alpha$  im Zusammenhang mit Brustkrebs erforderlich.

## **2.5 Der Estrogenrezeptor $\alpha$ als therapeutisches Target zur Behandlung von Brustkrebs**

Mit etwa 69700 Neuerkrankungen jährlich stellt Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland dar (1 von 8 Frauen), wobei jede sechste Erkrankte jünger als Fünfzig ist. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren. Weiterhin gehört Brustkrebs zu den Krebsarten, welche im familiären Umfeld gehäuft vorkommen – etwa 10% aller Betroffenen erben die verantwortlichen Gene BRCA 1 und BRCA 2 von ihren Eltern und haben infolge dessen ein erhöhtes Risiko im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken.<sup>[234]</sup> Das Mammakarzinom entsteht hierbei in der Brustdrüse und wirkt invasiv auf das umliegende Gewebe. Trotz einer relativen 10-Jahres-Überlebensrate von 83% ist Brustkrebs die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen (18%).<sup>[235,236]</sup> Neben der TNM-Klassifikation ist für eine adäquate Behandlung der Erkrankung v.A. die histologische und molekulare Tumorklassifikation von entscheidender Bedeutung. Letzteres erfolgt anhand von Genexpressionsprofilen der Estrogenrezeptoren hier v.A. des ER $\alpha$ , dem Progesteronrezeptor (PR), sowie des humanen epidermalen Wachstumsfaktors (HER2). Auf dieser Basis werden Brusttumore in drei

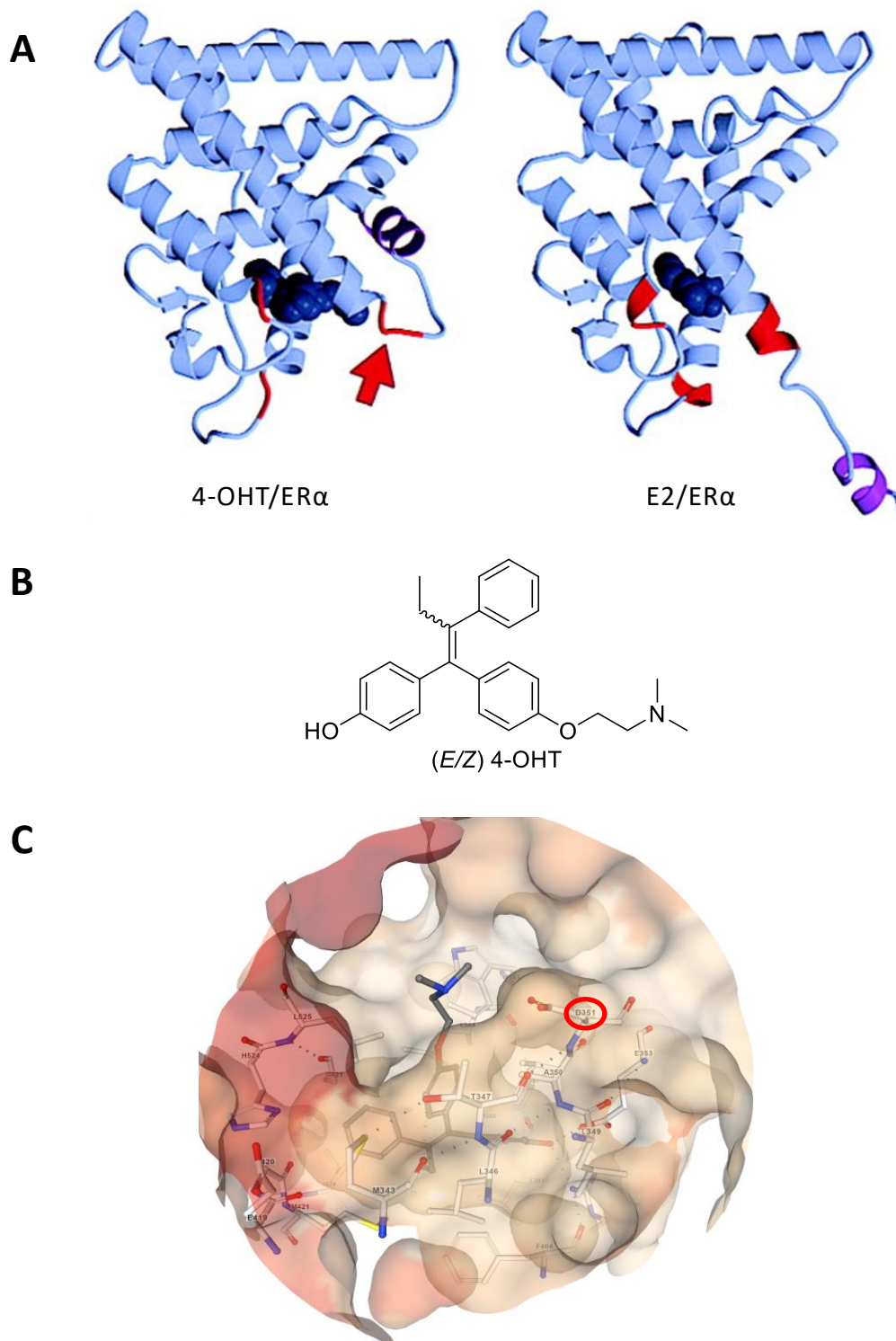
Untergruppen geteilt<sup>[237]</sup>:

1. luminal (ER $\alpha$  und/oder PR-positiv, HER2-positiv)
2. HER2-positiv (ER-/PR-negativ, HER2-positiv)
3. Tripel-negativ (ER $\alpha$ -, PR- und HER2-negativ)

Hierbei sind 60 % der premenopausalen und 75 % der postmenopausalen an Brustkrebs erkrankten Frauen als ER $\alpha$ -positiv einzustufen, eine adjuvante endokrine Therapie unter Einbeziehung des Estrogenrezeptors als Target ist in diesem Fall also prinzipiell möglich.<sup>[238]</sup> Neben dem Einsatz von Aromatase-Hemmern wie Letrozol und Exemestan<sup>[239]</sup> sowie selektiven ER-Degradern (SERD) wie Fulvestrant<sup>[240]</sup> ist Tamoxifen als prominentestes Beispiel der selektiven ER-Modulatoren (SERM) der etablierte Goldstandard in der endokrinen Brustkrebstherapie.<sup>[241,242]</sup> SERMs wirken hierbei abhängig vom Gewebetyp entweder agonistisch bzw. antagonistisch; im Brustgewebe antagonisieren die aktiven Wirkformen von Tamoxifen ER $\alpha$  und reduziert dadurch die Rückfallrate der Patientinnen um bis 50%.<sup>[243]</sup> ER $\alpha$  zählt zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren und wirkt als Transkriptionsfaktor auf Proliferation und Differenzierung von Zellen und darüber hinaus auf das Expressionsmuster einer Vielzahl von Genen. Neben mehreren Isoformen<sup>[244–246]</sup> lassen sich ERs auf Basis ihres Expressionsorts in zwei Klassen einteilen: die nukleären, intrazellulären Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  sowie die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPER) an der Zelloberfläche.<sup>[247]</sup> Letztere unterscheiden sich in Struktur und Funktion zwar von den nukleären Subtypen, allerdings ist die C-terminal lokalisierte, multifunktionale Ligandbindungsdomäne (LBD) evolutionär in allen ERs konserviert<sup>[248,249]</sup> und daher von klinischer Relevanz im Sinne eines Targeting-Ansatzes. Bereits in Kapitel **2.3.2** wurde ein Satz grundlegender Regeln dargelegt, welcher für das Design eines solchen Konjugats beachtet werden sollte. Nach der Identifizierung dieses Paares und der Feststellung, dass auch der überexprimierte GPER über eine für typische ER-Liganden passende LBD besitzt<sup>[250–252]</sup>, muss anschließend die Frage geklärt werden, ob eine hinreichend hohe Affinität von 4-OHT spezifisch für ER $\alpha$  vorliegt und ob eine Bindung des Rezeptors auf der Zelloberfläche des Zielgewebes den Rezeptor auch zur Internalisierung anregt. Hierzu ist eine genauere Betrachtung der konformativen und strukturellen Umgebung von 4-OHT in der LBD (vgl. **Abb. 2.9**) nötig. 4-OHT bewirkt im Vergleich zum natürlichen Agonist E2 eine differenzierte, antagonistische Proteinkonformation<sup>[249,253]</sup> mit einer relativen Bindungsaffinität in der gleichen

Größenordnung von E2.<sup>[254,255]</sup> Der konformative Unterschied liegt hier v.A. in der Positionierung der Helix 12, welche die von den Helices 3, 4 und 5 gebildete Koaktivator-Bindungsstelle blockiert – diese Unterbrechung der Signaltransduktion ist von entscheidender Bedeutung um die proliferative Wirkung von E2 in Brustkrebszellen zunächst zu unterdrücken.<sup>[256]</sup> Ein weiteres Charakteristikum ist in **Abb. 2.9** dargestellt und zeigt den Aminosäurerest von ASP-351, welcher eine für die Bindung essentielle ionische Wechselwirkung zwischen dem Carboxylat von ASP-351 und der primären Amino-Gruppe der 4-OHT-Seitenkette bildet. Um diese Wechselwirkung zur Stabilisierung der aktiven, antiestrogenen Konformation aufrechtzuerhalten, sollte im Rahmen einer Konjugation eine Plattform gewählt werden, welche diese ionische Wechselwirkung Rechnung trägt, damit eine ausreichende Grundbindungsaffinität gewährleistet ist. Marczell zeigte hierbei, dass ein Konjugat aus dem Agonisten E2 und bovinem Serumalbumin (BSA), als Vertreter eines relativ raumgreifenden Biopolymeren, durchaus rezeptorvermittelt internalisiert werden kann. BSA ist hierbei über eine Oxim-Bindung an Position 6 des steroidalen B-Rings von E2 konjugiert.<sup>[257]</sup> Ferner konnte durch Experimente mit dem nicht-kompetitiven Dynamin-II-Inhibitor Dynasore und durch selektives Immunolabeling/Biotinylierung des membranständigen ER $\alpha$  gezeigt werden, dass der GPER-E2-Komplex nach Bindung des Agonisten E2 zunächst internalisiert und auch wieder an die Zelloberfläche transportiert wird.<sup>[257,258]</sup> Darüber hinaus zeigte El-Sayed, dass mit dem ER $\alpha$ -Antagonisten Tamoxifen dekorierte Goldnanopartikel im Vergleich zu Tamoxifen oder den Goldnanopartikeln allein eine dreifach stärkere Inhibition der Zellproliferation hervorrufen. Anhand von Aufnahmen mit einem Dunkelfeldmikroskop konnte hierbei auch eine größere zelluläre Aufnahme der Nanopartikel-Konjugate im Vergleich zu den Konjugationspartnern allein gezeigt werden. Kompetitions-Experimente mit steigenden Konzentrationen von E2 bei gleichbleibender Konjugat-Konzentration zeigten ein konzentrationsabhängiges Verhalten sowohl der Proliferationsinhibition als auch des Aufnahmeverhaltens in MCF7-Zellen (ER $\alpha$ -angereichert) aber nicht in MDA-MB-231-Zellen (ER $\alpha$ -defizitär). El-Sayed folgerte, dass solch ein Verhalten nur durch Beteiligung des plasmamembranständigen ER $\alpha$ -Subtyps möglich ist und die zelluläre Aufnahme auf Basis der gewonnenen Daten rezeptorvermittelt ablaufen müsse.<sup>[259]</sup> Sowohl das Ligand-/Rezeptor-Paar E2/ER $\alpha$  als auch das Ligand-/Rezeptor-

Paar 4-OHT/ER $\alpha$  erscheinen demnach beide unter dem Gesichtspunkt eines Targeting-



**Abb. 2.9:** Die Bindung von E2 und 4-OHT bewirkt unterschiedliche LBD-Konformationen wodurch sich Helix 12 (violett) in unterschiedlicher Weise positioniert (**A**). Die Struktur von (E/Z) 4-OHT (**B**). Das Ball & Stick-Modell der humanen ER $\alpha$ -LBD im Komplex mit 4-OHT zeigt wichtige AS-Reste wie Asp-351 mit Buchstabencode und Positionsnummern (roter Kreis). Die Atome sind wie folgt dargestellt: N = blau; O = rot; S = gelb. Vorderansicht der Öffnung der Ligandenbindungstasche. Adaptiert von Pike *et al.* mit NGL Viewer aus dem RCS Datensatz von 2JF (**C**).



Ansatzes vielversprechend, die Wahl von ER $\alpha$ -Antagonisten als Konjugationspartner sollte allerdings aus folgendem Grund favorisiert werden. Die Bindung des Agonisten E2 an der Zelloberfläche führt i.d.R. zur Rekrutierung von Coaktivatoren<sup>[260,261]</sup> und zur anschließenden Rezeptordimerisierung an der Zelloberfläche.<sup>[262,263]</sup> Diese Signaltransduktionskaskade wirkt proliferativ<sup>[264,265]</sup> und begünstigt die Zellteilung der kanzerogenen Zellen.<sup>[266]</sup> Insgesamt führt dieser Prozess zu einer Störung des gesunden Zellzyklus und letztlich zur Blockade der Apoptose – ultimativ wird die Zunahme von Mutationen und damit die Tumorbildung steigen.<sup>[267,268]</sup> Antagonisten wie 4-OHT hingegen binden zwar im Vergleich zu E2 um den Faktor 1000 schwächer an den GPER, ohne jedoch proliferativ auf die Zelle zu wirken.<sup>[252]</sup> Allerdings werden die Tamoxifen-Resistenz der Brustkrebszellen als auch das vermehrte Auftreten von Endometriumkarzinomen in neueren Studien zunehmend mit der Interaktion von GPER-Antagonisten in Verbindung gebracht.<sup>[251,269]</sup> Ein weiterer Punkt, welcher für die Verwendung von 4-OHT im Rahmen eines plattform-basierten Konjugationsvorhabens spricht, ist die Tatsache, dass sowohl das *E*- als auch das *Z*-Stereoisomer von 4-OHT oder Mischungen beider Stereoisomere Affinitäten im niedrigen zweistelligen nanomolaren Bereich zu ER $\alpha$  und damit in derselben Größenordnung aufweisen.<sup>[269]</sup> Dies ist aus synthetischer Sicht zweckdienlich, da eine stereoselektive Kontrolle der Doppelbindungsgeometrie somit nicht zwingend erforderlich scheint und die Ligandsynthese wesentlich vereinfacht wird. Darüber hinaus zeigte Katzenellenbogen, dass isomerenreines 4-OHT in zellulären Systemen isomerisiert, somit ist die Rückführbarkeit der gemessenen Wirkung auf eines der Isomere nicht gewährleistet.<sup>[270]</sup> Möglichkeiten zur Synthese von 4-OHT-Derivaten zum Zweck der Konjugation werden im folgenden Kapitel aufgezeigt.

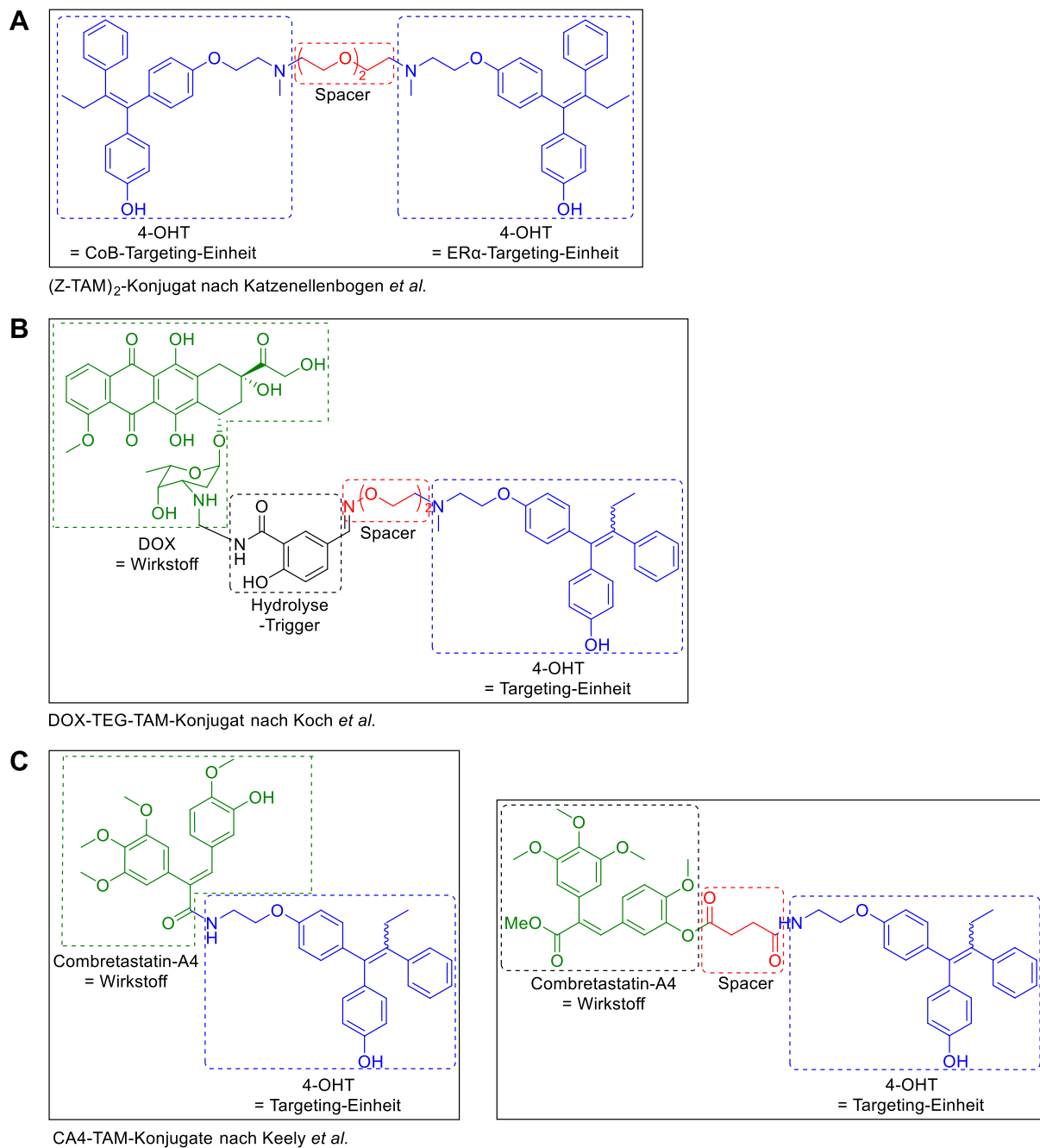
## 2.6 Synthetische Ansätze zu 4-Hydroxytamoxifen-Konjugaten

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel aufgezeigt, mündet die langjährige Therapie mit dem Goldstandard 4-OHT in vielen Fällen in einer Resistenz der Karzinome gegenüber der endokrinen Behandlung. Ein wirksames Konzept, dem entgegenzusteuern, bietet der sog. „Dual-Drug-Ansatz“, welcher durch Verknüpfung zweier strukturell unterschiedlicher Pharmakophore desselben globalen Targets die Selektivität und die Wirksamkeit des neu entstandenen Konjugats durch Etablierung eines doppelten

Wirkmechanismus erhöht. Die Möglichkeiten dieses Ansatzes sind vielfältig. Zur Behandlung von Brustkrebs wurden bereits Dual-Drug-Konjugate von Wirkstoffen mit Antikörpern (Antikörper-Wirkstoff-Konjugate), Radionukliden (Radioimmunkonjugate), Nanopartikeln (Nanopartikel-Wirkstoff-Konjugate) oder mit anderen Wirkstoffen erprobt (Wirkstoff-Wirkstoff-Konjugate).<sup>[271,272]</sup> Im Rahmen der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf Drug-Drug-Konjugaten.

Entscheidend bei diesen Formen der Konjugation ist das Design des Linkers, welcher beide Pharmakophore kovalent miteinander verbindet. Dieser kann derart gestaltet sein, dass die Wirkstoffe vom Linkersystem bei Erreichen des Targets durch externe oder interne Stimuli abgespalten werden. In den meisten Fällen ist hierzu die Verwendung einer fluoreszenten Sonde zur vorherigen Lokalisation des Targets nötig.<sup>[273,274]</sup> Zu Ersteren zählen bspw. photolabile Linker auf Basis von Nitrophenol-Derivaten (photocaging), welche durch topische Bestrahlung bei 365 nm gespalten werden können und den Wirkstoff somit in parenter Form freisetzen.<sup>[275]</sup> Zu Letzterem zählen hingegen Linkersysteme auf Basis von Disulfidbrücken,<sup>[276]</sup> welche intrazellulär und reduktiv durch Glutathion gespalten werden können oder Hydrazon-Anknüpfungen, welche im leicht saurem Milieu der Tumormikroumgebung hydrolysiert werden.<sup>[277]</sup> Im Fall von Dual-Drug-Konjugaten mit Tamoxifen bzw. Endoxifen als Partner werden allerdings meist stabile Linker auf Basis kurzer, aliphatischer Alkylketten oder niedermolekularer Mehrfachether wie Tri- oder Tetraethylenglycol gewählt. Diese Linker gewährleisten die Integrität des gesamten Wirkstoff-Konjugats vom Zeitpunkt der Applikation bis zum Erreichen des Targets und minimieren somit Off-Target-Effekte durch vorzeitige Zersetzung des Systems in Kompartimenten, welche nicht dem Zielort entsprechen.<sup>[271]</sup> Im Rahmen zu Studien der geometrischen und topologischen Merkmale der Bindung bivalenter Drug-Drug-Liganden an das transkriptionell aktive ER $\alpha$ -Dimer synthetisierte Katzenellenbogen im Jahr 2013 insbesondere Diethylstilben- und v.A. Gemische von (*E/Z*)-Endoxifen-Homodimeren mit verschiedenen Spacer-Längen und untersuchte diese Konjugate hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität und ihres antiproliferativen Verhaltens in ER $\alpha$ -positiven MCF7- und in ER $\alpha$ -defizitären MDA-MB-231-Zellen (**Abb. 2.10, A**).<sup>[278]</sup> Die Halogenid-terminierten, homobifunktionalen Polyethylenglycol-Spacer zwischen den Endoxifen-Einheiten sind hierbei jeweils über Substitutionsreaktionen an das sekundäre Amin von Endoxifen angebracht worden, sodass die Aminoethyl-Seitenkette

jeder Endoxifen-Einheit die Salzbrücke zu ASP-351 weiterhin etablieren kann. Hierdurch verschiebt sich die Helix 12 derart, dass die Coaktivator-Bindungsstelle (CoB) für Proteine zwar blockiert wird, für die zweite Endoxifen-Einheit allerdings bei entsprechender Spacer-Länge für eine hydrophobe Wechselwirkung zur Verfügung steht. Die Ausnutzung der CoB für eine zusätzliche Wechselwirkung stabilisiert somit die antiestrogene Konformation von ER $\alpha$  zusätzlich und schaltet somit effektiv die



**Abb. 2.10:** Drug-Drug-Konjugate von Endoxifen mit Endoxifen (**A**),<sup>[279]</sup> mit Doxorubicin (**B**)<sup>[250,280]</sup> und mit Combretastatin-A4 (**C**)<sup>[281,282]</sup> zur Anwendung an hormon-responsivem Brustkrebs.

proliferative Signaltransduktionskaskade ab. Das Drug-Drug-Konjugat mit Triethylenglycol als Spacer-Einheit und (Z)-Endoxifen als doppelte Targeting-Einheit zeigte hierbei die stärkste relative Bindungsaffinität (RBA) zu ER $\alpha$  aus dieser Reihe. Allerdings entspricht diese nur ca. 12% desjenigen Werts von 4-OHT (RBA = 35%). Dennoch ist das bivalente Homodimer bzgl. des antiproliferativen Effekts um 25% (110 nM) aktiver als 4-OHT (150 nM). Katzenellenbogen folgerte durch Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit Arbeiten von Seitz zu konformationell starren Spacern auf Basis von doppelsträngigen DNA-Spacern, dass sich die entropische Strafe durch Verwendung moderat starrer Spacer verringern und die Bindungsaffinität dualer Konjugate zu ER $\alpha$  somit steigern lässt.<sup>[279]</sup> Flexiblere Spacer auf Basis von Polyglycolen böten zwar die Möglichkeit einer optimalen Orientierung der Targeting-Einheit in der LBD, zu viele Freiheitsgrade des Spacers hingegen würden die Positionierung der Helix 12 allerdings nicht vollständig in die antiestrogene Konformation drängen.

Klassische Konjugationspartner heterodimerer Drug-Drug-Konjugate von Endoxifen sind hingegen etablierte Chemotherapeutika. So entwickelte Koch bereits im Jahr 2004 ein Konjugat, welches sich aus den Wirkstoffen Doxorubicin (DOX) und 4-OHT zusammensetzt; die Pharmakophore sind hierbei wieder über Glycol-Spacer verschiedener Länge miteinander verknüpft (DOX-TEG-TAM).<sup>[250,280]</sup> Die Implementierung des Spacers erfolgte durch Alkylierung des sekundärenamins von Endoxifen über das terminale Halogenid des heterobifunktionalen 5-Norbornyl-2,3-dicarboximid-TEG-Spacers (**Abb. 2.10, B**). Durch Erzeugung des Hydroxylamins über Hydrazinolyse wurde DOX-5-formylsalicylamid (DOXSF) unter Ausbildung eines Oxims mit dem verbleibenden Ende des Spacers verbunden. Die Salicylamid-Gruppe stellt hierbei eine hydrolyseempfindliche Schnittstelle zwischen DOX und 4-OHT dar, um das Chemotherapeutikum nach Rezeptor-vermittelter Endozytose intrazellulär freisetzen zu können. Das Konjugat DOX-TEG-TAM wirkte insbesondere in ER $\alpha$ -defizitären, multiresistenten MCF7/Adr-Zellen um den Faktor 120 stärker als DOX und um den Faktor 28 stärker als DOXSF. Anhand von FACS-Messungen und zellmikroskopischen Aufnahmen konnte diese massive Steigerung der Effektivität des Zytostatikums durch Vermittlung der Zellaufnahme über die anti-estrogenen Bindungsstelle (AEBS) gezeigt werden. Trotz Konjugation besitzt DOX-TEG-TAM noch eine RBA von 80% des Werts von 4-OHT zur AEBS. Auch in ER $\alpha$ -positiven, AEBS-defizitären Rtx-6 Zellen konnte die Beteiligung des Rezeptors an der zellulären

Aufnahme durch Rücktitrationsexperimente anhand der Dosis-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Konjugate von Endoxifen mit dem Mitosehemmer Combretastatin-A4 (CA4) wurden von Keely erstmals im Jahr 2016 synthetisiert (**Abb. 2.10, C**).<sup>[281,282]</sup> CA4 wirkt auf die vaskuläre Ausbildung des Endothels durch Inhibierung der Polymerisation von Tubulin, wodurch die Tumormikroumgebung final abgebaut wird. Durch Konjugation mit dem SERM Endoxifen als Shuttle soll diese Wirkung zielgerichtet in die Karzinomzellen transportiert werden. Endoxifen wurde hierbei wie im vorangegangenen Beispiel durch eine McMurry-Kreuzkupplung als Schlüsselschritt hergestellt und anschließend über eine Amidierungsreaktion mit den Kupplungsreagenzien DCC/HOBt mit einem Acrylsäure-Derivat von CA4 ohne weiteren Spacer gekuppelt.<sup>[283]</sup> Das Drug-Drug Konjugat wurde anschließend in ER $\alpha$ -positiven MCF7- und ER $\alpha$ -defizitären MDA-MB-231-Zellen hinsichtlich der proliferativen Hemmung und des zytotoxischen Potentials getestet. Das Konjugat zeigte in MCF7-Zellen im Vergleich zu Endoxifen (29 nM) einen um den Faktor 6 niedrigeren IC<sub>50</sub>-Wert bezüglich der antiproliferativen Hemmung (5 nM) bei einer Zytotoxizität, welche in der gleichen Größenordnung wie diejenigen von Endoxifen und CA4 bei gleicher Konzentration (17%) liegt. Darüber hinaus zeigte das Konjugat eine um den Faktor 46 (600%) größere RBA als Endoxifen (13%) zu ER $\alpha$  und damit eine um den Faktor 6 größere RBA als E2 (100%). Interessanterweise stützen diese Ergebnisse die von Keely getroffene Annahme, dass größere Substituenten an der für die Bindung in der LBD maßgeblich verantwortlichen Aminogruppe von Endoxifen bzw. 4-OHT die Bindung nicht zwangsläufig schwächen, solange die H-Donor-Fähigkeit konserviert wird.<sup>[278]</sup> Die Blockade der CoB AF2 durch Fixierung der Helix 12 verstärkte die antagonistische Konformation des Rezeptors, was letztlich der Abschaltung der Proliferation der Zelle zuträglich wäre.<sup>[281]</sup> In einer Fortsetzung der Studien im Jahr 2017 durch Meegan wurde CA4 nicht durch eine Acrylsäure-Gruppe an der *cis*-Doppelbindung, sondern über einen an der Phenol-Gruppe des B-Ring von CA4 angebrachten Bernsteinsäure-Spacer an Endoxifen durch Amidierung angebunden.<sup>[282]</sup> Hierzu wurde Endoxifen zunächst mit Bernsteinsäureanhydrid versetzt und das Produkt anschließend an der phenolischen Gruppe des CA4-B-Rings verestert. Im Vergleich zur Arbeit von Keely ist dieses Konjugat als Prodrug zu bezeichnen, mit Endoxifen als Maskierungs- und Targeting-Einheit.<sup>[282]</sup> In humanem Plasma konnte die Spaltung des Konjugates zu 23% nach 12 h festgestellt werden, wobei parentales CA4 erst innerhalb der Zellen

wieder freigesetzt wird. Der  $IC_{50}$ -Wert der antiproliferativen Wirkung in MCF7-Zellen ist mit 5.7 nM im Rahmen der Messgenauigkeit mit dem Wert des Keely-Konjugats identisch bei einer vernachlässigbaren Zytotoxizität (4%). Allerdings ist die RBA zu ER $\alpha$  im Vergleich dazu geschwächt, sie beträgt nur noch 11% in Bezug auf die RBA von Estradiol. Gleichzeitig bedeutet dies jedoch, dass trotz der im Vergleich zum Keely-Konjugat verringerten Affinität zu ER $\alpha$  um den Faktor 47 eine gleichbleibende antiproliferative Wirkung erzielt wird, was die Effektivität dieses Prodrug-Ansatzes verdeutlicht.<sup>[283]</sup>

Die gezeigten Beispiele für Konjugate von 4-OHT bzw. Endoxifen stellen nur eine Auswahl aus einer Vielzahl weiterer Konjugations-Partner wie Melatonin<sup>[284]</sup>, Vorinostat<sup>[285]</sup>, Ferrocen-<sup>[286]</sup> oder Acridin-Platin-Komplexen<sup>[287]</sup> dar. Den Meisten liegt jedoch stets die gleiche Rationale im Design zugrunde: die Erhaltung der H-Donor-Fähigkeit der Ethylamin-Seitenkette als ausschlaggebende funktionelle-Einheit zur Etablierung einer hohen Bindungsaffinität zu ER $\alpha$ .<sup>[288]</sup> Dies wird in vielen Fällen durch Substitutionsreaktionen realisiert, in welchen das sekundäre Amin von Endoxifen nucleophil am Spacer unter Austritt einer Abgangsgruppe und Bildung eines tertiärenamins angreift. In Abgrenzung dieses Ansatzes, welcher von Koch und Katzenellenbogen gewählt wurde, nutzte Keely die Nucleophilie des Amins zur Reaktion mit aktivierten Carbonsäure-Derivaten des Spacers unter Ausbildung von konformationell starren Amidinen aus. In beiden Ansätzen verbleibt ein Proton am Stickstoff, was zu einer produktiven Wechselwirkung mit ASP-351 zur Etablierung der anti-estrogenen Konformation ausreicht. Im Vergleich zur Konjugation mit kleinen Effektor-Molekülen wählte El-Sayed ebenfalls einen hetero-bifunktionalen Ethylenglycol-Spacer (vgl. Kapitel 2.5), welcher zwischen den Goldnanopartikeln und 4-OHT durch Substitution angeknüpft wurde. Dieser Rationale soll auch in der vorliegenden Arbeit gefolgt werden.

## 3 Zielsetzung und Planung der Arbeit

### 3.1 Zielsetzung

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit stellte die Etablierung einer Syntheseplattform zur Darstellung von Konjugaten aus Effektor-Molekülen und therapeutischen Oligonucleotiden dar. Diese sollten im Rahmen eines „Targeted-Drug-Delivery“-Ansatzes in *in vitro*-Experimenten zur Bekämpfung von endokrinem Brustkrebs angewendet werden. Die Verbindungen sollten zudem aus synthetisch leicht zugänglichen bzw. kommerziell erhältlichen, modularen Bausteinen zusammengesetzt sein. Die Module dieser Konjugate sind dabei kovalent miteinander verknüpft und bestehen im Wesentlichen aus

1. einer charakterisierten und klinisch evaluierten, einzelsträngigen DNA-Sequenz (PT-ASO wie z.B. Oblimersen).
2. einer Targeting-Einheit zum zielgerichteten intrazellulären als auch extrazellulären Transport, insbesondere zur Ausnutzung der rezeptorvermittelten Endozytose.
3. einer fluoreszenten Sonde zur Untersuchung des zellulären Aufnahmeverhaltens, des zellulären Transports und der Lokalisierung der Konjugate im Cytoplasmatischen System.

Konkreter handelt es sich bei Ersterem um das bereits ausgiebig in klinischen Studien erprobte Antisense-Oligonucleotid Oblimersen/G3139 (vgl. Kapitel 2.4, im Folgenden als BCl2 abgekürzt). Die Sequenz (5'-TCT CCC AGC GTG CGC CAT-3') ist hierbei ein 18-nt langes PT-ASO, welches zu den ersten 6 Codons der BCl2-mRNA komplementär ist und als erstes BCl2-ASO überhaupt in klinischen Phasen zur Bekämpfung verschiedener Krebsarten wie u.A. der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und des myelogenes Plasmocytoms untersucht wurde.<sup>[216]</sup> Das einzelsträngige PS-ASO sollte im Rahmen dieser Arbeit hierbei über das festphasengestützte, automatisierte P(III)-Amidit-Verfahren dargestellt werden. Der Problematik der zellulären Aufnahme sollte durch kovalente Anknüpfung von sowohl endogenen als auch xenogenen Liganden des ER $\alpha$  in 5'-Position des ASO begegnet werden, um die zelluläre Aufnahme durch rezeptorvermittelte Endozytose maßgeblich zu verbessern. Als Liganden der Klasse der endogenen Agonisten sollten hierbei Derivate von Estradiol dienen, welche in Position 17 in  $\beta$ -Stellung des D-Rings bzw. in Position 3 des A-Rings mit zusätzlichen Spacern in Form von

heterobifunktionalen Triethylenglycolen (TEG) ausgestattet sind. Zusätzlich sollten Derivate des Xenoestrogens 4-Hydroxitamoxifen als Vertreter der Gruppe der selektiven Estrogenrezeptormodulatoren verwendet werden, welche bereits seit vielen Jahrzehnten als Hormonpräparate zur Behandlung von hormonresponsivem Brustkrebs angewendet werden. In diese Strukturen sollten die TEG-Spacer über isostere Ersetzungen an der Aminoethyl-Seitenkette des Triphenylethylen-Gerüsts installiert werden. Diese Abstandshalter sollten zum einen die essenziellen funktionellen Gruppen zur Ausbildung einer hochaffinen Wechselwirkung mit der Ligandbindungstasche konservieren. Die Bindungsaffinität dieser Substrate an ER $\alpha$  sollte hierbei in einem fluoreszenzbasierten Kompletions-Assay an Cytosolischem ER $\alpha$  evaluiert und anhand von Vergleichswerten definierter Standards eingeordnet werden. Zum anderen sollten die TEG-Spacer der Realisierung eines Ankerpunkts zur Implementierung des Ligand-Spacer-Apparates über kupferfreie Klick-Chemie in das ASO dienen. Diese Anknüpfung sollte über ein kommerziell verfügbares Derivat eines dT-Phosphoramidites erfolgen, welches in 5-Position des Pyrimidin-Rings eine, über einen zusätzlichen aliphatischen Alkyl-Spacer installierte Dibenzocyclooctin-Einheit (DBCO) aufweist. Hierdurch wird die bioorthogonale Klick-Chemie unter kupferfreien Bedingungen ermöglicht. Einen entscheidenden Vorteil der SPACC gegenüber anderen Ligationsplattformen für Biomoleküle, insbesondere im Bereich der 1,3-dipolaren Cycloadditionen, stellt die Abwesenheit zusätzlicher Metallsalze oder Chelatoren dar, welche häufig einen vermeidbaren Ursprung von Toxizitäten darstellen. Zudem verlaufen SPACCs unter äußerst milden Reaktionsbedingungen in zufriedenstellenden Ausbeuten mit überschaubarem instrumentellem und zeitlichem Aufwand. Zur Verfolgung der Zellaufnahme und zur Quantifizierung der aufgenommenen Konjugate in die cytosolischen Kompartimente ist eine fluoreszente Sonde nötig, welche am 5'-Terminus eingeführt wurde. Hierbei fiel die Wahl auf ein kommerziell verfügbares, nicht-nukleosidisches Cyanin-5-Phosphoramidit (Cy5), welches eine Anregungswellenlänge von 646 nm, eine Emissionswellenlänge von 662 nm und eine Quanteneffizienz (QE) von 0.3 besitzt. Diese spektroskopischen Parameter, insbesondere die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge, interferieren hierbei nicht mit gängigen Fluoreszenzmarkern zur Anfärbung anderer Zellkompartimente. Somit eignet sich Cy5 im besonderen Maße auch aufgrund seiner Sensitivität für die angedachte Aufgabe (siehe **Abb. 3.1**).





handelt, welche unter der konventionellen Betrachtung aus medizinalchemischer Sicht nach dem Prinzip der „lead optimization“ behandelt werden können. So sind verschiedene Modifikationen der Konjugate zur Verbesserung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften gleichermaßen wünschenswert wie notwendig, um die Effizienz dieser Oligonucleotid-basierten Therapeutika zu verbessern und damit den Erfolg der Behandlung am Menschen zu maximieren (vgl. Kapitel **2.3.1**). Diese Modifikationen lassen sich hierbei den bereits weiter oben diskutierten distinktiven Struktureinheiten zuordnen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten solche Modifikationen im Bereich des ON-Backbones vorgenommen werden. So verfügt die Oblimersen-Sequenz über ein chirales Phosphorthioat-Backbone, welches als Standard in Bezug auf Stabilität gegenüber Endo- und Exonukleasen gilt und über einen angepassten Oxidationsschritt in der SPOS realisiert wird.

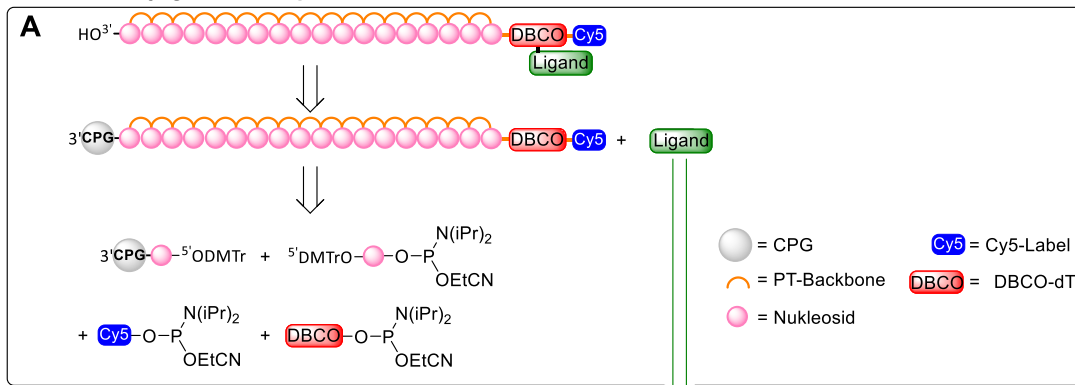
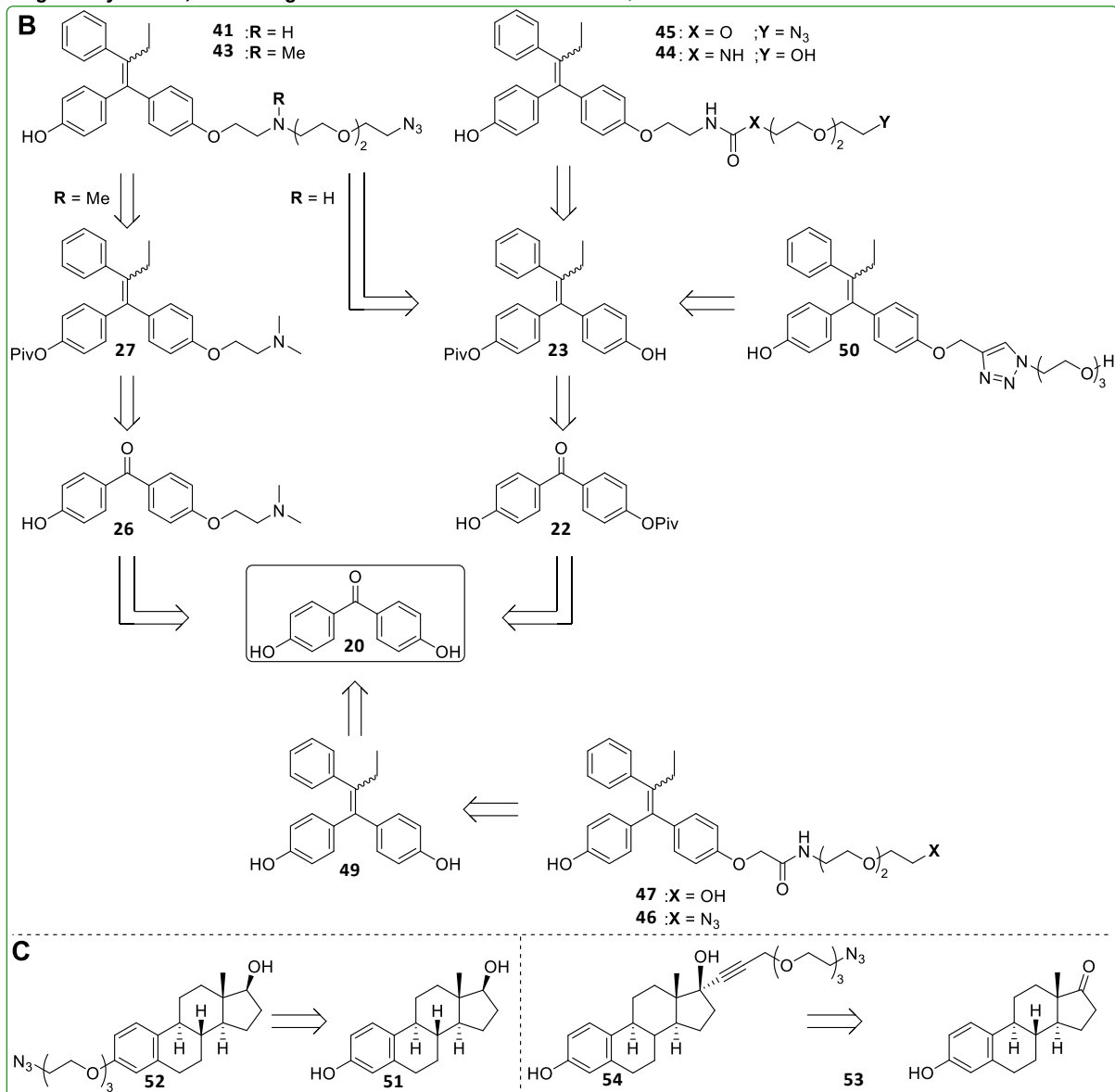
Darüber hinaus sollte in Modellexperimenten der Versuch unternommen werden, in Bezug auf ihre Halbwertszeit justierbare Phosphoramidate auf Basis von 2'-substituierten Imidazolen darzustellen. Diese Strukturen sollten auf ihre hydrolytische Stabilität hinsichtlich verschiedener pH-Werte sowohl in salzgepufferter Lösung als auch in humanem Zelllysate untersucht werden, wozu das Modellsystem auf Dinucleotid-Phosphoramidate erweitert werden sollte (siehe **Abb. 4.31**). Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sollten mit einem Modellsystem verglichen werden, bei welchem bereits literaturbekannte Dinucleotid-Phosphoramidate auf Basis aliphatischer Amine re-synthetisiert und evaluiert wurden.

### **3.2 Retrosynthetische Betrachtung der modularen Bausteine**

Neben dem im Kapitel **3.1** beschriebenen Vorgehen bestehen generell zwei Ansätze zur Implementierung von Effektor-Molekülen, wie auch in Kapitel **2.3** gezeigt wurde: Entweder post-synthetisch via plattformbasierten Konjugationen on-bead oder off-bead, oder in die SPOS eingebunden über entsprechende Phosphoramidite. Ersteres sollte in der vorliegenden Arbeit durch die Synthese Azid-terminierter Liganden realisiert werden, wozu ein Satz Azid-terminierter Triethylglycol-Spacer benötigt wird (**Abb. 3.2** **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden., A**). Diese sollten unter Ausbildung verschiedener funktioneller Gruppen in das 4-OHT-Kerngerüst eingeführt werden und anschließend über kupferfreie Klick-Reaktion kovalent mit den ONs verbunden

werden. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die Bindung zwischen TEG-Spacer und 4-OHT gelegt. Diese sollte derart gestaltet werden, dass eine hochaffine Wechselwirkung mit ER $\alpha$  gewährleistet ist, um die rezeptorvermittelte Internalisierung potenziell zu ermöglichen (**Abb. 3.2, B**). Die Liganden **43** und **41** kommen diesem Vorhaben sehr nahe, da das Motiv der Dimethylamino-Gruppe aus 4-OHT aufgegriffen wird. Der Spacer **4** wird durch Nucleophile Substitution mit Norendoxifen **28** als sekundäres bzw. durch Endoxifen **32** als tertiäres Amin angeknüpft (siehe **Abb. 4.8**). Im Verlauf der synthetischen Arbeiten zeigte sich allerdings, dass **28** und **32** nur schwer aus der Vorstufe **23** zugänglich sind (siehe **Abb. 4.7**). Zur Synthese des Liganden **43** aus Endoxifen musste daher der Umweg über Verbindung **27** nach FAUQ in Kauf genommen werden, welche wiederum durch McMurry-Kreuzkupplung mit Propiophenon aus dem DHB-Derivat **26** zugänglich ist (siehe **Abb. 4.7**).<sup>[290]</sup> Die McMurry-Kreuzkupplungen wurden in Anlehnung an die Arbeiten von GAUTHIER durchgeführt.<sup>[291]</sup> Eine direkte Umwandlung von **23** in **27** bot aufgrund zahlreicher synthetischer Probleme keine Alternative, worauf in Kapitel **4.2** näher eingegangen wird (siehe **Abb. 4.5**). Sowohl der im Vergleich zu **43** demethylierte Ligand **41** als auch Ligand **50** sind aus Verbindung **23** zugänglich (letzterer mit Spacer **2**), welche nach CUSHMAN aus dem DHB-Derivat **22** durch McMurry-Kreuzkupplung mit Propiophenon erhalten werden kann (siehe **Abb. 4.11**).<sup>[292]</sup> **22** und **26** wurden durch Desymmetrisierung von DHB **20** über eine Monofunktionalisierung der phenolischen Gruppen erhalten. **20** bot zudem ohne vorherige Desymmetrisierung über eine weitere McMurry-Kreuzkupplung mit Propiophenon Zugang zu Vorstufe **49** (siehe **Abb. 4.5**). Aus dieser Vorstufe wurden durch eine Nucleophile Substitutionsreaktion mit den Spacern **14** und **15** die Liganden **46** und **47** erhalten. Die Liganden **41**, **43**, **45**, **46** sollten anschließend mit den festphasengebundenen ONs über eine kupferfreie Klickreaktion verbunden werden (siehe **Abb. 4.20**). Zunächst wurde die benötigte Sequenz (**BCI2**, **G4126** oder **MM**) über ein Standard-P(III)-Amiditverfahren am DNA-Synthesizer mit PT-Backbone hergestellt und anschließend mit einem speziellen DBCO-dT-Amidit (vgl. **Abb. 3.1**) am 5'-Ende modifiziert. Die Sequenz ist nach diesem Schritt 19 Nukleotide (nt) lang und wurde abschließend am 5'-Ende mit einem Cy5-Amidit terminiert. Die Klick-Reaktion zwischen dem jeweiligen Liganden und dem festphasengebundenen ON erfolgte on-bead durch einfache Inkubation der Reaktionspartner. Erst dann wurde das so erhaltene ON-Konjugat dem standardmäßigen Entschützungs- und

Abspaltungsprotokoll unterworfen. Hierbei wurden die Schutzgruppen der exozyklischen Aminogruppen der Nucleobasen und die Cyanoethyl-Schutzgruppen des Backbones abgespalten. Gleichzeitig wurde die Succinat-Verbindung zwischen dem 3'-Alkohol des Startnucleosids und der Festphase durch ammoniak-alkalische Behandlung verseift und das ON-Konjugat in Lösung gebracht. Die Liganden **44**, **47** und **50** sind mit einem primären Alkohol terminiert und eignen sich darüber hinaus zur weiteren Phosphitylierung und damit zur Implementierung als Monomer-Baustein im SPOS-Zyklus gemäß dem Eingangs aufgezeigten, zweiten Ansatz. Hierdurch kann auf den umfassenden Spacer-Apparat verzichtet werden und lipophile Beiträge oder auch Probleme bei der Hybridisierung des ASO-Konjugats mit der Target-mRNA aufgrund des sterischen Anspruchs des Spacer-Apparates im Vorfeld auf ein Minimum reduziert werden. Als Konjugationspartner für die ONs sollten neben den SERM-abgeleiteten Liganden auch Agonist-abgeleitete Liganden verwendet werden (**Abb. 3.2**). Die Synthese des in Position 3 substituierten Estradiol-Liganden **52** erfolgte direkt aus  $17\beta$ -Estradiol **51** in einer Nucleophilen Substitutionsreaktion mit Spacer **4** nach einer Arbeit von Bang ohne vorangehende Schützung des sekundären Alkohols in Position 17.<sup>[293]</sup> Der Schlüsselschritt zur Synthese von Ligand **53** war der nukleophile Angriff des als C-Nucleophil eingesetzten TEG-Spacers **19** an der Keto-Gruppe des Estron-Derivats unter Ausbildung des  $\alpha$ -ständigen Alkohols. Die Reaktion wurde nach Vorschriften von Adamczyk und Alexis ausgeführt.<sup>[294,295]</sup>

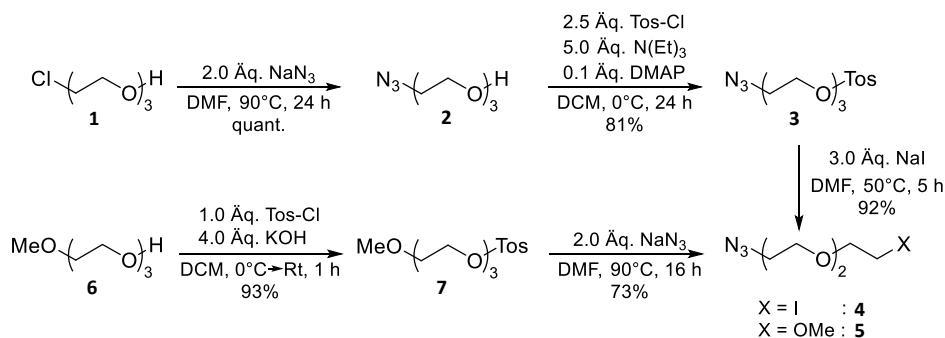
**SPOS & Konjugation; Festphasen-Chemie****Ligand-Synthese; in Lösung**

**Abb. 3.2:** Retrosynthetische Betrachtung des Konjugat-Aufbaus über Festphasensynthese ausgehend von monomeren Bausteinen (A) und der Ligandsynthese in Lösung ausgehend von 4,4'-Dihydroxybenzophenon **20** (B) bzw. 17 $\beta$ -Estradiol **51** und Estron **54** (C).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Synthese heterobifunktionaler Triethylenglycol-Spacer

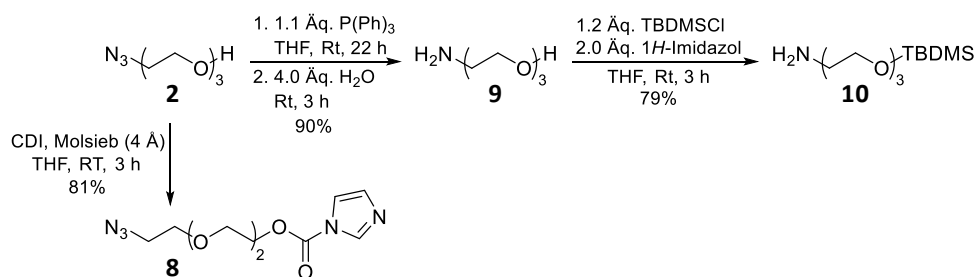
Zur Darstellung verschiedener isosterer Anknüpfungsmuster des primären Amins in 4-OHT zwischen 4-OHT Derivaten und dem Spacer-Apparat ist die Synthese einer Reihe von Triethylenglycolen notwendig. Diese müssen an ihren beiden Enden orthogonale, funktionelle Gruppen aufweisen (Heterobifunktionalität), wobei prinzipiell zwischen Alkohol-terminierten und Azid-terminierten TEG-Spacern aus den in Kapitel 3.1 genannten Gründen unterschieden wird. Die meisten der hier gezeigten Synthesen basieren auf literaturbekannten Vorschriften, welche an gegebener Stelle mit dem Ziel einer gesteigerten Ausbeute, einer verbesserten Reaktionsführung oder der Schonung von Ressourcen optimiert wurden. Den Synthesen der meisten in dieser Arbeit gezeigten TEG-Spacer liegt Triethylenglycolmonochlorid **1** als gemeinsames Syntheton zu Grunde. Verbindung **1** ist kommerziell verfügbar und zudem bereits heterobifunktional. Daher kann auf eine Desymmetrisierung, etwa von Triethylenglycol (homobifunktional) mit den damit verbundenen geringen Ausbeuten im ersten Schritt verzichtet werden. Verbindung **4** wurde daher in Anlehnung zu einer Vorschrift von Deng und Mitarbeitern ausgehend von **1** hergestellt (siehe **Abb. 4.1**).<sup>[296]</sup> Zunächst erfolgte die Einführung der Azid-Gruppe mit Natriumazid in DMF über eine S<sub>N</sub>2-Reaktion zu Verbindung **2**. Bei der Reaktion handelt es sich um eine Reaktion in Suspension, Natriumazid geht mit Fortschreiten der Reaktion in Lösung und Natriumchlorid fällt fortwährend aus, was eine Triebkraft der Reaktion darstellt. Das Produkt wurde in quantitativer Ausbeute erhalten und bedarf keiner zusätzlichen Aufreinigung, weshalb es in einer Tosylierungsreaktion zu Verbindung **3** weiter umgesetzt werden kann.



**Abb. 4.1:** Synthese von TEG-Spacer **4** aus Triethylglykolmonochlorid **1** nach Deng und Dummy-Ligand **5** aus Triethylglykolmonomethylether **6**.

Der Alkohol in **2** wird hierbei durch Reaktion mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in eine gute Abgangsgruppe überführt. Triethylamin wird überstöchiometrisch eingesetzt, um die entstehende Salzsäure als Ammoniumsalz zu binden, welches während der Reaktion ausfällt, da sich TEGs als Mehrfachether unter sauren Bedingungen zersetzen. Der Steglich-Katalysator DMAP verbessert hier zusätzlich die Umsetzung und Verbindung **3** wurde in einer Ausbeute von 81% erhalten, wobei die Reaktion bis zum vollständigen Umsatz von **2** rühren gelassen wurde. In einer weiteren S<sub>N</sub>2-Reaktion in DMF wurde die Tosylgruppe in **3** durch Reaktion mit einem Überschuss Natriumiodid durch Iodid ausgetauscht. Aufgrund der Säurestärke der korrespondierenden Säure HI eignet sich **4** besonders in einer Substitutionsreaktion mit dem primären Amin von Norendoxifen **28** oder dem sekundären Amin von Endoxifen **32** zum Aufbau der Liganden **41** bzw. **43**. Die entstandene *p*-Toluolsulfonsäure lässt sich nach Bildung von **4** nicht vollständig durch Extraktion entfernen, weshalb **4** säulenchromatographisch gereinigt wurde. Es empfiehlt sich an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass Flash-Chromatographie von TEG-Derivaten am besten mit etwas höher gepackten Säulen mit größerer Trennstrecke gelingt, da die Amphiphilie der TEGs zu einem „Schmierer“ auf dem Säulenmaterial und damit zu vermehrtem Auftreten von Mischfraktionen führen kann. Verbindung **4** wurde somit in einer Gesamtausbeute von 75% über drei Stufen erhalten und zur *N*-Alkylierung von Norendoxifen **28** bzw. Endoxifen **32** zur Erzeugung der Liganden **41** und **43** verwendet. Mit Blick auf die biologische Testung wurde der „Dummy-Ligand“ **5** ausgehend von Triethylenglycolmonomethylether **6** mit Kaliumhydroxid als Base in Dichlormethan in das Tosylat **7** überführt und analog zur Umsetzung von **3** zu **4** zum Azid **5** überführt (vgl. 4.5.2).

Zum Aufbau der Liganden **45** und **44**, bei welchen die Spacer über eine Carbamat- bzw. Harnstoffgruppe angeknüpft sind, sind weitere angepasste Spacer notwendig. In

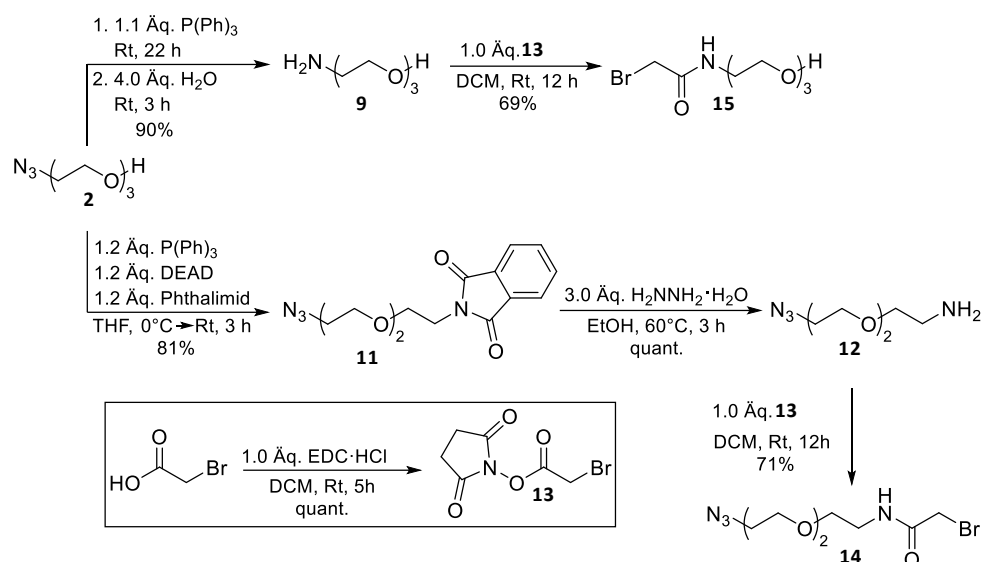


**Abb. 4.2:** Synthese der TEG-Spacer **8** und **10** aus Triethylenglykolmonoazid **2**.

beiden Konjugaten ist jeweils der Stickstoff von Norendoxifen **28** ein Teil der verbrückenden Carbonylgruppe, weshalb zur Synthese von **45** ein primärer Alkohol und zur Erzeugung von **44** ein primäres Amin benötigt wird. Passenderweise können beide Strukturen mithilfe des Staab-Reagenz 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) aufgebaut werden. CDI dient hierbei als mildes Carbonyl-Äquivalent bei der Umsetzung von Alkoholen und Aminen zu den entsprechenden Harnstoff-, Carbamat- (oder auch Kohlensäureester-) Derivaten und liefert verlässlich hohe Ausbeuten unter vergleichsweise milden Bedingungen und einfacher Aufarbeitung.<sup>[297]</sup> So wurde Spacer **8** durch direkte Umsetzung von **2** mit CDI in THF in einer Gesamtausbeute von 81% über zwei Stufen erhalten (siehe **Abb. 4.2**). **8** wurde hierbei ohne chromatographische Aufreinigung in zufriedenstellender Reinheit isoliert und kann mit Norendoxifen **28** zum Aufbau von Ligand **45** verwendet werden. Verbindung **2** wurde weiterhin in einer Staudinger-Reduktion mit Triphenylphosphin (TPP) in THF umgesetzt. Das intermediär gebildete Phosphazen wird durch wässrige Aufarbeitung in das Amin **9** überführt, welches chromatographisch gereinigt werden musste. Dies gestaltet sich hier aufgrund des Polaritätsunterschieds von TPP und **9** zwar als einfach, ist aber aus demselben Grund genauso langwierig. Der Alkohol in **9** wurde anschließend mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl) und Imidazol in THF als Silylether geschützt und lieferte **10** in einer Gesamtausbeute von 71% über drei Stufen.<sup>[298]</sup> Neuere Arbeiten zur Untersuchung des Mechanismus der Silyletherbildung zeigen hierbei auf, dass vielmehr das Lösungsmittel entscheidend für kurze Reaktionszeiten und hohe Ausbeuten ist als die Präsenz von Imidazol als vermeintlichem Aktivator von TBDMS-Chlorid.<sup>[298]</sup>

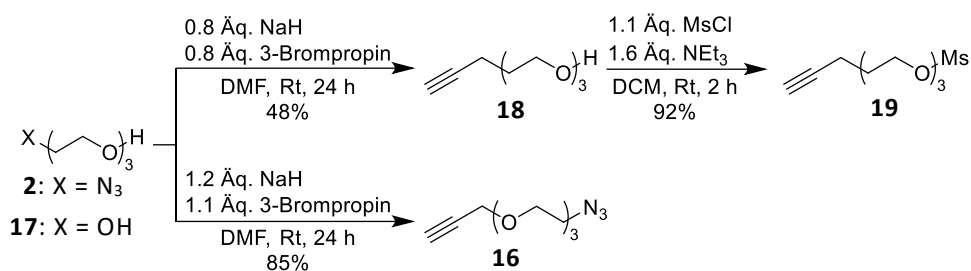
Weitere TEG-Spacer zum Aufbau der amidisch verknüpften Liganden **46** **47** und können ebenfalls wie **8** und **10** ausgehend von **2** und **9** aufgebaut werden. Hierzu wird **2** zunächst in einer Mitsunobu-Reaktion nach einer Vorschrift von Hammerschmidt und Mitarbeitern zu dem *N*-alkylierten Phthalimid **11** mit Diethylazadicarboxylat (DEAD) und TPP in THF umgesetzt.<sup>[299]</sup> TPP und DEAD werden hierbei vorgelegt und Phthalimid portionsweise zur Bildung des intermediären Betains zugegeben. Diese Variante der Mitsunobu-Reaktion gelingt vor Allem mit sauren Nucleophilen wie Phthalimid ( $pK_s = 8.3$ )<sup>[300]</sup> und ist Varianten, welche auf der Verwendung von hoch toxischer und explosiver Stickstoffwasserstoffsäure mit anschließender Staudinger-Reaktion vorzuziehen. Verbindung **11** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer





**Abb. 4.3:** Synthese der TEG-Spacer **14** und **15** aus Triethylglykolmonoazid **2**.

Ausbeute von 81% erhalten; die weitere Umsetzung zu Amin **12** kann allerdings auch mit dem Rohprodukt aus der vorangegangenen Reaktion durchgeführt werden. Die Phthalimid-Gruppe wurde mit Hydrazin Monohydrat in Ethanol bei erhöhter Reaktionstemperatur zum Amin **12** quantitativ umgesetzt, das Vorgehen ist hier Analog zum letzten Schritt der Gabriel-Synthese. Im Vergleich zu dieser muss der Alkohol in **2** allerdings nicht zuerst in ein Halogenid, bspw. über eine Appel-Reaktion überführt werden, um die Phthalimid-Gruppe zu erhalten. In diesem Falle wäre die Delépine-Reaktion der Gabriel-Synthese vorzuziehen, da sie durch Nutzung von Hexamethylentetramin als Stickstoffquelle stabile Urotropin-Salze erzeugt, welche in einer Eintopfsynthese unter saurer Spaltung das gewünschte Amin als Hydrochlorid liefern.<sup>[301]</sup> Verbindung **12** wurde anschließend mit dem Aktivester **13** zur Zielverbindung TEG-Spacer **14** über eine Nucleophile Substitution umgesetzt und mit einer Gesamtausbeute von 58% nach vier Stufen erhalten. Der Aktivester **13** ist aus Bromessigsäure durch Reaktion mit *N*-Hydroxysuccinimid und dem Hydrochlorid von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC·HCl) in äquimolaren Verhältnissen in quantitativer Ausbeute zugänglich. Wässriges Ausschütteln war hierbei ausreichend um den Aktivester **13** in ausreichender Reinheit zur Anwendung zu bringen. Die Reaktion von **13** mit dem Aminoalkohol **9** lieferte darüber hinaus TEG-Spacer **15** mit einer Ausbeute von 62% über drei Stufen, womit die beiden Synthons zum Aufbau des Carbamat-Liganden **45** bzw des Harnstoff-Ligand **44** vorliegen. Letzteres kann wie in **3.2** erläutert in einer Phospitylierungs-Reaktion zu einem Phosphoramidit weiter umgesetzt werden.

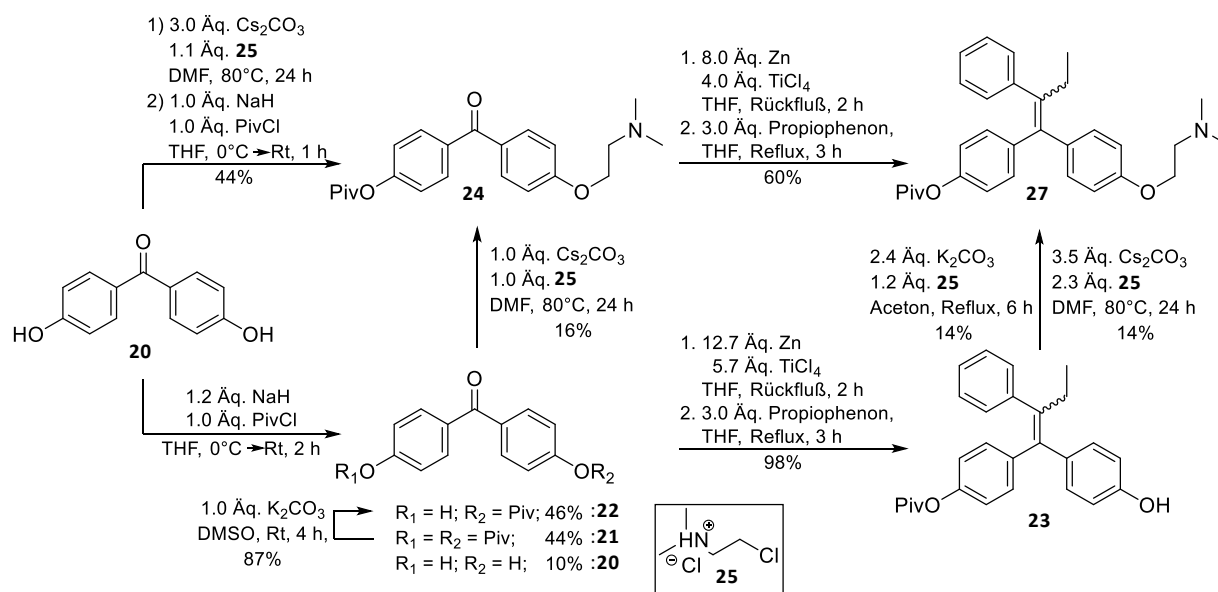


**Abb. 4.4:** Synthese der TEG-Spacer **18** und **19** aus Triethylglykol **17** bzw. **16** aus Triethylglykolmonoazid **2**.

Die Synthese eines letzten Satzes an TEG-Spacern zur Anknüpfung an den Agonisten Estron zur Erzeugung des Agonist-Konjugats **53** ist in **Abb. 4.4** dargestellt. In Verbindung **2** wurde die Propargylgruppe über eine Nucleophile Substitution des Bromids in 3-Brompropin mit Natriumhydrid als Base in DMF eingeführt. TEG-Spacer **16** wurde hierbei in einer Gesamtausbeute von 85% über 2 Stufen erhalten. Die Anknüpfung des Spacers an Estron soll wie in Kapitel **3.2** dargelegt in Analogie zum Aufbau von Ethinylestradiol erfolgen, da  $\beta$ -ständige Ethinylgruppen in Position 17 des D-Rings die Affinität des Estrogens zu ER $\alpha$  nicht signifikant verändern,<sup>[302]</sup> weshalb Derivate dieser Art auch als fluoreszente Sonden in Bindungsstudien eingesetzt werden.<sup>[294,302,303]</sup> Üblicherweise werden solche Strukturen über die entsprechende Lithiumalkinyl-Spezies eingeführt,<sup>[295,304]</sup> wobei eine Azid-Gruppe allerdings erst nach der C-C-Bindungsknüpfung eingeführt wird.<sup>[294]</sup> Daher wurde Triethylglykol **17** unter analoger Bedingung zur Synthese von **16** mit einem Unterschuss an Base und 3-Brompropin desymmetrisiert, wobei **18** mit einer Ausbeute von 48% Prozent erhalten wurde. Bei der Reaktionsführung sollte darauf geachtet werden, dass der Gleichgewichtseinstellung zur Erzeugung der mono-deprotonierten Spezies bei Nutzung von Natriumhydrid als quantitativ deprotonierende Base ausreichend Zeit eingeräumt wird, um hohe Ausbeuten zu erzielen. Der verbleibende Alkohol in **18** wurde anschließend nach einem Standardverfahren mit MsCl und NEt<sub>3</sub> als Mesylat geschützt, sodass **19** in einer Gesamtausbeute von 44% über zwei Stufen erhalten wurde.<sup>[305]</sup> Die Mesylgruppe kann in einer Nucleophilen Substitution analog zur Umsetzung von **1** zu **2** in das benötigte Azid überführt werden. Verbindung **18** bietet darüber hinaus wieder die Möglichkeit, nach erfolgreicher Bindung an Estron über den Alkohol eine Phosphitylierung zur Erzeugung eines E<sub>2</sub>-TEG-Phosphoramidits durchzuführen.

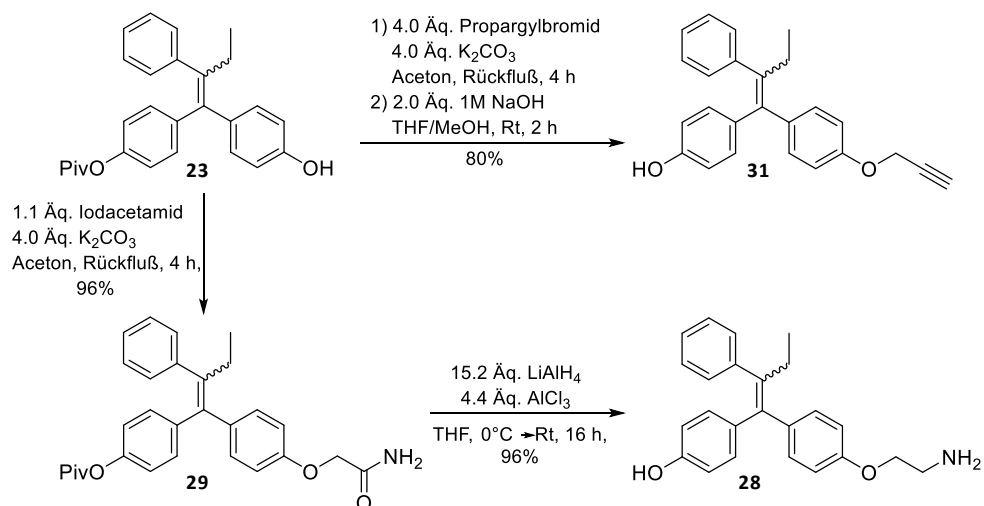
## 4.2 Synthese von 4-Hydroxytamoxifen-Derivaten

Der Aufbau eines Triphenylethylengerüsts als zentralem Synthon der Liganden stellt ein Kernstück der vorliegenden Arbeit dar (siehe Kapitel 3.2). Bereits in Kapitel 2.6 wurde vor allem die von Cole und Gauthier etablierte McMurry-Kreuzkupplung als Mittel der Wahl zur Synthese eines solchen Kohlenstoffgerüsts aufgezeigt.<sup>[291]</sup> Hierzu wurde 4,4'-Dihydroxybenzophenon **20** zunächst durch Schützung einer phenolischen Gruppe mit Pivalinsäurechlorid als *tert*-Butylester in THF und Natriumhydrid als Base desymmetrisiert. Reaktionen an chemisch äquivalenten funktionellen Gruppen in Molekülen mit  $C_{2v}$ -Symmetrie gestalten sich als schwierig in Bezug auf die zu erwartende Ausbeute. Im vorliegenden Fall lässt sich die Bildung des zweifach geschützten Produktes **21** nicht vermeiden, das Gleichgewicht allerdings durch eine längere Equilibrierungszeit bei der Deprotonierung mit Natriumhydrid zu Gunsten des einfach geschützten Zielproduktes verschieben. Verbindung **22** wurde so in einer Ausbeute von 46% erhalten, doch auch das re-isolierte Edukt **20** und das Nebenprodukt **21** lassen sich weiterverwenden. Nach einer Vorschrift von Liu und Mitarbeitern kann **21** im äquimolaren Verhältnis mit **20** in einer intermolekularen kooperativen Umesterung zur regioselektiven Bildung von **22** umgesetzt werden.<sup>[306]</sup> Die Reaktion wurde in DMSO mit Kaliumcarbonat als Base durchgeführt und liefert das Zielprodukt **22** mit einer Ausbeute von 87%. In diesem ersten, kritischen Schritt können also alle unvermeidlichen



**Abb. 4.5:** Synthese der Triphenylethylen-Kerngerüste **23** (über **22**) und **27** (über **24**) ausgehend von 4,4'-Dihydroxybenzophenon **20** über McMurry-Kreuzkupplung.

Nebenprodukte in einem Kreislauf wiederverwendet werden, was die Atomökonomie dieses Schrittes stark verbessert. Ein Scale-up bis in den Multigramm-Maßstab ist an der Stelle möglich, allerdings ist in jedem Fall eine säulenchromatographische Aufreinigung notwendig, welche sich aufgrund der deutlichen Polaritätsunterschiede zwischen **20**, **21** und **22** ( $\Delta R_f = 0.4$ , DCM:EE, 19:1) als simpel gestaltet. Verbindung **22** wurde daraufhin in einer McMurry-Reaktion in Kreuzkupplungs-Variante mit einem zweifachen Überschuss Propiophenon als weitere Carbonylkomponente in THF zu **23** umgesetzt. Die Geometrie der Doppelbindung ist hierbei nicht kontrollierbar, es werden trotz gleicher Ansatzgröße und Stöchiometrie innerhalb einer Reihe von Ansätzen verschiedene Verhältnisse der Stereoisomere gefunden. Eine Kontrolle der Geometrie ist allerdings wie in Kapitel 2.5 diskutiert auch nicht notwendig. Verbindung **23** kann säulenchromatographisch im System PE/EtOAc gereinigt werden, was aufgrund der Polarität des Produktes allerdings sehr zeitaufwändig ist und große Mengen Lösungsmittel verbraucht. Zielführender ist es, das Rohprodukt nach der Aufarbeitung in *n*-Hexan zu fällen. Die Reaktion ist zudem im Multigramm-Maßstab skalierbar und gelingt ab einer Ansatzgröße von 10 mmol **22** am besten. Wie sich im weiteren Verlauf der Diskussion noch zeigen wird, sind unglücklicherweise nicht alle Konjugate in zufriedenstellender Ausbeute aus **23** zugänglich, weshalb zur Darstellung von Endoxifen **32** ein Umweg über Verbindung **24** in Kauf genommen werden musste. In Verbindung **20** wurde hierzu analog zur Vorschrift von Gauthier zunächst die Dimethylaminoethyl-Seitenkette **25** durch Reaktion mit Cäsiumcarbonat in DMF eingeführt (**26**, nicht gezeigt) und die verbleibende phenolische Gruppe analog zu **22** als Pivaloyl-Ester geschützt.<sup>[291]</sup> Verbindung **24** wurde anschließend in einer weiteren McMurry-Reaktion nach Gauthier angepasster Stöchiometrie in das Kreuzkupplungsprodukt **27** überführt. Diese Reaktion ist unglücklicherweise nicht so selektiv wie die Umsetzung von **22** zu **23**, was sich auf die Ausbeute von **27** niederschlägt und eine chromatographische Aufreinigung notwendig macht. Auch lassen sich die Nebenprodukte aus der Reaktion von **20** zu **26** bedauerlicherweise nicht weiter verwerten. Es wurde der Versuch unternommen, den Vorteil der Umesterung zur Minimierung nicht verwendungsfähiger Nebenprodukte (**20** zu **22**) zu nutzen und die Dimethylaminoethyl-Seitenkette **25** erst nach der ersten Pivaloylschutzung in **22** einzuführen, allerdings lagen die Ausbeuten stets im sehr niedrigen zweistelligen Bereich. Nach Aufarbeitung konnte hier vor Allem die Bildung des

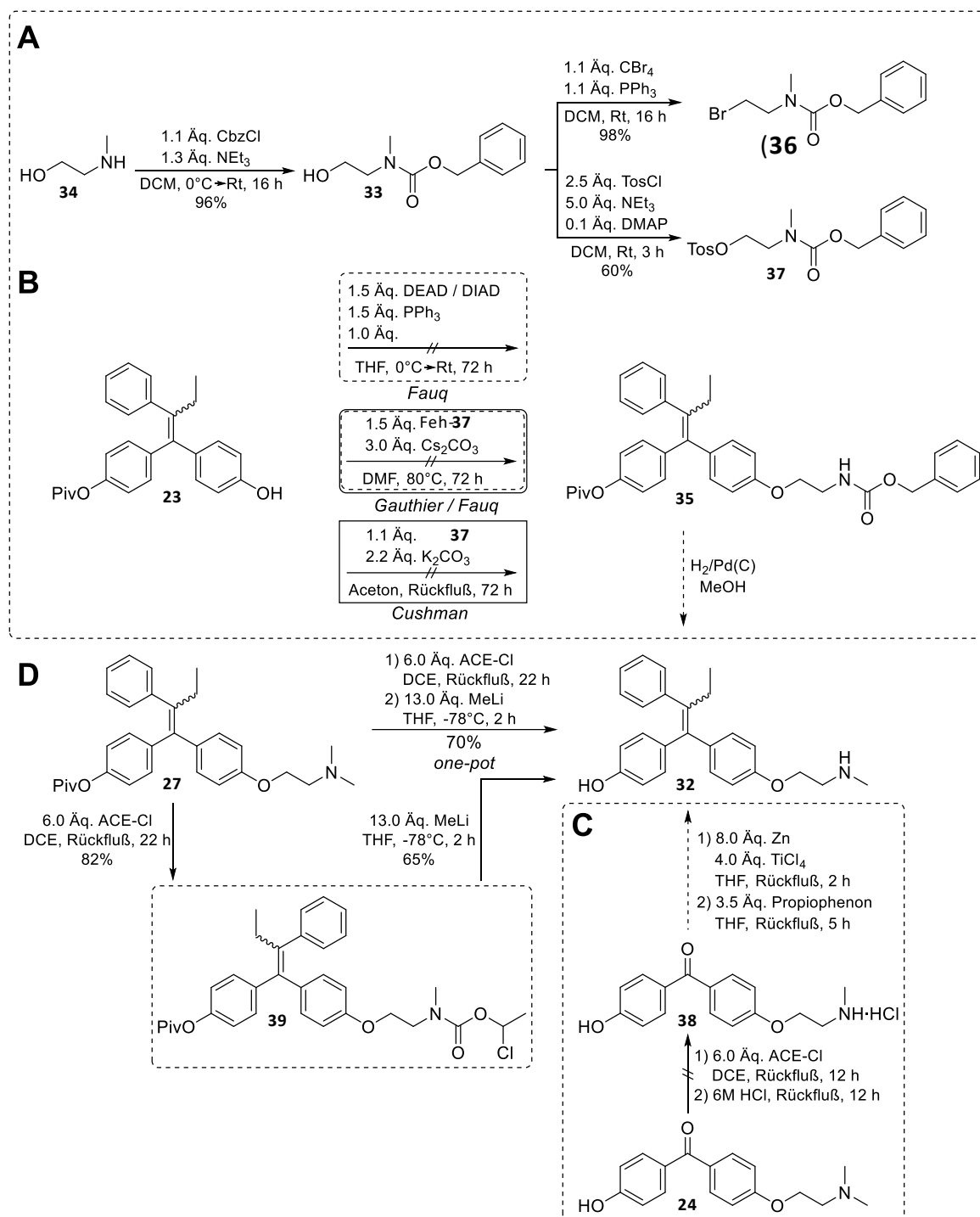


**Abb. 4.6:** Synthese der Synthons **28** (über **29**) und **31** (über **30**, nicht gezeigt) ausgehend von Verbindung **23**.

Eduktes **20** beobachtet werden. Auch der Versuch, die Seitenkette nach Bildung von **23** einzuführen, führte nur zu sehr geringen Ausbeuten des Zielproduktes. Auch hier konnte die Bildung der entschützten Spezies als Hauptprodukt beobachtet werden, weshalb die Synthese von **27** über **24** als beste Alternative angesehen wurde. Die vorliegenden Triphenylethylen-Gerüste ähneln in ihrem Aufbau den Stilbenen und müssen daher wie solche behandelt werden, wenn es um Aspekte der Lagerung gilt.<sup>[307,308]</sup> Bei Untersuchungen zur Stabilität von Tamoxifen wurde gefunden, dass binnen kürzester Zeit verschiedene Phenanthren-Derivate bei UV-Einstrahlung gebildet werden.<sup>[309–311]</sup> Daher wurden alle Verbindungen, welche auf der Kernstruktur **23** basieren, unter striktem Lichtausschluss gelagert. Mit den Verbindungen **23** und **27** konnten nun verschiedene Reaktionen zum Aufbau der Liganden **43** und **41** durchgeführt werden. Die weitere Sequenz zur Einführung der Ethylamin-Seitenkette und Bildung von Norendoxifen **28** wurde in Anlehnung einer Vorschrift von Cushman und Mitarbeitern durchgeführt.<sup>[292]</sup> Die Reaktion von **23** mit Iodacetamid in Aceton mit Kaliumcarbonat als Base verläuft sehr mild und führt nicht zur Spaltung des Pivaloyl-Esters. Verbindung **29** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 96% erhalten werden und wurde unter reduktiven Bedingungen mit der Hydridmischung Lithiumhydrid/Aluminiumtrichlorid in THF zu Norendoxifen **28** weiter umgesetzt. Die auch als Schlesinger-Mischung bekannte Hydridmischung (typischerweise im stöchiometrischen Verhältnis LiAlH<sub>4</sub>/AlCl<sub>3</sub> 3:1) reduziert nicht nur das terminale Amid in **29**, sondern spaltet zudem auch den Pivaloyl-Ester in einem Schritt.<sup>[312,313]</sup> Nach

chromatographischer Aufreinigung wurde Norendoxifen **28** mit einer Gesamtausbeute von 42% über 4 Stufen erhalten und zur Bildung der Liganden **44** und **45** herangezogen. Die phenolische Gruppe von **23** wurde mit Propargylbromid in einer  $S_N2$ -Reaktion unter analogen Bedingungen zur Synthese von **29** verethert und der Pivaloyl-Ester des Produkts **30** (nicht gezeigt) durch alkalische Hydrolyse entfernt. Verbindung **31** wurde in einer Gesamtausbeute von 36% über 4 Stufen erhalten und zum Aufbau von Ligand **50** benutzt.

Die Synthese von Endoxifen **32** zum Aufbau von Ligand **43** gestaltete sich als weitaus herausfordernder (siehe **Abb. 4.7**). Zunächst wurde der Syntheseansatz gemäß einer Arbeit von Fauq und Mitarbeitern verfolgt, die Monomethylaminoethyl-Seitenkette über das *N*-Cbz-geschützte Synthon **33** via Mitsunobu-Reaktion einzuführen (**Abb. 4.7**, gestrichelte Box, Reihe **A** und **B**).<sup>[290]</sup> Hierzu wurde der Stickstoff in *N*-Methylethanolamin **34** nach einem Standardverfahren mit Chlorameisensäurebenzylester in DCM umgesetzt und als Carbamat **33** mit 96% Ausbeute erhalten. Nebenreaktionen aufgrund der Nucleophilie des Stickstoffes sollten somit in der Mitsunobu-Reaktion mit **23** unterbunden werden, zudem verlief eine folgende hydrogenolytische Spaltung der Cbz-Gruppe und des Pivaloyl-Esters unter mildereren Bedingungen im Vergleich zu der von Fauq unternommenen Spaltung mit Methyllithium. Die Mitsunobu-Reaktion zur Bildung von **35** wurde analog zur Vorschrift durch Vorlage von DEAD/TPP und anschließender Zugabe von **23** und **33** durchgeführt. Allerdings konnte nach 72 h Reaktionszeit kein Umsatz festgestellt werden. Auch ein weiterer Ansatz mit DIAD/TPP zeigte keine Umsetzung des Eduktes **23**, welches aus beiden Ansätzen nahezu quantitativ re-isoliert werden konnte (gestrichelte Box, Reihe **B**). Daher wurde ausgehend von **34** zwei weitere Derivate der Monomethylaminoethyl-Seitenkette synthetisiert (**36** und **37**), um das von Cushman bewährte System  $K_2CO_3$ /Aceton zum Aufbau von **29** anzuwenden. Doch auch bei den Reaktionen von **23** mit (**36** bzw. **37** konnte nach 72 h kein Umsatz festgestellt werden, **23** zersetzte sich hierbei hauptsächlich unter Abspaltung des Pivaloyl-Esters (eckige Box, Reihe **B**). Auch das von Gauthier und Fauq verwendete System  $Cs_2CO_3$ /DMF zur Einführung der Dimethylaminoethyl-Seitenkette<sup>[291]</sup> bzw. der Monomethylaminoethyl-Seitenkette<sup>[290]</sup> zeigte lediglich die zuvor beschriebene Zersetzung von **23** (mittlere Box, Reihe **B**). Diese Ergebnisse zusammen betrachtet erscheinen sehr widersprüchlich, da die Reaktion von **23** mit **25** zu **27** aus eigener Erfahrung zwar



**Abb. 4.7:** Synthesen zur Bildung von Endoxifen **32** ausgehend von **27** nach Fauq (**A**, **C**) und via Eintopf-Synthese (**D**).

in nur geringer Ausbeute verlief, laut den angegebenen Vorschriften allerdings in moderaten Ausbeuten und die Reaktion von **23** mit (**36** zu **35** überhaupt möglich sei. Auffällig ist hierbei auch, dass die Entschützung der in Fauqs Arbeit gezeigten, zu **35** analogen Verbindungen weder im Ergebnis teil noch in der Supporting Information zu finden sind. Ein hauptsächliches Problem in Fauqs Arbeit, welche die stereoselektive

Synthese von Z-Endoxifen zum Ziel hatte, bestand in der Stereorandomisierung der Doppelbindungsgeometrie im Verlauf der basischen aber auch im Verlauf der sauren Entschützung der zu **35** analogen Verbindungen. Als Lösung wird eine Carbamat-vermittelte N-Demethylierung nach Vorschrift von Scammells aufgezeigt, welche in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zur Synthese von Endoxifen herangezogen wurde.<sup>[314]</sup> Die relative Konservierung der Doppelbindungsgeometrie ist hier weniger von Interesse als vielmehr die Tatsache, Endoxifen **32** aus **27** überhaupt erst zugänglich zu machen. Der von Fauq gewählte Ansatz der N-Demethylierung der bereits vorhandenen Verbindung **26** vor einer McMurry-Reaktion zeigte sich nämlich nicht zielführend, da **26** in Dichloretan absolut unlöslich ist (gestrichelte Box **C**). Mehrere Ansätze zur Überführung von **26** in **38** verliefen daher erfolglos. Da ohnehin bereits größere Mengen **27** hergestellt worden waren, wurde entgegen von Fauqs Vorgehen **27** zunächst nur mit dem Reagenz Chlorameisensäure-1-chloretylester (ACE-Cl) in DCE versetzt und die Reaktionsmischung nach 24 h ohne Zusatz von Säure zur N-Demethylierung aufgearbeitet. Hierbei wurde **39** mit einer Ausbeute von 82% nach chromatographischer Aufreinigung isoliert und durch sukzessive Spaltung des Carbamts und des Pivaloyl-Esters mit Methyllithium in THF in **32** mit einer Gesamtausbeute von 15% nach 5 Stufen erhalten. Verbindung **39** muss hierbei nicht zwingend isoliert werden, die Umsetzung zum Carbamat und die anschließende Spaltung Desselben samt Schutzgruppe kann prinzipiell *one-pot* durchgeführt werden (Reihe **D**). Da ACE-Cl und DCE Siedepunkte unter 120 °C aufweisen, können beide Substanzen nach der Bildung von **39** über den Schlenk-Rechen im Hochvakuum entfernt, der Rückstand wieder in THF gelöst und die basische Spaltung mit Methyllithium zur Bildung von **32** durchgeführt werden. Die Ausbeute bei Durchführung der Sequenz in *one-pot* weist zwar nur eine marginale Steigerung der Ausbeute auf, allerdings kann so auf eine Aufarbeitung und durch säulenchromatographische Isolierung von **39** verzichtet werden.

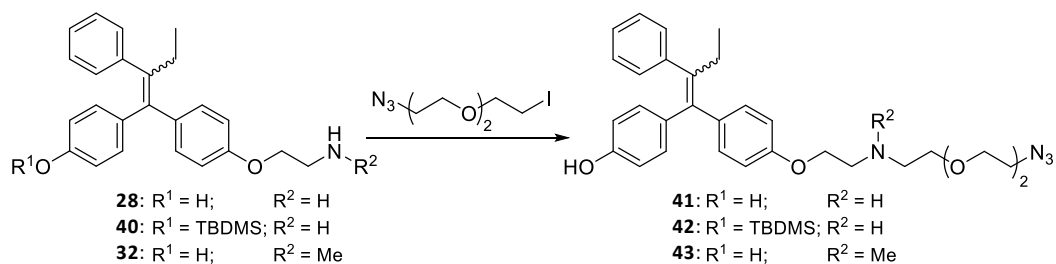
### 4.3 Synthese der Triphenylethylen-TEG- und Estradiol-TEG-Liganden

#### 4.3.1 Triphenylethylen-TEG-Liganden

Der Aufbau der Liganden erfolgte ausgehend von den Schlüsselkomponenten Norendoxifen **28**, Endoxifen **32**, der Vorstufe **23** und des Alkin-Derivats von **23**, Verbindung **31**. Hierbei wurden wie in Kapitel **3.2** dargelegt Strukturen mit unterschiedlichem Motiv an



der Anknüpfungsstelle zwischen Effektor-Molekül und Spacer gewählt. Hierdurch soll der Einfluss des gewählten synthetischen Ansatzes zum Aufbau solcher Liganden auf die Bindungsaffinität untersucht werden, da eine schwächere Bindung zum Target (ER $\alpha$ ) letztlich die Wirkung des gesamten Ligand-Oligonucleotid-Konjugats beeinflussen kann. Um möglichst alle funktionellen Gruppen für eine unveränderte Bindungsaffinität von 4-OHT zu ER $\alpha$  zu konservieren, wurde daher der Ansatz verfolgt, den Spacer zunächst durch Nucleophile Substitution über das primäre Amin von Norendoxifen **28** bzw das sekundäre Amin von Endoxifen **32** zu verknüpfen, um die Funktion als H-Brücken-Akzeptor in der LBD zu erhalten. Zur Realisierung solcher Leitstrukturen wurde Spacer **4** zunächst mit *O*-TBDMS geschützten Norendoxifen **40** umgesetzt (siehe **Abb. 4.8**, #1). Die TBDMS-Schutzgruppe wurde hierbei zunächst gewählt, um einer *O*-Alkylierung vorzubeugen, obgleich das Amin das Nucleophilere Zentrum unter den gewählten Bedingungen darstellt. Die TBDMS-geschützte Variante des Liganden **41**, Verbindung **42**, wurde hierbei nur als ein nicht chromatographierbares Gemisch von Mono- und Disubstituierten Produkt neben Edukt **40** erhalten. Durch Reaktionsverfolgung mittels DC konnte die Bildung des zweifach substituierten Produkts parallel zur Zielverbindung gleich zu Beginn der Reaktion gezeigt werden, eine Verkürzung der Reaktionszeit wäre demnach nur wenig zielführend gewesen, um die Ausbeute an Zielprodukt **42** zu erhöhen. Die Angabe der Ausbeuten beruht in solchen Fällen auf der Integration charakteristischer Signale im NMR-Spektrum; das Vorliegen zweifach substituerter Spezies wurde massenspektrometrisch überprüft. Die Verlagerung der Reaktion in Richtung des Monosubstitutionsprodukts **42** gelang teilweise durch Anwendung eines optimierten Protokolls zur Monofunktionalisierung aliphatischer Amine im System DBU/THF bzw. NEt<sub>3</sub>/THF nach Solanki und Mitarbeitern (**Abb. 4.8**, #3).<sup>[315]</sup> Die Ausbeute des Monosubstitutionsproduktes bei Verwendung von DBU/THF war hier nur marginal erhöht und der Anteil disubstituierten Nebenprodukts im Verhältnis sogar größer. Zudem wurde eine Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe sowohl beim Zielprodukt als auch beim Edukt beobachtet, was eine aufwändige Sequenz mehrmaliger säulenchromatographischer Aufreinigungen des Rohgemisches notwendig machte. Diese gestaltete sich aufgrund des zusätzlich aus **40** gebildeten Norendoxifens **28** als unnötig schwierig. Eine genaue Literaturrecherche zu diesem Sachverhalt ergab, dass das System DBU/THF durchaus dazu verwendet werden kann selektiv phenolische TBDMS-



#	Edukt	Base	Äq. Base	LM	T [°C]	t [h]	Ausbeute [%]
1	<b>40</b>	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.1	DMF			20 <sup>i</sup> (+25 <sup>ii</sup> )
2	<b>40</b>	NEt <sub>3</sub>	2.2	DCM	40	16	44 (+23 <sup>iii</sup> )
3	<b>40</b>	DBU	2.2	THF			26 <sup>i</sup> (+59 <sup>iii</sup> )
4	<b>28</b>	DBU	2.2	THF	40	4	33 (+23 <sup>ii</sup> )
5	<b>28</b>	DIPEA	2.2	MeCN			27
6	<b>32</b>	DBU	2.2	THF			71
7	<b>32</b>	DIPEA	2.2	MeCN	40	4	31

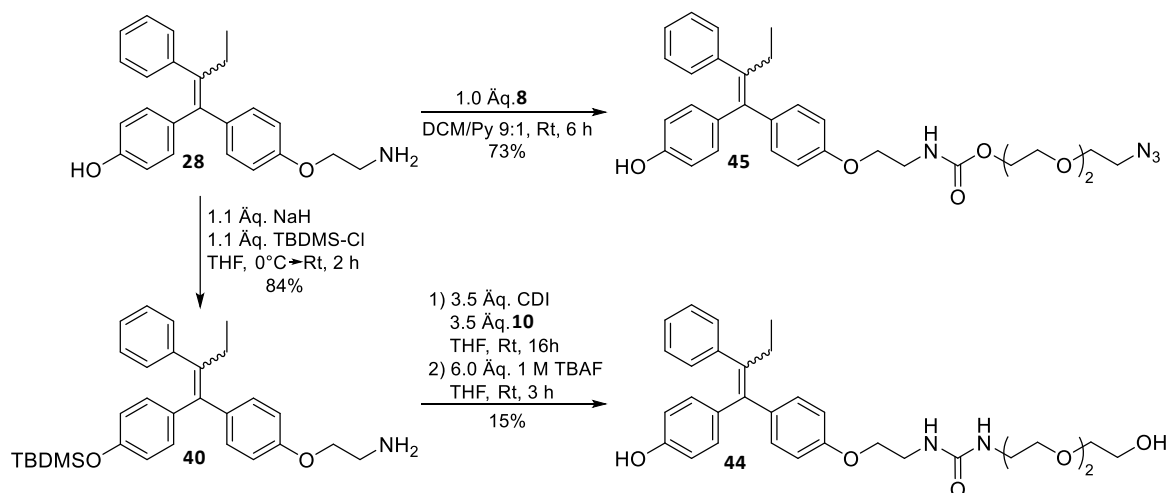
<sup>i</sup> Edukt, <sup>ii</sup> Gemisch, Mono- und Disubst. Produkt, <sup>iii</sup> Disubst. Produkt

**Abb. 4.8:** Syntheseveruche zu den Liganden **41** und **42** (aus **28**) und **40** (aus **32**) durch Reaktion mit Spacer **4**.

Schutzgruppen zu entfernen, eine weitere Anwendung des Protokolls auf **40** ist demnach obsolet.<sup>[316,317]</sup> Allerdings beinhaltet die Arbeit von Solanki auch eine Vorschrift mit NEt<sub>3</sub>/THF, wonach ohne katalytische Mengen von DBU gute Ausbeuten des Monosubstitutionsprodukts erhalten werden können. Dies wurde in einem entsprechenden Ansatz (#2) bestätigt, das Zielprodukt wurde mit 44% Ausbeute neben dem zweifach substituierten Produkt (23%) isoliert, die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe wurde nicht beobachtet. Parallel hierzu wurde das System DBU/THF in einem Ansatz mit Norendoxifen **28** (#4) zum Aufbau von Ligand **41** ohne TBDMS-Schutzgruppe getestet. Die Zielverbindung wurde nach 4 h in moderater Ausbeute von 33% isoliert, eine zweite Fraktion ist nach erneuter säulenchromatographischer Aufreinigung der Mischfraktion zugänglich, der Anteil von disubstituiertem Nebenprodukt war gering. Eine zweite Vorschrift nach Soloshonok und Mitarbeitern im System DIPEA/MeCN (#5) liefert nahezu identische Ausbeuten von **41** bei gleicher Reaktionszeit, Nebenprodukte konnten nicht gefunden werden. Die Tatsache, dass der Ligand **41** ohne zusätzliche Schutzgruppen-Chemie in moderaten Ausbeuten und vertretbarem chromatographischen Aufwand über das System DBU/THF zugänglich ist, veranlasste zur Synthese der zweiten Zielverbindung Ligand **43** im gleichen System ausgehend von Endoxifen **32**.<sup>[318]</sup> Sowohl über das System DBU/THF (#6) als auch über DIPEA/MeCN (#7) ist Ligand **43** in guter (71%)

bzw. moderater Ausbeute (31%) zugänglich und kann ohne signifikante Mengen an zweifach substituiertem Produkt isoliert werden. Über das Vorhandensein der phenolischen Protonen-Signale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **41** und **43** in Aceton- $\text{d}_6$  wurde die Substitution am Stickstoff verifiziert.

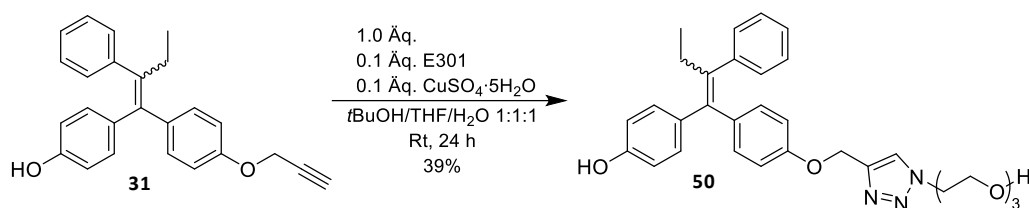
Ausgehend von Norendoxifen **28** sind zwei weitere Zielverbindungen zugänglich (siehe **Abb. 4.9**), von welchen Ligand **44** ein Harnstoff-Motiv zur Anknüpfung von Spacer und Effektormolekül aufweist und darüber hinaus eine terminale Alkohol-Gruppe für eine Phosphitylierung zum Aufbau eines Phosphoramidits trägt. Ligand **45** hingegen besitzt ein Carbamat-Motiv und ist Azid-terminiert, um in einem Plattform-basierten Ansatz post-synthetisch an das ASO on-bead geknüpft zu werden. Verbindung **45** wurde hierbei durch Reaktion von Norendoxifen **28** mit TEG-Spacer **8** in einer Mischung aus Dichlormethan und Pyridin mit 73% Ausbeute erhalten. Die Reaktion verläuft chemoselektiv durch Nucleophilen Angriff des primären Amins von **28** an der aktivierten Carbonylgruppe von **8**. Dies ist anhand der Kopplung des Stickstoffprotons der Carbamat-Gruppe mit den benachbarten Methylenprotonen der Ethyl-Seitenkette im  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Korrelationspektrum und das Protonensignal der phenolischen Gruppe nachvollziehbar. Die Synthese von Ligand **44** erfolgt hingegen über eine Aktivierung der Amino-Gruppe von **10** *in situ*, da sich **10** nicht als carbonylaktive Spezies analog zu **8** isolieren lässt. Hierzu wurde **10** zunächst eine Stunde mit CDI aktiviert, bevor eine Lösung von **28** in THF der Reaktionsmischung hinzugefügt wurde. Lediglich das Rohprodukt wurde nach dieser Herangehensweise isoliert und sofort weiter mit einer Lösung von



**Abb. 4.9:** Synthese der Liganden **45** und **44** aus Norendoxifen **28** bzw. aus TBDMS-geschütztem Norendoxifen **40**.

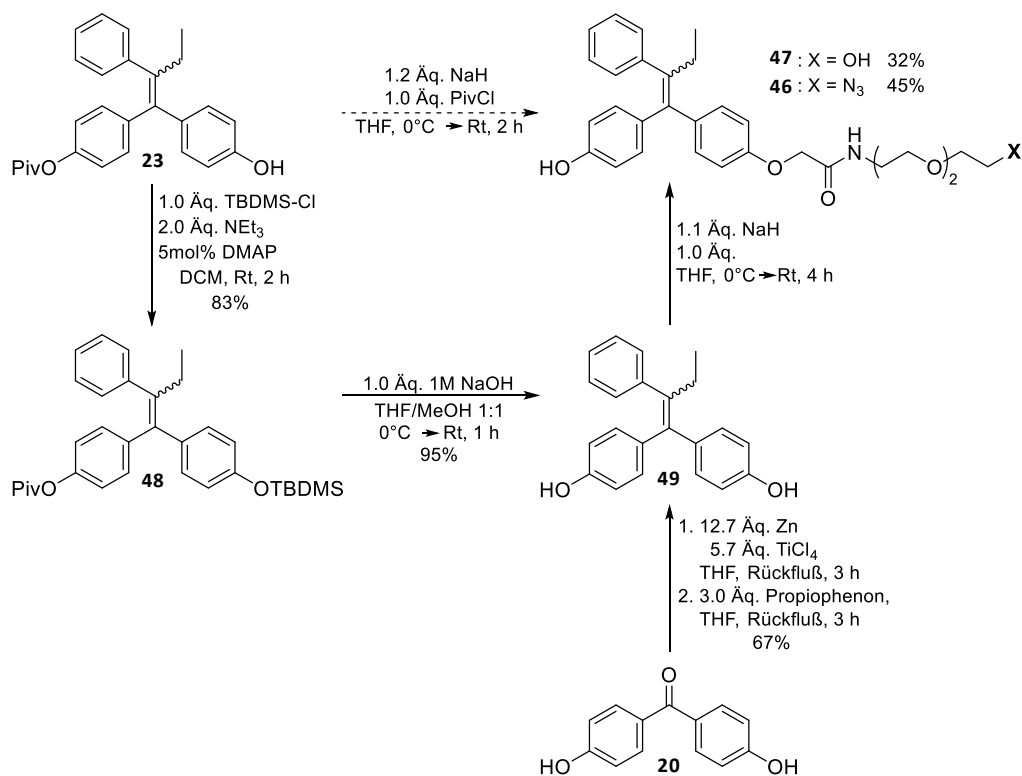
Tetrabutylammoniumfluorid in THF behandelt, um beide TBDMS-Schutzgruppen abzuspalten. Die Zielverbindung **44** wurde mit einer Ausbeute von nur 15% erhalten, wobei nicht abschließend geklärt ist, welcher der beiden Schritte ausbeutelimitierend war. Möglicherweise verlief die Aktivierung von **10** mit CDI nicht lange genug, da nach säulenchromatographischer Aufreinigung 30% der eingesetzten Menge von **40** als entschütztes **28** reisoliert werden konnten. Via Dünnschichtchromatographie konnte darüber hinaus der Verlauf der globalen Entschätzung bis zum Verbrauch des intermediären Kupplungsproduktes bestätigt werden.

Die bei der Synthese von **42** aus **40** aufgetretene Instabilität der phenolischen TBDMS-Schutzgruppe konnte ein weiteres Mal bei der Synthese der Liganden **46** und **47** beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um Liganden, bei welchen der TEG-Spacer zusammen mit der den Derivaten von 4-OHT eigenen Ethylamin-Seitenkette in das Triphenylethylengerüst **23** über eine  $S_N2$ -Reaktion am freien Phenol eingeführt werden sollte. Aus den Synthesen zu Endoxifen **32** konnte zudem die Erkenntnis gewonnen werden, dass sich gängige und literaturbekannte Reaktionsbedingungen (vgl. **Abb. 4.7**) zur Einführung dieser Seitenkette unter basischen Bedingungen als problematisch erweisen können, drastischere Reaktionsbedingungen (vgl. **Abb. 4.10**) erscheinen hierbei wenig sinnvoll. Substitutionen nach  $S_N2$  böten unter den bereits auf **23** angewendete  $S_N2$ -Bedingungen eine Option bei Verwendung von iodierten Aliphaten, eine Finkelstein-Reaktion mit dem Ziel einer Umhalogenierung von **14** und **15** wäre aber nur optionslos.<sup>[292]</sup> Mit dem Ziel, die Pivaloyl-Ester Schutzgruppe durch eine basenstabilere Schutzgruppe zu ersetzen, wurde die phenolische Gruppe in **23** TBDMS-geschützt und Verbindung **48** synthetisiert, welche nach chromatographischer Aufreinigung in methanolischer Natronlauge hydrolysiert wurde. Neben der beabsichtigten, quantitativen Verseifung des Esters wurde die TBDMS-Schutzgruppe unerwarteterweise hierbei wieder gespalten, wodurch unbeabsichtigt Verbindung **49** erhalten wurde. Möglicherweise führte die freigesetzte Pivalinsäure zur Spaltung des Esters. Verbindung **49** ist auch über eine McMurry-Reaktion aus **20** mit Propiophenon im Multigramm-Maßstab zugänglich. Die vorhandenen Mengen **49** wurde daher genutzt, um analog zur Umsetzung von **20** zu **22** jeweils ein Äquivalent der TEG-Spacer **14** und **15** mit Natriumhydrid als Base in THF durch Veretherung in **49** einzuführen. Ligand **47** wurde hierbei mit einer Ausbeute von 32%, Ligand **46** mit einer Ausbeute von 45% erhalten.



**Abb. 4.11:** Synthese von Ligand **50** ausgehend von Synthon **31**.

Die disubstituierten Nebenprodukte konnten säulenchromatographisch von den Zielprodukten isoliert werden und fielen mit Ausbeuten von 19% und 10% an. Das zweifach alkylierte Nebenprodukt zu **47** zeigt im gewählten Eluentengemisch (DCM/MeOH 93:7) eine stärkere Retention als die Zielverbindung, das Azid-terminierte, zweifach alkylierte Nebenprodukt zu **46** hingegen eine schwächere Retention und eluiert daher früher. Ligand **46** kann über eine Klick-Reaktion plattform-basiert an das ASO gebunden werden, Ligand **47** hingegen analog zu Ligand **44** phosphityliert um im Synthesezyklus der SPOS als Amidit-Baustein integriert zu werden. Ligand **50** bietet ebenfalls die Möglichkeit zu einem Phosphoramidit-Baustein umgesetzt zu werden und wurde durch Reaktion von **31** mit Spacer **2** mit einer Ausbeute von 39% erhalten (**Abb. 4.11**). Das Edukt **31** dieser Reaktion löste sich hierbei nur schlecht in dem gewählten klassischen Lösungsmittelgemisch, über die Reaktionsverfolgung via DC wurde allerdings



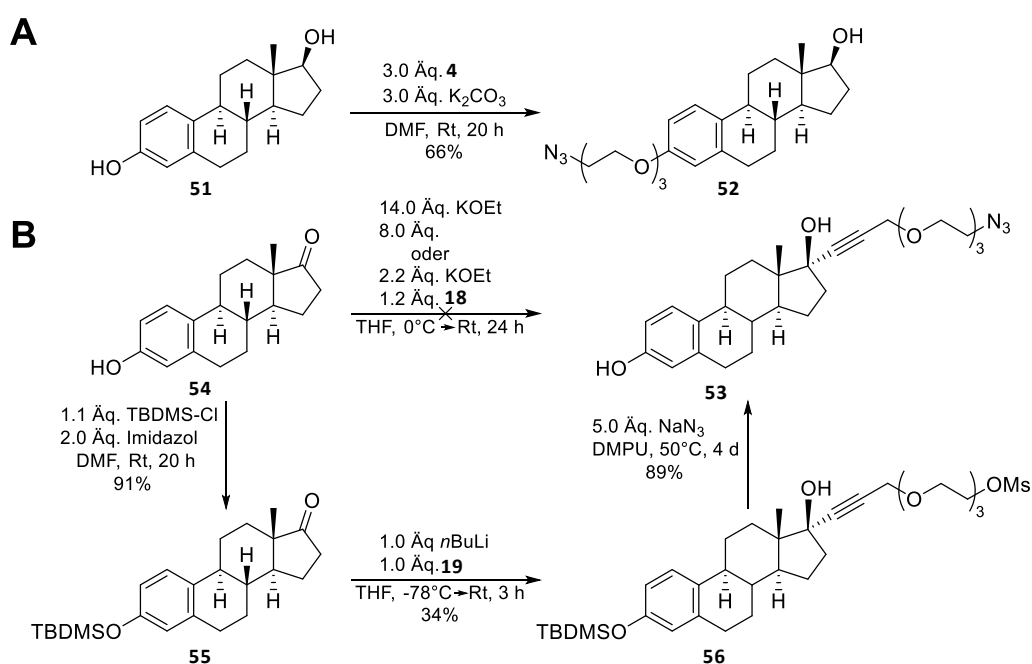
**Abb. 4.10:** Synthese der Liganden **47** und **46** in 3 Stufen ausgehend von **23** über **48** und **49**.

vollständiger Umsatz von **31** angezeigt. Die Kupfer-katalysierte Huisgen 1,3-dipolare Cycloadditionsreaktion lieferte selektiv das 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazol mit dem Ziel, den größtmöglichen Abstand zwischen dem primären Alkohol des Spacer und des Effektormoleküls zu gewährleisten. Die Triazol-Gruppe sorgt darüber hinaus für eine Rigidisierung an der Anknüpfungsstelle zwischen Effektor-Molekül und TEG-Spacer und ist darüber hinaus in der Lage, in der LBD H-Brücken auszubilden.

### 4.3.2 Estradiol-TEG-Liganden

Im späteren Verlauf sollen neben den dargestellten, auf dem SERM 4-OHT aufbauenden Liganden **41** und **43** (Amin-Verknüpft), **44** und **45** (Harnstoff- und Carbamat-verknüpft), **46** und **47** (Amid-verknüpft) und **50** (Triazol-verknüpft) auch Liganden auf Basis des Agonisten  $17\beta$ -Estradiol **51** zur Konjugation an das ASO verwendet werden. In Anlehnung an eine Arbeit von Bang und Mitarbeitern wurde Ligand **52** durch Reaktion von **51** mit Spacer **4** durch Nucleophile Substitution an Position 3 des steroidischen A-Rings aufgebaut (**Abb. 4.12, A**).<sup>[48]</sup> Anders als in Bangs Arbeit ist der Spacer hierbei nicht terminal phosphityliert, um in einer SPOS implementiert zu werden, sondern mit einer Azid-Gruppe für eine plattform-basierte Konjugation ausgestattet. Allerdings steht somit die phenolische Alkohol-Gruppe zur Wechselwirkung mit der LBD nicht mehr zur Verfügung. Der Ligand **53** hingegen verfügt über beide Alkohole um idealerweise eine hohe Bindungsaffinität zur LBD von ER $\alpha$  zu gewährleisten und soll im Kompetitions-Assay mit Ligand **52** verglichen werden. Die Arbeit von Alexis und Mitarbeitern bot einen ersten Ansatzpunkt zum direkten Aufbau des in Position 3 ungeschützten,  $17\beta$ -substituierten Estradiol-Derivats **53** mit potenter Bindung zu ER $\alpha$ .<sup>[295]</sup> Überschüsse von Homologen des Propargylalkohols (8 Äquivalente) wurden hierbei vorgelegt, mit einem großen Überschuss Kaliummethanolat (14 Äquivalente) deprotoniert und mit Estron **54** zur jeweils  $17\beta$ -alkylierten Verbindung unter C-C Bindungsknüpfung umgesetzt. Erst im Anschluss sollte eine Mesylierung des Alkinols und danach die Umsetzung mit Natriumazid zum terminalen Azid erfolgen. Allerdings konnte unter den beschriebenen Bedingungen kein Umsatz von **54** mit **18** beobachtet werden. Die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung zeigte hingegen den Verbrauch des TEG-Spacers unter Bildung einer Vielzahl an nicht näher charakterisierten Nebenprodukten an. Die in Alexis Arbeit verwendeten Spacer stellten ausschließlich aliphatische Alkinole da, möglicherweise eignet sich TEG-Spacer **18** als Mehrfach-Ether unter den stark basischen

Bedingungen nicht zur Ausbildung einer C-C-Bindung. Geringere Überschüsse an Spacer (1.2 Äquivalente) und Base (2.0 Äquivalente) konnten zwar das Auftreten von Nebenprodukten verringern, die Bildung der Zielverbindung **53** dennoch nicht beobachtet werden. Um Nebenreaktionen der ungeschützten Alkohol-Gruppen zu umgehen, wurde ein Ansatz von Poirier und Mitarbeitern verfolgt, bei welchem C-Nucleophile erst nach vorheriger Schützung der phenolischen Gruppe von Estron als Silylether eingeführt werden.<sup>[304]</sup> In diesem Zuge wurde auch der primäre Alkohol in Spacer **18** in das Mesylat **19** überführt (vgl. **Abb. 4.4**) und Spacer **19** mit einem Äquivalent *n*-Butyllithium vorgelegt. Hierbei konnte die charakteristische Fällung des Lithiumalkinyls als orangener Feststoff beobachtet werden, welcher sich nach Zugabe der Lösung von TBDMS-Estron **55** wieder löste. Die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung zeigte die Bildung weitaus weniger Nebenprodukte an, unter anderem die eines neuen Produkts, welches nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Isolierung als Zielverbindung **56** identifiziert wurde. Nach einer Vorschrift von Adamczyk und Mitarbeitern<sup>[294]</sup> bietet sich bei **56** nun die Möglichkeit, die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe zusammen mit der Substitution des Mesylats durch die Azid-Gruppe vorzunehmen. Verbindung **56** wurde daher in DMPU gelöst, mit einem Überschuss Natriumazid versetzt und 4 Tage bei 50 °C erhitzt. Tatsächlich wurde die Zielverbindung **53** als einziges Produkt nach einfacher säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 89%



**Abb. 4.12:** Synthese von Agonist-Ligand **52** aus 17 $\beta$ -Estradiol **51** (A) und von Agonist-Ligand **53** über **55** und **56** (B).

isoliert. DMPU ist analog zu HMPA in der Lage, Alkali-Kationen zu solvatisieren was eine stärkere Nucleophilie der entsprechenden, meist kleinen Anionen zur Folge hat.<sup>[319–321]</sup> Dies wird bei der Spaltung von Silylethern ausgenutzt, so z.B. bei der Spaltung der SEM-Schutzgruppe mit TBAF in DMPU<sup>[322]</sup> oder bei der Totalsynthese von (+)-Spongistatin 2 mit Natriumsalzen in DMPU.<sup>[323]</sup>

## 4.4 Bestimmung der Bindungsaffinität an Estrogenrezeptor $\alpha$ mittels Kompetitionsassay

### 4.4.1 Wahl und Aufbau des Assay

Sowohl die gezeigten, SERM-abgeleiteten Liganden **41** und **43** (Amin-verknüpft), **44** und **45** (Harnstoff- und Carbamat-verknüpft), **46** und **47** (Amid-verknüpft), **50** (Triazol-verknüpft) sowie die Agonist-abgeleiteten Liganden **52** und **53** sollten in einem Verdrängungs-Assay auf ihre Bindungsaffinität zu ER $\alpha$  untersucht werden. Der Assay arbeitet hierbei nach dem Prinzip der Fluoreszenzpolarisation (Mix-and-Read-Assay-Format). Die Studien wurden an gelöstem ER $\alpha$  durchgeführt, als fluoreszente Sonde diente ein rigidisiertes Konjugat bestehend aus Estradiol, an welchem in 17 $\beta$ -Position Fluorescein kovalent angeknüpft ist (Fluormone ES2 Green Tracer).<sup>[303]</sup> Sonde und Rezeptor wurden zunächst prä-inkubiert und eine Testsubstanz anschließend hinzugefügt. Die starre Fixierung der Sonde in der LBD des Rezeptors verursacht hierbei nach Fluoreszenzanregung bei 490 nm hohe Ausbeuten planar polarisierten Lichts ( $P_{||}$ ) bei 540 nm als Emissionswellenlänge. Der Anteil dieses polarisierten Lichts sinkt, sobald eine ausreichende Konzentration der Testsubstanz vorhanden ist, da die Sonde aus der starren Fixierung der LBD zunehmend verdrängt wird. Somit wird statistisch mehr vertikal polarisiertes Licht ( $P_{\perp}$ ) durch die freie Rotation dieses Moleküls detektiert. Die Fluoreszenzpolarisation ergibt sich aus folgender Gleichung zu

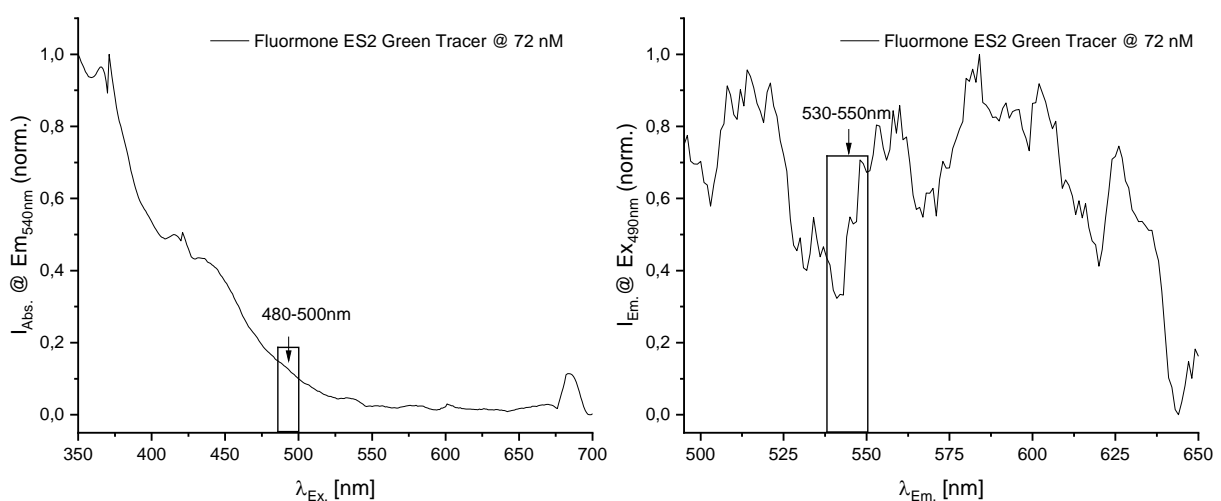
$$P = \frac{P_{||} - P_{\perp}}{P_{||} + P_{\perp}} \quad (1).$$

Im Fall eines guten Binders werden hohe Werte für P bei niedrigen Konzentrationen gefunden, niedrige Werte für P bei hohen Konzentrationen des gleichen Binders. Gemäß des Anwenderprotokolls wurde eine Stammlösung von Estradiol als Positivkontrolle verwendet. Die Verbindung dient ebenfalls als Referenzsubstanz. Trotz mehrfacher Versuche konnte der im Protokoll angegebene Wert für den relativen IC<sub>50</sub> von



Estradiol nicht bestimmt werden. Generell wurde selbst bei 8-fach höheren Konzentrationen als benötigt ( $c(\text{Sonde}) = 32 \text{ nM}$  vs  $c(\text{Sonde}) = 4 \text{ nM}$ ) kein Unterschied in der Fluoreszenzemission (540 nm) und damit in den P-Werten zwischen der Positivkontrolle (10  $\mu\text{M}$  E2) und der Negativkontrolle (Sonde + ER $\alpha$ ) nachgewiesen. Eine Vermessung der Sonde bei verschiedenen steigenden Konzentrationen in Puffer ergab erst ab einer um den Faktor 72 erhöhten Konzentration (288 nM) ein Signal/Rausch-Verhältnis, mit welchem gearbeitet werden könnte (Faktor 5). Dies legte den Schluss nahe, dass die verwendete Sonde von geringer Qualität ist, was durch Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren bestätigt wurde (siehe **Abb. 4.13**). Die Sonde zeigte bei einer Konzentration von 72 nM und Fluoreszenzanregung im Bandbreitenbereich von 350-700 nm keine signifikante Emission bei  $540 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ , unabhängig von der verwendeten Anregungswellenlänge (vgl. **Abb. 4.13**, links). Zudem zeigt die Sonde keine nennenswerte und vor allem von anderen Wellenlängen klar abgehobene Emission im Bandenbereich von 490-650 nm bei einer Anregung mit  $490 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$  (vgl. **Abb. 4.13**, rechts). Diese Ergebnisse wurden mit verschiedenen, vom Hersteller bereitgestellten Chargen der Sonde erhalten. Da sich die betreffende Sonde somit für die durchzuführenden Konkurrenzexperimente als ungeeignet herausstellte, wurde nach einer neuen Sonde gesucht.

Ein passendes und in seiner Gesamtheit sehr elegantes Hochdurchsatz-Verfahren wurde 2005 von Gurer und Mitarbeitern publiziert und nutzt das Phytoestrogen



**Abb. 4.13:** Fluoreszenzanregungsspektrum der Sonde bei konstanter Emissionswellenlänge 540 nm (links) und Fluoreszenzemissionsspektrum bei konstanter Anregungswellenlänge 490 nm (rechts).

Coumestrol als fluoreszente Sonde. Die Auswertung basiert hierbei jedoch auf der Fluoreszenzemission und nicht der Polarisation.<sup>[302]</sup> Der neu etablierte Assay erlaubt die Bestimmung relativer EC<sub>50</sub>-Werte potentieller Liganden des ER $\alpha$ , welche mit diesem eine bindende Wechselwirkungen eingehen. Die Evaluierung der Bindungsstudien an ER $\alpha$  erfolgt anhand der Messung der Fluoreszenzemission der autofluoreszenten Sonde Coumestrol. Coumestrol zeigt bei Fluoreszenzangeregung mit 355 nm eine moderat gesteigerte Fluoreszenzemission bei 408 nm, sobald es gebunden in der Bindungstasche des Rezeptors vorliegt. Sonde und Protein befinden sich in der Versuchsanordnung prä-äquilibriert in Lösung. Anschließend wird die Testsubstanz hinzugegeben und die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 408 nm in Folge der Konkurrenz um die LBD gemessen. Sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen wurden zusätzlich vermessen. Die Positivkontrolle beinhaltet neben Rezeptor und Sonde zusätzlich den natürlichen Agonisten Estradiol, welcher als etablierter Standard gilt. Estradiol verdrängt Coumestrol aus der LBD, wodurch eine Abnahme der Fluoreszenz bei 408 nm hervorgerufen wird - die Positivkontrolle ruft somit die geringste Intensität an Fluoreszenzlicht ( $I_{\text{pos}}$ ) hervor. Die Negativkontrolle beinhaltet lediglich Rezeptor und Sonde. Da Coumestrol in der Negativkontrolle vollständig gebunden vorliegt (idealisiert), weist diese Kontrolle bei 408 nm die höchste Intensität an Fluoreszenzlicht ( $I_{\text{neg}}$ ) auf. Alle weiteren gemessenen Werte für den Liganden ( $I_L$ ) liegen in diesem von den Kontrollen aufgespannten Raum. Die Menge substituierten Coumestrols als Maß für die Bindungsaffinität ergibt sich unter Berücksichtigung beider Kontrollen nach folgender Formel:

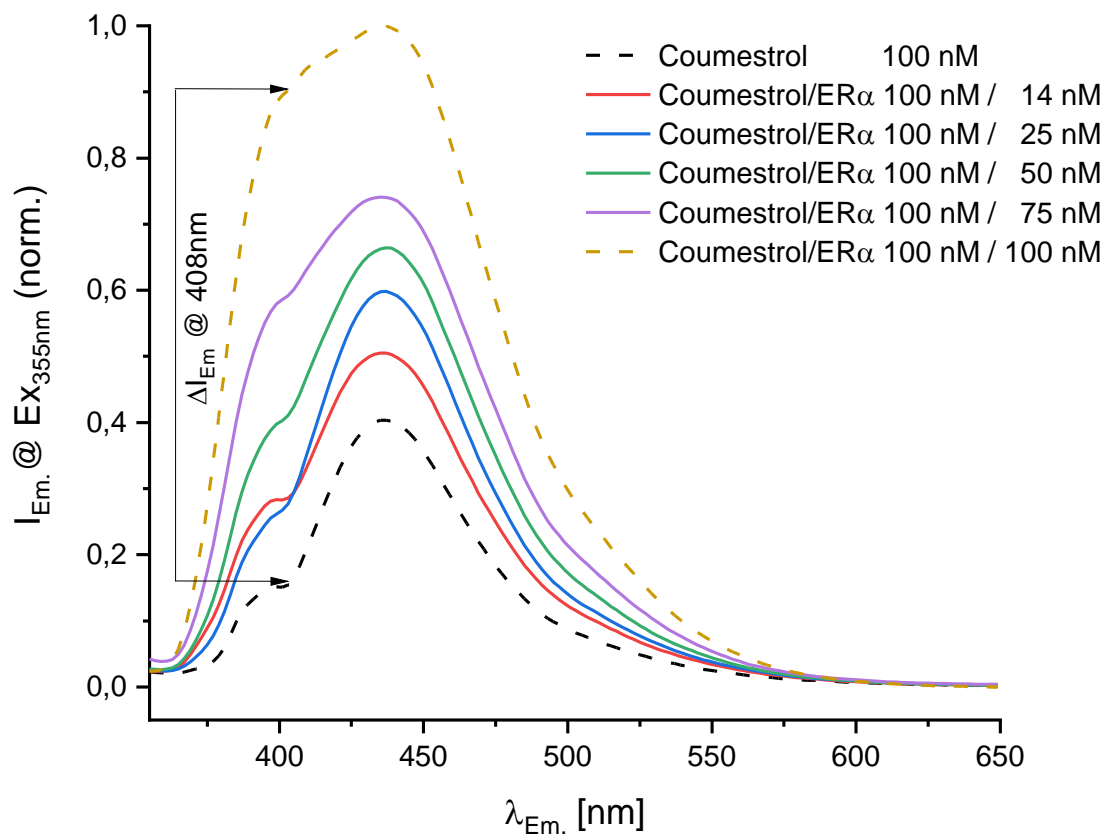
$$\text{Coumestrol – Verdrängung (\%)} = \frac{I_{\text{neg}} - I_L}{I_{\text{neg}} - I_{\text{pos}}} \quad (2).$$

Die für Experimente dieser Art zu erwartende sigmoide Kurve ergibt sich durch die Auftragung des Anteils substituierten Coumestrols in Prozent (% Coumestrol-Verdrängung) gegen den negativen dekadischen Logarithmus der Konzentration (in [nM]) des eingesetzten Liganden. Zur Beurteilung der Qualität jeder Messung wurde von Zhang und Mitarbeitern<sup>[324]</sup> der dimensionslose Faktor Z eingeführt, welcher den natürlichen Schwankungen innerhalb der Experimente und zwischen den Tagen der Experimente Rechnung trägt. Der Z-Faktor erlaubt somit konkret eine Aussage über die dynamische Breite des Signals sowie über das Verhältnis des gemessenen Signals im Vergleich zum Grundrauschen. Je kleiner der Wert des Zählers, umso größer ist das

Separationsband. Folglich liegen die Werte für Positiv- bzw. Negativkontrolle weit genug auseinander, um sie klar voneinander trennen zu können.<sup>[325]</sup> Er ist somit ein Maß für die Aussagekraft eines Assays und ist definiert als:

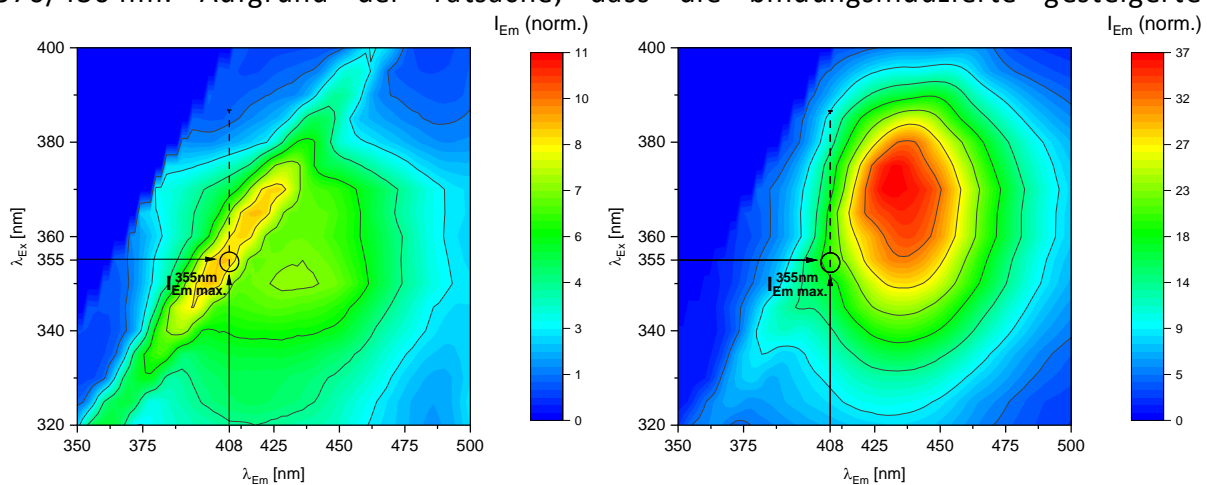
$$Z = 1 - \frac{3 \cdot \sigma_{\text{pos}} + 3 \cdot \sigma_{\text{neg}}}{|\mu_{\text{pos}} - \mu_{\text{neg}}|} \quad (3)$$

mit  $\mu$  als Mittelwert der jeweiligen Kontrolle und  $\sigma$  als zugehörige Standardabweichung des Mittelwertes der Kontrolle. Der Faktor kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei Werte zwischen 0.5 und 1 den Assay als exzellent beschreiben, Werte unter 0.5 hingegen den Assay als schlecht einstufen.<sup>[325]</sup> Die Grundzüge des Assays sind maßgeblich an die Arbeit von Gurer angelehnt, allerdings wurde bei ersten Versuchen eine unzureichende Diskriminierung zwischen Grundrauschen und der Fluoreszenz von Coumestrol festgestellt. Daher wurde ein Emissionsspektrum des angegebenen Konzentrationsverhältnisses von Sonde und Rezeptor (100:14) bei einer Anregung mit 355 nm aufgenommen und mit den Emissionsspektren eines kleiner werdenden Verhältnisses zwischen Sonde und Rezeptor verglichen (**Abb. 4.14**).



**Abb. 4.14:** Fluoreszenzemissionsspektrum von Coumestrol (schwarz, gestrichelt) und Spektren der verschiedenen Coumestrol/ER $\alpha$ -Verhältnisse mit dem für den Assay neu gewählten Verhältnis (gold, gestrichelt).

Der Assay wird nach Gurer im 96-Well-Plate-Format mit einem Arbeitsvolumen von 205  $\mu\text{L}$  bei einer Coumestrol-Konzentration von 100 nM und einer ER $\alpha$  Konzentration von 14 nM durchgeführt. Es ist erkennbar, dass die Wahl dieses Verhältnisses nur zu einer sehr schwachen Steigerung der Emission bei 408 nm im Vergleich zur Grundfluoreszenz von Coumestrol führt (ca. 2-fach, vgl. rote und schwarze Kurve). Das in der Arbeit von Gurer gezeigte Spektrum mit einem Plateau von 408–441 nm wird hingegen erst annähernd bei einer Konzentration ER $\alpha$  von 100 nM erreicht. Die bindungsinduzierte Fluoreszenz des Coumestrol-LBD-Komplexes ist hier ca. 7-fach größer im Vergleich zur Autofluoreszenz von Coumestrol und ca. 3-fach größer im Vergleich zu einem Coumestrol/ER $\alpha$ -Verhältnis von 100:14. Der Assay wurde demnach auf dieses Verhältnis umgestellt. Zudem wurde untersucht, ob die gewählte Anregungswellenlänge und die damit verbundene Intensität der zur Detektion gewählten Emissionswellenlänge optimal sind (**Abb. 4.15**). Es wurde ersichtlich, dass das von Gurer gewählte Anregungs-/Emissionswellenlängenpaar 355/408 nm bei dem Verhältnis Coumestrol/ER $\alpha$  100:14 ein Maximum an Intensität bietet (**Abb. 4.15**, links). Dies reichte allerdings zur Erzeugung eines guten Signal/Rausch-Verhältnisses nicht aus (vgl **Abb. 4.14**). Die absolute Intensität bei 408 nm ist für das Verhältnis Coumestrol/ER $\alpha$  100:14 zwar ca. 3-fach höher als für das Verhältnis 100:100 (**Abb. 4.15**, rechts), wie auch aus den Emissionsspektren in **Abb. 4.14** ersichtlich ist. Allerdings verschiebt sich das tatsächliche Intensitätsmaximum zu dem Wellenlängenpaar 370/430 nm. Aufgrund der Tatsache, dass die bindungsinduzierte gesteigerte



**Abb. 4.15:** Vergleich der Anregungs-Emissionsspektren der Coumestrol-ER $\alpha$ -Verhältnisse 100:14 (links) und 100:100 (rechts) in Assay-Puffer. Die Intensitäten der Emission bei 408 nm sind für Anregungswellenlängen von 320–400 nm entlang des Pfeils gezeigt.

Fluoreszenz für Coumestrol bei 408 nm auftritt und der Assay nicht grundsätzlich geändert, sondern lediglich adaptiert werden soll, wurde das Anregungs-/Emissionswellenlängenpaar unverändert auf 355/408 nm festgelegt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Assay im Vergleich zur Originalpublikation von Gurer hinsichtlich einiger Punkte modifiziert (vgl. **Tabelle 4-1**).

**Tabelle 4-1:** Änderungen des Assays im Vergleich mit den Bedingungen nach Gurer.

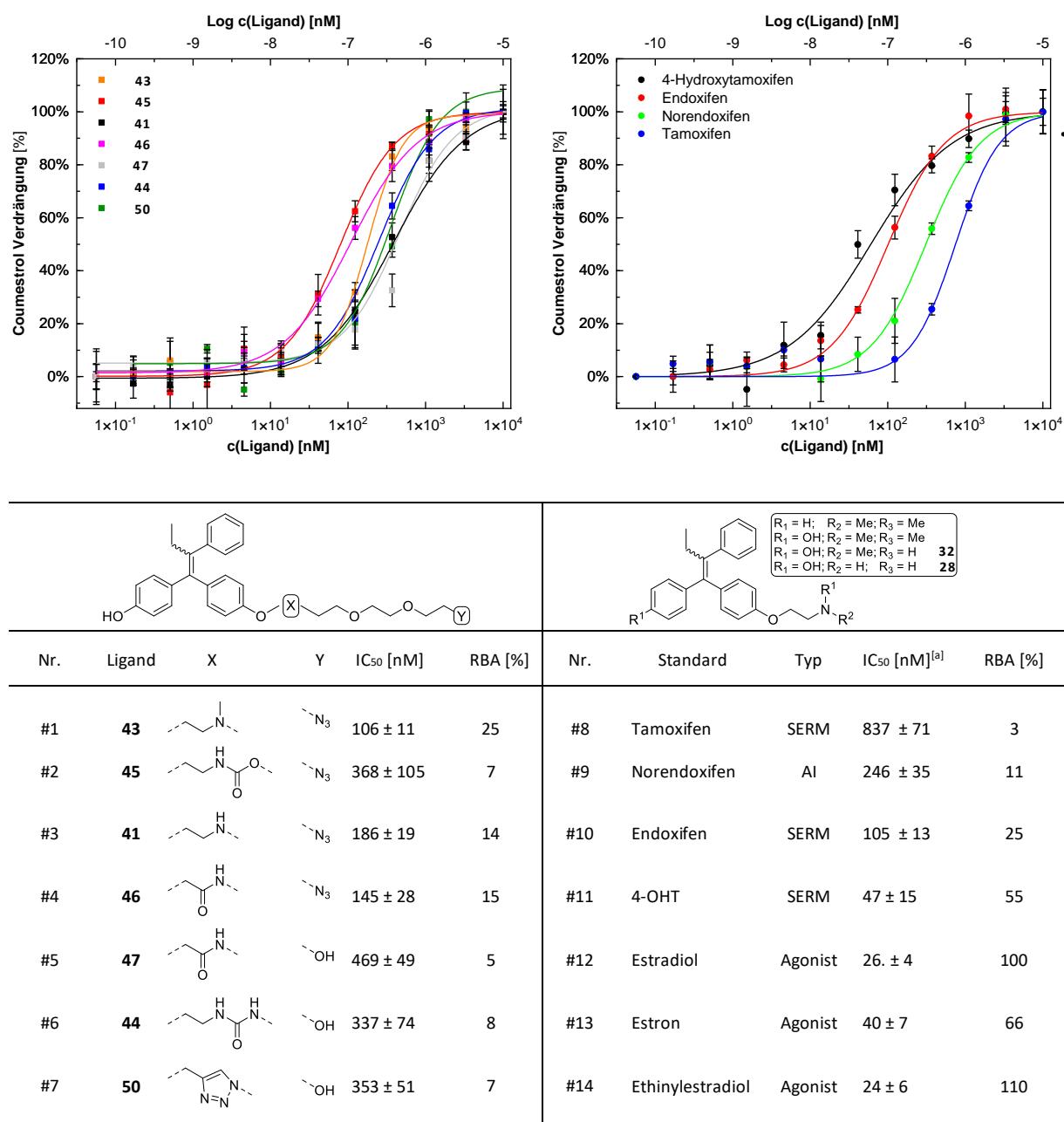
	<i>Gurer-Orhan et al.</i> <sup>[57]</sup>	Angepasster Assay
Well-Platten-Format	96	384
Arbeitsvolumen [ $\mu\text{L}$ ]	205	20
Konzentration ER $\alpha$ [nM]	14	100
Konzentration Coumestrol [nM]	100	100
Expression von ER $\alpha$	Rekombinant, <i>E. coli</i> BL21(DE3), His6-tagged	Rekombinant, <i>Spodoptera frugiperda</i> , untagged

#### 4.4.2 Durchführung und Ergebnisse des Assays

Von jedem Liganden wurden Duplikate aufgenommen. Jede Kurve setzt sich idealerweise aus zwölf Messpunkten, gleichmäßig verteilt über einen Konzentrationsbereich von 0.05–10000 nM, zusammen. Jede Konzentration wurde 6-fach bestimmt. Die Messpunkte wurden hierfür mit der 4-Parameter-Logistik-Funktion (4PL) *Dose-Response* ohne Restriktion eines Parameters angenähert, welche wie folgt definiert ist:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\text{LOG}(X_0 - X)) \cdot p}} \quad (4)$$

, mit  $y$  als Funktionswert,  $A_1$  und  $A_2$  als Top- bzw. Boden-Asymptote. Dies sind die Werte der Positiv- (Maximalwert, vollständige Verdrängung,  $A_1$ ) und Negativkontrolle (Minimalwert, keine Verdrängung,  $A_2$ ).  $X_0$  ist der Wendepunkt und damit der Mittelpunkt des zwischen den Asymptoten aufgespannten Raums,  $X$  ist die unabhängige Variable und im vorliegenden Fall die Konzentration des eingesetzten Liganden. Der Parameter  $p$  ist der Hill-Koeffizient und damit die Steigung der Kurve. Als Standards wurden Estradiol, Ethinylestradiol und Tamoxifen verwendet, deren Werte zur Validierung des Assays direkt mit den Werten aus der Arbeit von GURER verglichen



**Abb. 4.16:** Bindungskurven, daraus bestimmte EC<sub>50</sub>-Werte und RBAs der SERM-abgeleiteten Liganden (#1-7, links), der metabolischen Derivate des SERM 4-OHT (#8-11), der endogenen Follikelhormone (#12-13) sowie von Ethinylestradiol (#14) (rechts), bezogen auf Estradiol.

wurden. In **Abb. 4.16** sind die Bindungskurven der SERM-abgeleiteten (links) und der Estradiol-abgeleiteten Liganden (rechts) gezeigt. Hierbei ist auffällig, dass der Wendepunkt der Kurve nicht immer mit der Marke von 50% zusammenfällt. Dieses Phänomen ist der Tatsache geschuldet, dass die Sonde auch bei Abwesenheit eines Kompetitors nicht vollständig gebunden, sondern in einem dynamischen Gleichgewicht mit der umgebenden Lösung vorliegt. Dies führt dazu, dass schon bei sehr geringen

Konzentrationen eines Kompetitors eine fälschlicherweise erhöhte Verdrängung und damit eine verringerte Emission bei 408 nm vorgetäuscht wird. Geringe Konzentrationen des Kompetitors erzeugen daher leicht positive Werte über 0%. Da Coumestrol mit ER $\alpha$  eine schwächere Bindung eingeht als der endogene Agonist Estradiol, führen hohe Estradiolkonzentrationen zu einer vollständigen Verdrängung von Coumestrol aus der LBD und somit zu einer niedrigeren Emission bei 408 nm. Dies ist insbesondere bei der Positivkontrolle zu beobachten.<sup>[244]</sup> Dieser Effekt tritt auf, sobald Sonde und Positivkontrolle nicht identisch sind, so wie es im vorliegenden Assay der Fall ist und von Gurer beschrieben wurde. Somit erzeugt Estradiol bei der für die Positivkontrolle gewählten Konzentration eine niedrigere Emission bei 408 nm als es Coumestrol bei identischer Konzentration täte. Dadurch werden bei hohen Konzentrationen eines guten Binders relative Bindungsaffinitäten über 100% Verdrängung erzeugt.<sup>[326]</sup> Zu Anschauungszwecken werden daher oftmals die Fluoreszenzwerte der „Top-“ und „Bottom-Asymptote“ (bzw. Positiv- und Negativkontrolle) zu 100% bzw. 0% gesetzt. Die Restriktion dieser Iterationsparameter ist allerdings sehr kontrovers diskutiert und wird nicht empfohlen, solange die Werte an den Rändern der Konzentrationsreihe eine Differenz von 20% in Bezug auf die Kontrollen nicht überschreiten. Dies wurde für keinen der gemessenen Liganden gefunden.<sup>[327]</sup> Die Restriktion eines Parameters macht zudem nur Sinn, sofern für die entsprechende Kontrolle ein definierter Wert auf Basis weiterer Vereinfachungen herangezogen werden kann.<sup>[328]</sup> Dies ist allerdings in den meisten Fällen nur schwer möglich, da zu viele Parameter die Fluoreszenz der Kontrollen beeinflussen. Innerhalb einer Versuchsreihe können dies die irreversible Autoxidation der Sonde oder die (teilweise) Denaturierung des Proteins sein. Generell stellt die Aufkonzentration der Kontrolllösungen infolge von Verdampfung der in den Wells verwendeten geringen Arbeitsvolumina eine zusätzliche Fehlerquelle da. Das Verhältnis von Rezeptor zu Sonde und die Absolutkonzentration beider Komponenten im Vergleich zu der gewählten Konzentrationsreihe der Proben ist hier ebenso zu berücksichtigen. Werte, welche anhand verschiedener Assay-Formate bestimmt wurden (Radiolabeling, Fluoreszenzpolarisation, Fluoreszenzemission, HPLC-MS) sind grundsätzlich nicht miteinander vergleichbar. Ein konkretes Problem ergibt sich zuletzt aus den elektronischen Eigenschaften der Liganden selbst. Wie bereits eingangs dargelegt, ist

die Doppelbindungsgeometrie einem ständigen Isomerisierungsvorgang unterworfen. Daher ist es unmöglich, sowohl die Liganden als auch die Standards Tamoxifen, 4-Hydroxytamoxifen, Endoxifen und Norendoxifen bei identischen E/Z-Verhältnissen zu vermessen. Eine Absolutbestimmung der  $EC_{50}$ -Werte ist allerdings nicht notwendig, da die Bestimmung der Größenordnung und ihr Vergleich zu etablierten Standards ist zur Bewertung der Liganden vollkommen ausreichend ist. Als Maß wird standardmäßig die bereits in Kapitel 2.5 vorgestellte relative Bindungsaffinität gewählt, die einen Vergleich mit Werten aus anderen Assay-Formaten auf Basis von  $17\beta$ -Estradiol als Positivkontrolle ermöglicht (**Abb. 4.16**).<sup>[329]</sup> Alle durchgeführten Messungen weisen einen Z-Faktor  $> 0.5$  auf, das Separationsband ist also mindestens 3-fach größer als die Streuung um die Mittelwerte der Kontrollen (Diskriminierung zwischen Positiv- und Negativkontrolle).

Die gefundenen RBAs der SERM-Standards entsprechen hierbei literaturbekannten Werten, welche auf Basis von Fluoreszenzpolarisations-Experimenten mit einer auf  $17\alpha/\beta$ -Estradiol basierenden Sonde für explizite Verhältnisse von Sonde/ $ER\alpha$  (13:1–3:1) erhalten wurden. Das Kompetitionsverhalten von 4-OHT (55%) findet sich auch bei Parker (22%)<sup>[254]</sup> und Johnson (35%).<sup>[255]</sup> Tamoxifen (3%) bindet aufgrund der fehlenden Hydroxyl-Gruppe wesentlich schlechter, was von Parker (2.9%)<sup>[254]</sup> und Ohno (1.7%)<sup>[254]</sup> bestätigt wurde, von Gurer jedoch abweicht (23%).<sup>[302]</sup> Die RBA von Endoxifen (25%) entspricht dem von Johnson (25%)<sup>[255]</sup> gefunden Wert und nähert den von Keely (13%)<sup>[281]</sup> sehr gut an. Norendoxifen ist eigentlich kein Substrat der Estrogenrezeptoren, zeigt aber das von Cushman (32%) gefundene Kompetitionsverhalten für  $ER\alpha$  (11%).<sup>[292]</sup> Erwartungsgemäß wurden für die 4-Hydroxytamoxifen-abgeleiteten Liganden **41** und **43** (Amin-verknüpft), **44** und **45** (Harnstoff- und Carbamat-verknüpft), **46** und **47** (Amid-verknüpft) und **50** (Triazol-verknüpft) größere RBAs (7-25%) als für das nicht-hydroxylierte Prodrug Tamoxifen (3.1%) nachgewiesen. Die Liganden **41** (14%) und **43** (25%), die beide über ein protonierbares Strukturelement zur Ausbildung einer Salzbrücke zwischen der Seitenkette und des AS-Rests Asp-351 verfügen, zeigten hierbei zweistellige RBAs, die im Vergleich zu ihren Strukturanaloga Endoxifen (25%) und 4-OHT (55%) lediglich halbiert sind. Ligand **46** zeigt ebenfalls eine zweistellige RBA (15%), bemerkenswert ist allerdings der Vergleich mit dem zweiten amidischen Ligand **47** (6%) - beide Liganden unterscheiden sich

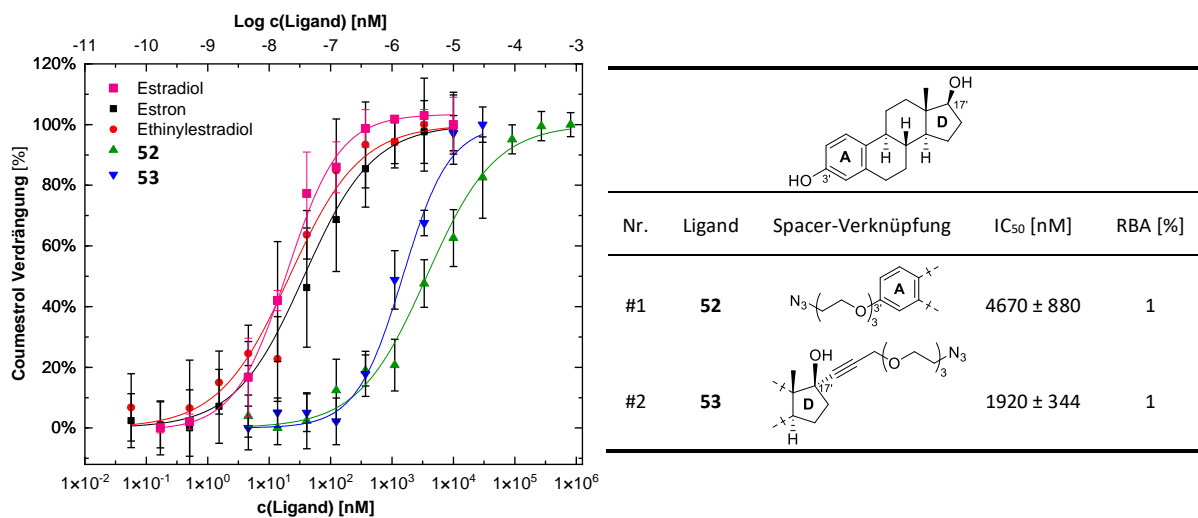


lediglich in der Terminierung am TEG-Spacer und besitzen jeweils einen H-Donor (Amid-H) und H-Akzeptor (Carbonylgruppe). Es konnte leider keine Erklärung gefunden werden, weshalb das Azid im Vergleich zum Alkohol zu einer 3-fach höheren RBA führen soll und Ligand **46** eine fast identische RBA wie Ligand **41** trotz Fehlen eines protonierbaren Strukturelements zeigt. Die Liganden **44** (7.7%) und **45** (7.8%) zeigen einen isosteren Austausch zueinander (Harnstoff  $\leftrightarrow$  Carbamat), welcher im Vergleich zu **41** zwar nicht den Aufbau einer Salzbrücke über ein protonierbares Strukturelement zulässt, allerdings über einen H-Akzeptor (Carbonylgruppe) und im Fall von **44** sogar über zwei H-Donoren (Amid-H) verfügt. Beide Liganden zeigen demnach auch ähnliche, einstellige RBAs. Ligand **50** (7%) zeigt eine RBA, welche mit den Werten von **44** (8%) und **45** (7%) identisch ist. Der Triazolring kann als pharmakophore Gruppe über ein Wassermolekül eine H-Brücke aufbauen und damit ASP-351 als Wechselwirkungspartner mit einbeziehen. Unerwarteterweise zeigten die Estradiol-abgeleiteten Liganden **52** (0.6%) und **53** (1.3%) eine sehr schwache Bindung zur LBD und damit niedrigere RBAs im Vergleich zu den Standards Estron (66%) und Ethinylestradiol (110%).

Die zweistellige RBA von Estron konnte von Ohno (28%)<sup>[59]</sup> bestätigt werden. Ethinylestradiol bindet laut Gurer auch marginal besser als Estradiol (126%).<sup>[302]</sup> Der große Unterschied in den RBAs ist aus **Abb. 4.17** ersichtlich, die Sigmoide der Liganden **52** und **53** sind entlang der X-Achse deutlich zu höheren Konzentrationen verschoben. Dieses Verhalten erscheint insbesondere für **53** sehr ungewöhnlich, da Spacer mit einer vergleichbaren aliphatischen Spacerstruktur und Kettenlänge in der Arbeit von Adamczyk zumindest einstellige RBAs zeigen.<sup>[294]</sup>

Zudem werden fluorophormarkierte Estradiol-Derivate mit sterisch anspruchsvolleren Resten als Sonden für Fluoreszenzpolarisationsexperimente eingesetzt.<sup>[254,255,294,303]</sup> Letztlich ist eine hohe Bindungsaffinität allein aber nicht ausschlaggebend für das Auftreten estrogener bzw. anti-estrogener Effekte, die eine Signaltransduktionskaskade initiieren oder zu einer rezeptorvermittelten Aufnahme eines Binders führen.<sup>[330,331]</sup> Dies wurde eindrucksvoll von Cushman in einer SAR-Studie zu Derivaten von Norendoxifen-Analoga gezeigt.<sup>[288]</sup> Die Expression des Progesteronrezeptors (PGR) als Maß der translatierenden Aktivität von ER $\alpha$  wurde zur Beurteilung potentieller estrogener bzw. anti-estrogener Wirkung eines Liganden

herangezogen.<sup>[332]</sup> Norendoxifen bewirkte eine Reduktion der PGR-mRNA von 86% bei einem  $EC_{50}$  von 27 nM, wohingegen 4'-Hydroxynorendoxifen eine Reduktion von 96% bei einem  $EC_{50}$  von 1920 nM hervorrief. Von zentraler Bedeutung zur Diskriminierung zwischen estrogener und anti-estrogener Wirkung gilt zudem die in Kapitel 2.5 diskutierte Repositionierung der Helix 12 nach Bindung eines Liganden.<sup>[333]</sup> Darüber hinaus zeigt die Arbeit von Bang, dass Spacer-dekorierte Estradiol-Derivate wie Ligand **52** ungeachtet ihrer Bindungsaffinität zu  $ER\alpha$  eine gesteigerte zelluläre Aufnahme von ON-Konjugaten ermöglichen und in der Folge einen im Vergleich zu nicht konjugierten, untransfizierten Oligonucleotiden stärkere biologische Wirkung generieren.<sup>[293]</sup>

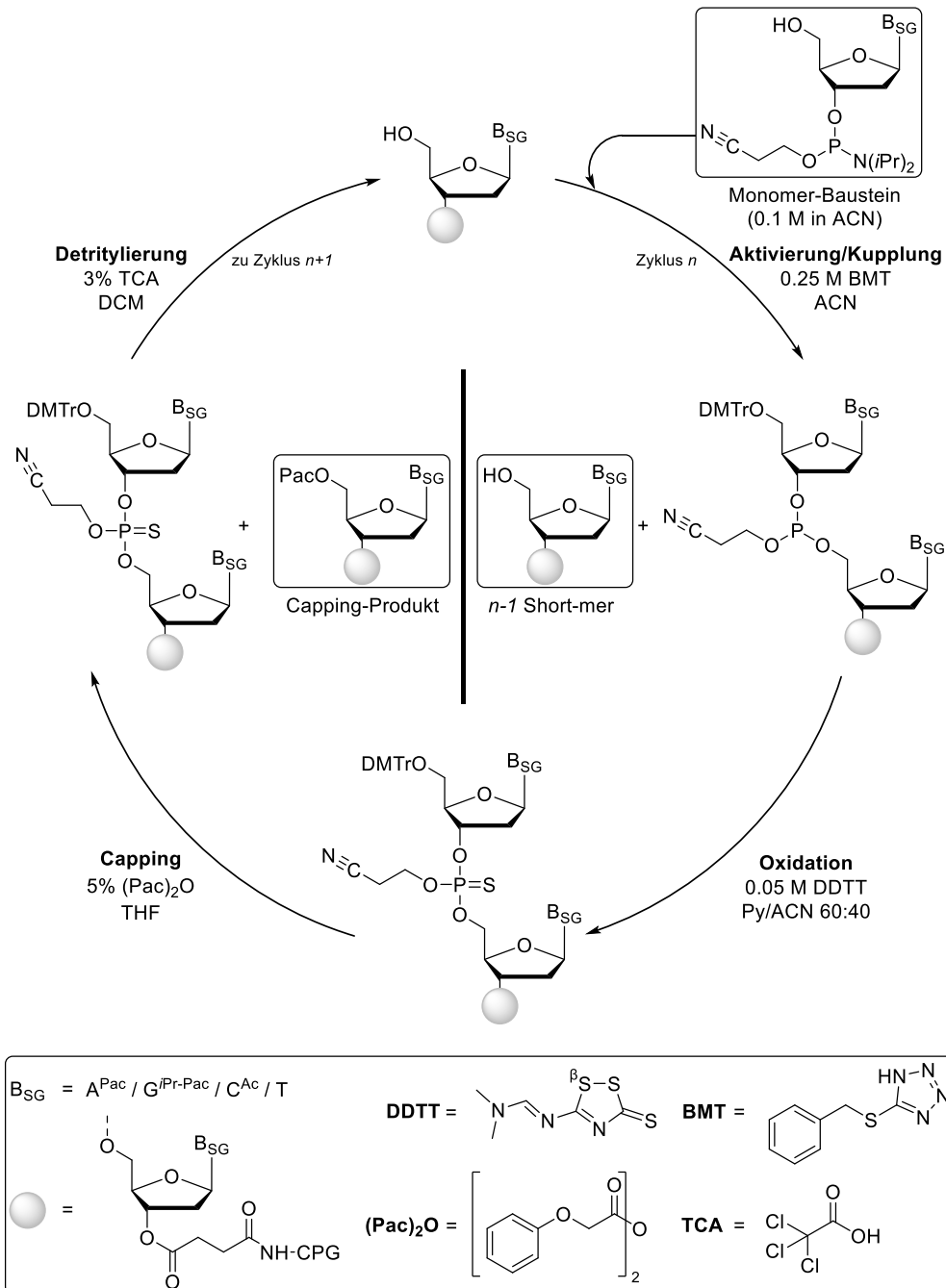


**Abb. 4.17:** Bindungskurven, daraus bestimmte  $EC_{50}$ -Werte und RBAs der Estradiol-abgeleiteten Liganden **52** und **53** (#1-2).

## 4.5 Synthese von 5'-modifizierten Oligonucleotid-Konjugaten

### 4.5.1 Aufbau von Oblimersen durch festphasengestützte Oligonucleotid-Synthese

Sowohl die Oblimersen-Sequenz als auch die Mismatch-Sequenzen wurden vollautomatisiert an einem DNA-Synthesizer mit einer Ansatzgröße von 200 nmol des Startnucleosids in 3' → 5'-Richtung hergestellt (vgl. **Abb. 4.18**).



**Abb. 4.18:** Vierteiliger Syntheseyklus der festphasengestützten ON-Synthese nach der von Beaucage, Matteucci und Caruthers entworfenen Phosphoramidit-Methode.

Hierbei ist es aufgrund des PT-Backbones notwendig, in Abweichung vom klassischen Zyklus bestehend aus Entschützung (1), Aktivierung & Kupplung (2), Capping (3) und Oxidation (4) die letzten beiden Schritte zu tauschen.<sup>[334]</sup> Im ersten Schritt wurde durch Protonierung des Ether-Sauerstoffs mithilfe der TCA-Lösung die 5'-DMTr-Schutzgruppe entfernt und der 5'-Alkohol für die Kupplung mit einem Monomer-Baustein zugänglich gemacht. Der Baustein wurde hierbei mit dem Aktivator im großen Überschuss eingesetzt, was zunächst zur Protonierung der Diisopropylamino-Gruppe des Monomers führt, wodurch diese als gute Abgangsgruppe durch das Tetrazol-Derivat substituiert wird. Das aktivierte Phosphoramidit wird nucleophil durch den 5'-Alkohol der wachsenden Kette angegriffen und somit in die Kette implementiert. Die Oxidation des Phosphit-Triesters (P(III)) zum Phosphorthioat-Triester (P(V)) erfolgt durch nucleophilen Angriff des freien Elektronenpaares des Phosphit-Triesters am  $\beta$ -Schwefelatom der Disulfid-Brücke von DDTT (nicht gezeigt).<sup>[335,336]</sup> Der Fünfring wird hierbei geöffnet und die entstehende Dithiocarbaminsäure (rechter Teil der Brücke) greift nucleophil am Kohlenstoff des Thiazolidinrests (linker Teil der Brücke) unter Eliminierung von Schwefel an.<sup>[334]</sup> Trotz optimierter Synthesizereinstellungen reagierten nicht alle 5'-Alkohole der wachsenden Kette mit dem entsprechenden Monomer-Baustein ab. Ein geringer Anteil (< 1%) an freien Hydroxylgruppen musste zunächst als Ester abgefangen werden, da sonst mit jedem Schritt die um einen Baustein verkürzte ON-Kette (Short-mer) als unerwünschtes Nebenprodukt mitwächst und somit zu Problemen bei der Aufreinigung des Ziel-ON führt. Darüber hinaus werden  $O^6$ -phosphitylierte dG-Bausteine, welche als Nebenprodukte auftreten können, durch Reaktion mit den beim Capping verwendeten Anhydriden gespalten.<sup>[337,338]</sup> Die um einen Baustein verlängerte ON-Kette durchläuft den Zyklus daraufhin so oft, bis die gewünschte Zielsequenz aufgebaut ist. Das Capping erfolgte bei der Synthese von PT-Triestern stets nach der Oxidation (Verschwefelung), da die verwendete Lösung von Phenoxyessigsäureanhydrid in THF (5%) andernfalls zur unerwünschten Bildung von Phosphaten aus den intermediär gebildeten Phosphit-Triestern führt.<sup>[339,340]</sup>

Da ferner alle Konjugate mit einem basenlabilen Cyanin-5-Farbstoff am 5'-Ende terminiert werden sollten, wurden statt der Benzoyl-geschützten Standard-Amidite 2'-Desoxyadenosin (dA<sup>bz</sup>), 2'-Desoxycytosin (dC<sup>bz</sup>) und Isobutyryl-geschütztem 2'-Desoxyguanosin (dG<sup>ib</sup>) die sog. „ultra-mild“-Amidite verwendet. Das exocyclische Amin von dA

trägt hierbei die Phenoxyacetyl-Schutzgruppe ( $dA^{Pac}$ ), das Amin von dG die Isopropylphenoxyacetyl-Schutzgruppe ( $dG^{iPr-Pac}$ ) und statt  $dC^{bz}$  wurde Acetyl-geschütztes 2'-Desoxycytosin ( $dC^{Ac}$ ) gewählt. Sowohl die Pac- als auch die Ac-Schutzgruppe lassen sich unter milderer Bedingungen bei verkürzten Reaktionszeiten abspalten, was für die Integrität des Cy5-Labels von zentraler Bedeutung ist. Eine Zusammenstellung von Entschützungsbedingungen ist in Tabelle 4-2 gegeben, wobei unter Berücksichtigung des Cy5-Labels die Methoden UltraMild-A und -B in Betracht gezogen werden konnten.

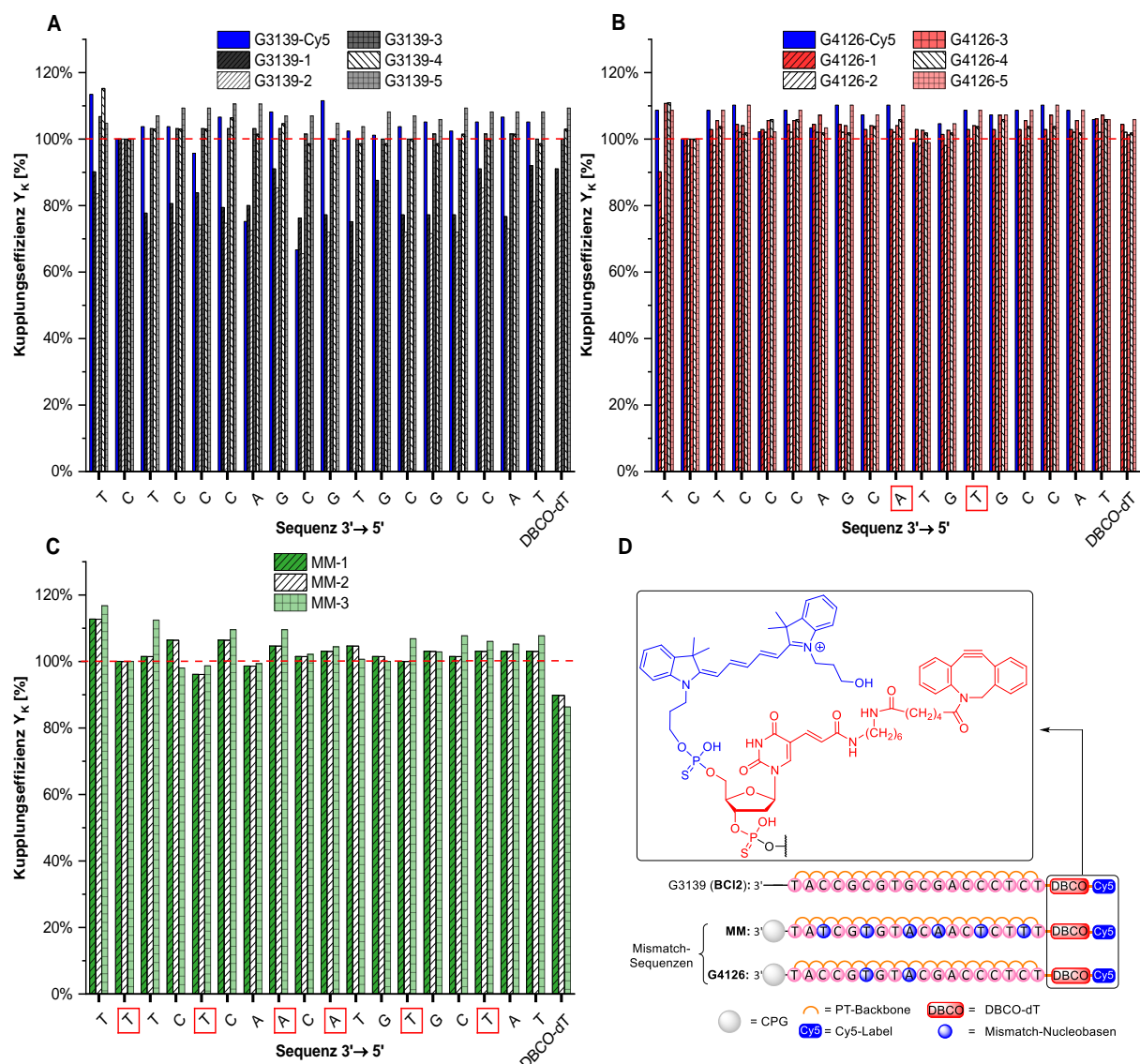
Die Kupplung eines jeden Bausteins wurde UV-Vis-spektroskopisch überwacht und eine step-to-step-Ausbeute konnte für jede Kupplung auf Basis der Transmission des nach jeder Entschützung entstehenden Dimethoxytrityl-Kations bei 498 nm angegeben werden. Als Referenz dient ein im Gerät hinterlegter Kalibrationswert für eine Kupplungseffizienz von 0% (vollständige Transmission). Die Kupplungseffizienz  $Y_K$  ergibt sich gemäß der Gleichung zu

$$Y_K = \frac{\log \frac{V_K}{V_{Cal}}}{\log \frac{V_2}{V_{Cal}}} \cdot 100\%$$

wobei  $V_{Cal}$  der hinterlegte Kalibrationswert für vollständige Transmission (1100) ist.  $V_2$  ist der Transmissionswert des Trityl-Kations nach der ersten Monomer-Kupplung an die Festphase und zeigt typischerweise Werte zwischen 10 und 50. Das Verhältnis der Transmissionswerte  $V_2$  und  $V_{Cal}$  legt die maximal mögliche Ausbeute nach der vollständigen Synthese der Sequenz fest, da alle weiteren Amidite an diesen ersten Baustein angeknüpft werden. Der Wert des Verhältnisses dient also als „100%“-Referenz, wonach der Wert für  $V_2$ -möglichst gering sein sollte. Dies setzt voraus, dass sämtliche Reagenzien unter größter Sorgfalt zum Ausschluss von Luftsauerstoff und Feuchtigkeit am Gerät angeschlossen wurden.  $V_2$ -Werte um den Wert 30 bieten hierbei einen guten Kompromiss zwischen hoher Ausbeute und der Möglichkeit, Probleme während der Kupplung, welche meist auf die Zersetzung der Amidite zurückzuführen sind und einen drastischen Abfall der step-to-step-Ausbeute zur Folge haben, frühzeitig zu detektieren. Bei Werten von  $V_2$  über 60 sollte die Synthese sofort abgebrochen werden. In diesem Fall können nämlich die Transmissionswerte  $V_K$  jeder nachfolgenden Kupplung durchaus Werte von  $Y_K > 100\%$  erzeugen, sofern die Kupplung des nächsten Amidits ( $V_K$ ) im Vergleich zur Kupplung des Ersten ( $V_2$ ) besser funktionierte. Da das

Programm die Werte von  $Y_K$  lediglich bis 100% anzeigt, werden z.B. Kupplungen mit einer step-to-step-Ausbeute von 95% ( $V_K = 55$ ), was nach 20 Kupplungen einer Maximalausbeute von lediglich 36% entspricht, dennoch mit einer Kupplungseffizienz ( $Y_K$ ) von 100% angezeigt. Beträgt der Wert für  $V_2$  hingegen die favorisierte 30, so werden nachfolgende Kupplungen mit einem  $V_K$  von 55 mit einem Wert für  $Y_K$  von 85% ausgegeben und liefern somit einen realistischen Wert für die Kupplungseffizienz, der zum Vergleich mit den vorangegangenen Kupplungsschritten herangezogen werden kann. Alle nachfolgenden Kupplungen ( $V_{K+1}$ ) werden also stets im Verhältnis zur ersten Kupplung ( $V_2$ ) betrachtet und lassen keinen Rückschluss auf die reale Gesamtausbeute, sondern lediglich auf eine Ausbeute im Verhältnis zur ersten Kupplung zu. In Abbildung **Abb. 4.19** sind die step-to-step-Ausbeuten der Oblimersen-Sequenz **(A) (BCI2/G3139)** und der Mismatch-Sequenz **G4126 (B)** für fünf Chargen gezeigt. Von der Mismatch-Sequenz **MM** wurden drei Chargen hergestellt **(C)**. Zudem ist eine schematische Darstellung der Struktur der synthetisierten Sequenzen abgebildet **(D)**. Das Branching-Amidit DBCO-dT wurde hierbei in Abweichung zum Herstellerprotokoll in einer 0.075-molaren Lösung statt einer 0.1-molaren Lösung in DCM/MeCN (3:1) am Synthesizer angeschlossen. Durch die Volumenvergrößerung ist es möglich, drei ON-Ketten an der Festphase zu modifizieren statt der üblicherweise zwei. Analog wurde bei der Herstellung der Lösung des Cy5-Labels verfahren. Aus der Auftragung der Kupplungseffizienz  $Y_K$  gegen die fortlaufend eingebauten Monomerbausteine ist ersichtlich, dass die Amidite der Mismatch-Sequenzen **G4126** und **MM** nahezu quantitativ kuppelten, die step-to-step-Ausbeute lag nach 19 Kupplungen bei 99.8% mit  $V_2$ -Werten zwischen 11 und 27. Die Synthese der **G3139** Sequenzen aus Charge 3-5 zeigten anaolges Verhalten ( $V_2$ -Werte 16, 17 und 32), bei Charge 1 und 2 hingegen mussten trotz Vorliegen niedriger  $V_2$ -Werte (18 bzw. 13) im Verlauf der Synthese Ausbeuteeinbußen durch schadhafte Monomer-Lösungen hingenommen werden. Der Einbruch der step-to-step-Ausbeute ab der vierten Kupplung konnte auf das Ausfallen eines Anteils schadhafter Monomere in der Lösung und der damit einhergehenden verringerten Monomerkonzentration der Lösung zurückgeführt werden. Mit Hinblick auf die biologische Testung wurden je eine Charge **G3139** und **G4126** nur mit dem Cy5-Label modifiziert (**G3139-Cy5** bzw. **G4126-Cy5**), um den Beitrag des Spacers-Apparates in Bezug auf die zelluläre Aufnahme der untransfizierten Konjugate zu ermitteln. Die

Cy5-gelabelte Mismatch-Sequenz **MM** wurde aus Ermangelung an Monomerbausteinen kommerziell bezogen. Aus **Abb. 4.19** ist ferner ersichtlich, dass eine Kupplungseffizienz  $Y_k$  für die Kupplung des Cy5-Amidits nicht abgebildet ist. Der Tritylmonitor ist invariabel auf das Absorptionsmaximum des Dimethoxytrityl-Kations bei 498 nm eingestellt, das Cy5-Amidit wird allerdings nur als MMTr-geschützte Variante kommerziell angeboten. Die Angabe einer Gesamtausbeute nach 20 Kupplungen inklusive der Cy5-Amidit-Kupplung ist daher nicht aussagekräftig und wird daher nicht angegeben.



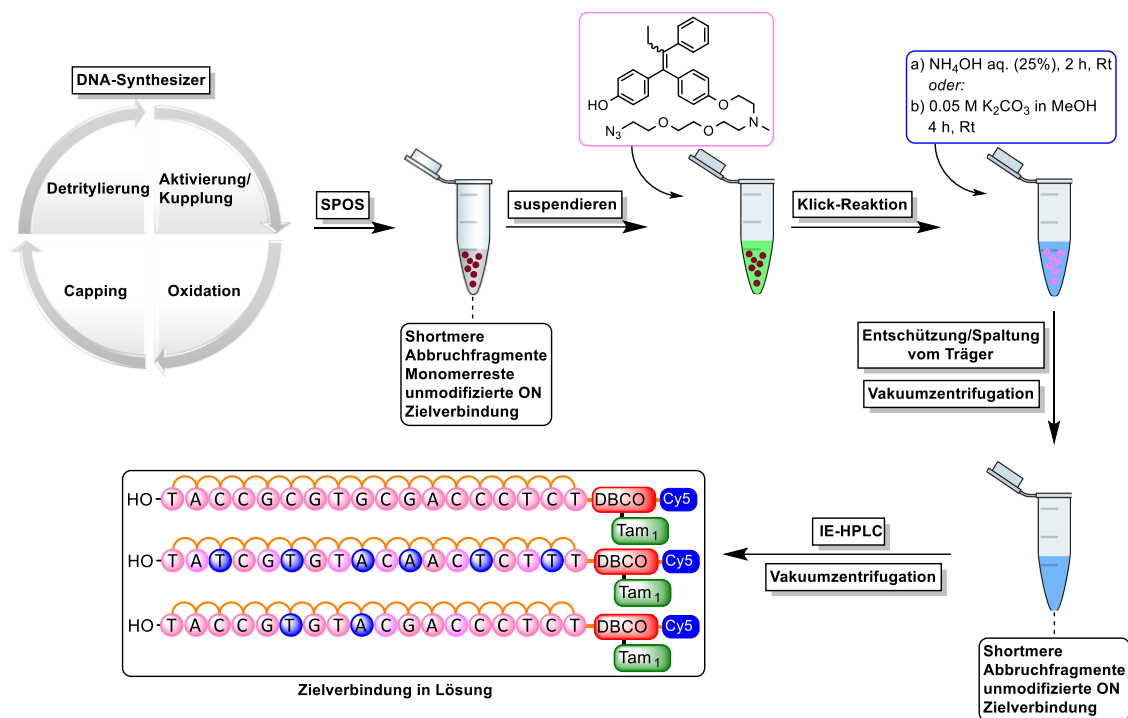
**Abb. 4.19:** Step-to-step-Ausbeuten der ON-Chargen für die **BCI2**-Sequenz (**G3139**) (**A**), die Mismatch-Sequenzen **G4126** (**B**) und **MM** (**C**) sowie die schematischen Strukturen der synthetisierten ONs mit der DBCO-dT Branching-Einheit und Cy5-Fluoreszenzlabel (**D**). Die Mismatch-Nucleobasen in **A-C** sind in roten Kästchen hervorgehoben.

#### 4.5.2 Konjugationen an festphasengebundenen Oligonucleotiden und ihre Isolierung

Zur Anknüpfung an die festphasengebundenen ON-Sequenzen wurden die Liganden **43**, **45**, **52** und **53** ausgewählt. Die SERM-abgeleiteten Liganden **43** und **45** (vgl. **Abb. 4.8**) vertreten hierbei den jeweils besten und einen der weniger guten Binder des Rezeptors in Bezug auf den  $IC_{50}$  Wert. Die Liganden **52** und **53** wurden als Vertreter Estradiol-abgeleiteter Liganden ausgewählt. Mit Blick auf die biologische Testung wurde zudem Spacer **5** als „Dummy-Ligand“ ausgewählt. Das Konjugat aus Spacer **5** und den ON-Sequenzen diente als Kontrolle und soll den Beitrag des Spacer-Apparat auf die zelluläre Aufnahme des untransfizierten Konjugats durch lipophile Effekte von dem Eintrag an Konjugat in die Zelle abgrenzen, welcher durch rezeptorvermittelte Endocytose erfolgt.

Im weiteren Verlauf wurden die festphasengebundenen ONs in einer kupferfreien Klick-Reaktion on-bead mit den Liganden **5**, **43**, **45**, **52** und **53** umgesetzt, wobei die terminale Azid-Funktion der Liganden mit der unter Ringspannung stehenden Dreifachbindung der DBCO-Gruppe unter Bildung einer Triazol-Gruppe reagiert.<sup>[341]</sup> Diese als SPAAC bezeichnete Reaktion birgt den Vorteil, auf zytotoxische<sup>[342,343]</sup> und redoxaktive Kupfersalze<sup>[343,344]</sup> verzichten zu können, wobei nur marginale Einbußen in Bezug auf die Reaktivität<sup>[345]</sup> im Vergleich zur Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC)<sup>[346]</sup> hingenommen werden müssen. Cu(I)-Salze können darüber hinaus zu Strangbrüchen und dem Abbau der DNA-Einzelstränge während der Synthese führen.<sup>[347]</sup> Allerdings verläuft diese Form der Klick-Reaktion unter Bildung der beiden möglichen Regioisomere des Triazols ab.<sup>[348]</sup> Erste Reaktionen hierzu wurden in Anlehnung an eine Arbeit von DELFT und Mitarbeitern durchgeführt.<sup>[349]</sup> Klick-Reaktionen wurden hier an ONs in Lösung über ein neuartiges DBCO-Phosphoramidit realisiert. Eine Lösung der Liganden in DMSO/Wasser-Gemischen im Verhältnis 9:1 bis 1:1 wurde demnach mit dem ON-beladenen CPG-Material auf einem Rüttler bei 37 °C für 24 h inkubiert. Es stellte sich allerdings schnell heraus, dass die Verwendung solcher Gemische für die Konjugationen in Lösung on-bead aufgrund der schlechten Löslichkeit der betreffenden Liganden in DMSO eher unpraktikabel ist.<sup>[350]</sup> DMSO ließ sich zudem trotz mehrfachen Spülens der Festphase nicht vollständig entfernen. Daher wurde ein Ansatz von HEANEY und Mitarbeitern verfolgt, bei welchem Klick-Reaktionen über





**Abb. 4.20:** Workflow zur Synthese entschützter ON-Konjugate ausgehend von festphasengestützter ON-Synthese und anschließender kupferfreier Klick-Reaktion an der Festphase.

monozyklische Cyclooctin-Gruppen an festphasengebundenen ONs in chlorierten Lösungsmitteln in hohen Ausbeuten durchgeführt wurden.<sup>[191]</sup> Hierzu wurden Stammlösungen der Liganden **5**, **43**, **45**, **52** und **53** im Überschuss (20 Äq.) in DCM angesetzt und zusammen mit dem Festphasenmaterial auf einem Rüttler bei 40°C für 24 h inkubiert (vgl. **Abb. 4.20**).

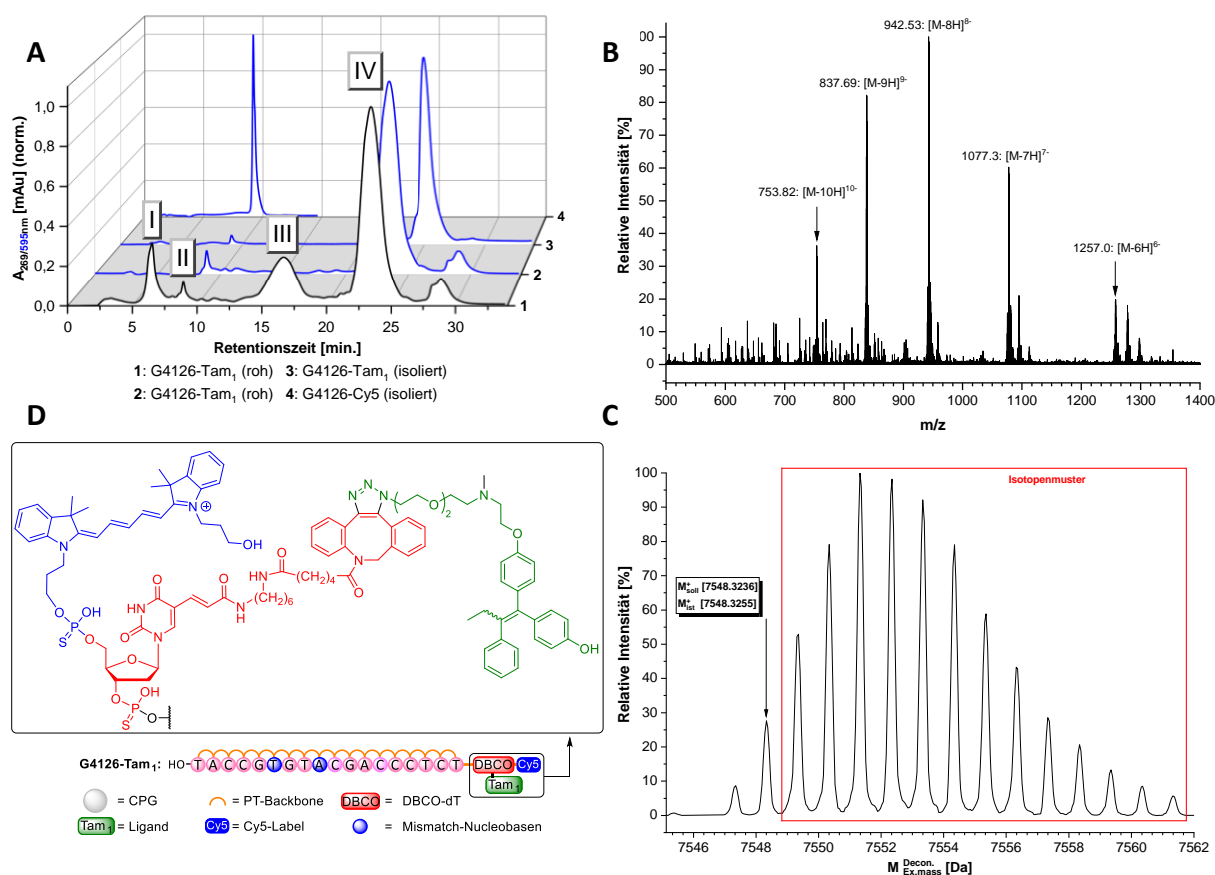
**Tabelle 4-2:** Varianten zur Entschützung der geschwindigkeitsbestimmenden dG-Base.

dG-SG	Klassisch <sup>a</sup>		UltraFAST <sup>b[351]</sup>		UltraMild-A <sup>a[352]</sup>		UltraMild-B <sup>c[352]</sup>		UltraMild-C <sup>d[353]</sup>	
	T [°C]	t [h]	T [°C]	t [min]	T [°C]	t [h]	T [°C]	t [h]	T [°C]	t [h]
	25	36	25	120						
<i>i</i> Bu-dG	55	16	37	30					60	6
	65	8	55	10						
dmf-dG,	25	16								
Ac-dG	55	4	65	5					60	6
	65	2								
<i>i</i> PrPac-dG	25	2			25	2	25	4	60	6
	55	0.5								

<sup>a</sup> 28-33%  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; <sup>b</sup> 28-33%  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{MeNH}_2$  1:1; <sup>c</sup> 0.05 M  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ ; <sup>d</sup> *n*-Butylamin/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:3)

Nach Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das CPG-Material mehrfach mit frischem DCM gewaschen, um Reste der Liganden zu entfernen. Konjugate des Liganden **43** tragen hierbei neben der Bezeichnung der jeweiligen Sequenz das Suffix **Tam<sub>1</sub>**, Konjugate mit **45** das Suffix **Tam<sub>2</sub>**. Konjugate mit den Estradiol-abgeleiteten Liganden tragen im Fall von Ligand **52** das Suffix **E<sub>1</sub>**, Konjugate mit Ligand **53** das Suffix **E<sub>2</sub>** (siehe **Abb. 3.1**). Das getrocknete CPG-Material wurde nach der Methode UltraMild-A (vgl. Tabelle 4-2) mit ammoniak-alkalischer Lösung behandelt, wobei die Basenschutzgruppen, die Cyanoethylschutzgruppen und die Spaltung der ON-Konjugate vom Trägermaterial gleichzeitig erfolgen. Erste Versuche in Eppendorfgläsern waren weniger erfolgreich, da der Ammoniak aus dem Kappenverschluss entwich und die Konzentration der Base somit zu gering war, um die Entschützung vollständig ablaufen zu lassen. Oftmals waren auch die Kappen nicht dicht genug, sodass die Lösung der ONs ebenfalls aus dem Eppendorfglas entwich, was zu drastischen Ausbeuteverlusten führte. Die Reaktion wurde daher in verschraubbaren, opaken Kryo-Vials durchgeführt. Zudem wurde beobachtet, dass bei Reaktionszeiten von mehr als 3 h eine Zersetzung des Cy5-Labels stattfand, was durch eine grüne Trübung der ansonsten tiefblauen Lösung erkennbar war. Nach Zentrifugation werden die gesammelten Überstände zunächst an der Vakuumzentrifuge auf ca. 500 µL eingeeengt, wodurch auch überschüssiger Ammoniak der Lösung weitestgehend entzogen wird. In diesem Schritt ist es zudem obligatorisch, den Überstand mit den gelösten ON-Konjugaten von Resten des CPG-Materials, welche sich am Boden des Eppendorfglases sammelten, zu trennen.

Die Rohlösungen wurden anschließend HPLC-chromatographisch an einem Anionenaustausch-Harz gereinigt. Hierzu wurde das DNAPac™-System mit Vorsäule verwendet, welches die Aufreinigung synthetischer und modifizierter ONs in der Größenordnung analytischer bis zu halbpräparativer Trennungen ermöglicht. Auf die Vorsäule sollte keinesfalls verzichtet werden, da sie dispergiertes, nicht vollständig abgetrenntes CPG-Material abfängt und somit die Trennsäule schützt. Typischerweise wurden zunächst 25 µL der Rohlösung mit 25 µL des Starteluenten vermischt und via Rheodyne injiziert. Wurde das obere Detektorlimit nicht zur Hälfte erreicht, wurden in den darauffolgenden Trennungen 50 µL Rohlösung injiziert. **Abb. 4.21** zeigt exemplarisch das Roh-Elugramm eines solchen Aliquots von Konjugat **G4126-Tam**



**Abb. 4.21:** Elugramme von ON **G4126-Tam<sub>1</sub>** (Rohlösung (1,2) & isoliert (3)) und **G4126-Cy5** (4) bei 260 bzw. 595 nm (blau) (A). Das HRMS-Vollspektrum (B) sowie die hieraus durchgeführte Dekonvolution (C) bestätigen die Bildung des Konjugats aus Mismatch-Sequenz **G4126** mit dem Liganden **43** als Produkt (D).

aufgenommen bei 260 nm (A, 1) und 595 nm (A, 2). Da jedes Konjugat ein Cy5-Label trägt, können potentiell nur die Fraktionen 2 und 4 die Zielverbindung enthalten. Als Nebenprodukt zu Zielverbindung **G4126-Tam<sub>1</sub>** kommt u.A. die Kontrollverbindung **G4126-Cy5** in Frage, welche als Referenz auch kommerziell bezogen wurde und unter gleichen Bedingungen eluiert wurde (A, 4). Eine Coinjektion von **G4126-Cy5** mit einem Aliquot der Rohlösung (nicht gezeigt) zeigte darüber hinaus einen Anstieg der Intensität von Fraktion 2, sodass diese Fraktion dem Nebenprodukt **G4126-Cy5** zugeordnet wurde. Fraktion 4 sollte demnach das gewünschte Zielprodukt **G4126-Tam<sub>1</sub>** sein. DNAPac™-Säulen trennen nicht nur auf Basis von Anionenaustausch und damit in Abhängigkeit von der Anzahl der Ladungen des Analyten, sondern aufgrund der Verankerung der anionenaustauschenden Gruppen über Alkylketten auch auf Basis der Lipophilie des Analyten. Zielverbindung **G4126-Tam<sub>1</sub>** konnte nur in der zuletzt eluierenden Fraktion vorliegen, was mittels HRMS bestätigt wurde (vgl. B und C).

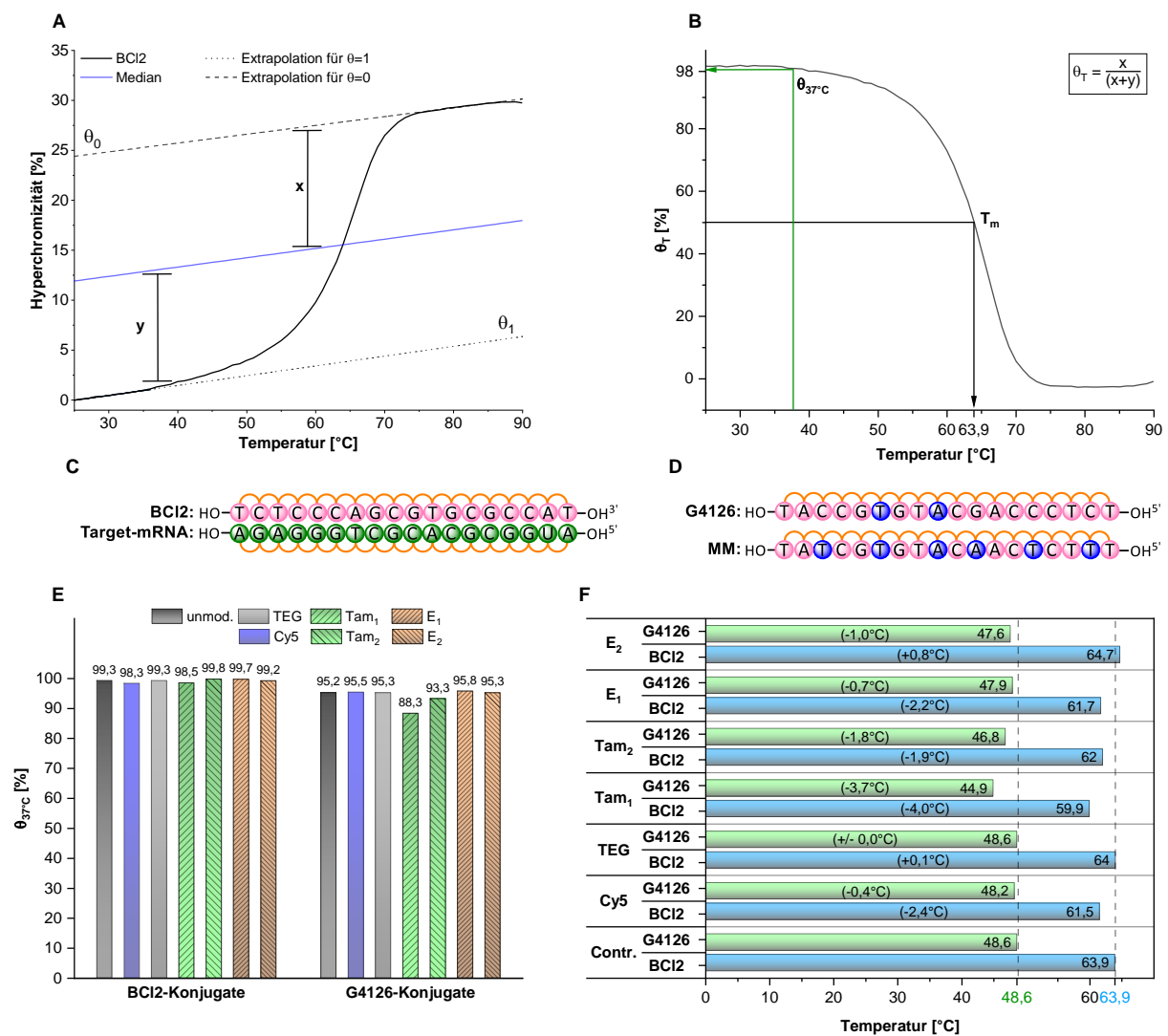
Aufgrund der hohen Retentionszeit und der Breite des Signals war Fraktion 3 mutmaßlich das Konjugat **G4126-Tam<sub>1</sub>** ohne Cy5-Label. Dies konnte massenspektrometrisch allerdings noch nicht nachgewiesen werden. ONs zeigen im Falle der Ionisierung mit einer ESI-Quelle die charakteristische wellenförmige Verteilung der verschiedenen Ladungszustände um eine Peakgruppe (vgl. **B**),<sup>[354,355]</sup> welche wiederum die Isotopenverteilung der makromolekularen Struktur ab dem monoisotopischen Peak abbildet.<sup>[356,357]</sup> In **Abb. 4.21** ist in Panel **C** die Isotopenverteilung nach dem monoisotopischen Peak mit der Masse 7548.3255 des Zielprodukts **G4126-Tam<sub>1</sub>** gezeigt. Zum Vergleich mit der theoretischen, exakten Masse musste für die Dekonvolierung eine zusätzliche Protonenmasse in der Summenformel des Zielprodukts **G4126-Tam<sub>1</sub>** ergänzt werden, um den quarternisierten Stickstoff der 3H-Indol-Gruppe des Cy5-Labels im Negativ-Modus simulieren zu können. Diese Näherung ist für den Vergleich mit der experimentell gefundenen Masse zulässig, führt aber v.a. bei der Dekonvolierung der höheren Natriumadukte zu Abweichungen bis zu 28 ppm. In **Tabelle 4-3** sind die theoretischen und experimentellen monoisotopischen Massen neben den Ausbeuten angegeben, zudem sind die Schmelzpunkte mit der komplementären Target-mRNA sowie die freien Reaktionsenthalpien der Duplex-Bildung angegeben. Die Bestimmung dieser Werte sowie ihre Interpretation werden im nächsten Kapitel diskutiert.

#### 4.5.3 mRNA-Belegungsgrad und Van't Hoff-Analyse von Heteroduplices mit ON-Konjugaten

Die biologische Wirkung von ON-Therapeutika basiert im wesentlichen auf der Bindung mit dem entsprechenden, komplementären Gegenstück, der mRNA. Die Ausbildung der Heteroduplex im Fall von ASOs führt hierbei entweder zur Inhibierung der ribosomalen Translation des schadhaften bzw. überexprimierten Proteins oder zur Aktivierung der RNase H und somit zum aktiven Abbau der Target-mRNA. Die Bestimmung des Schmelzpunkts ( $T_m$ ) dieser Heteroduplex liefert einen ersten Anhaltspunkt, ob eine ausreichende Bindung der Target-mRNA zu erwarten ist. Zudem können hieraus die thermodynamischen Parameter  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  und  $T\Delta S^\circ$  zur Bildung dieser Duplex sowie der Belegungsgrad der mRNA ( $\theta_{37^\circ\text{C}}$ ) bei Körpertemperatur bestimmt werden. In **Abb. 4.22** ist exemplarisch die Schmelzkurve des unmodifizierten ASOs **BC12** mit der komplementären Target-mRNA abgebildet (**A**). Zur Ermittlung des Schmelzpunktes

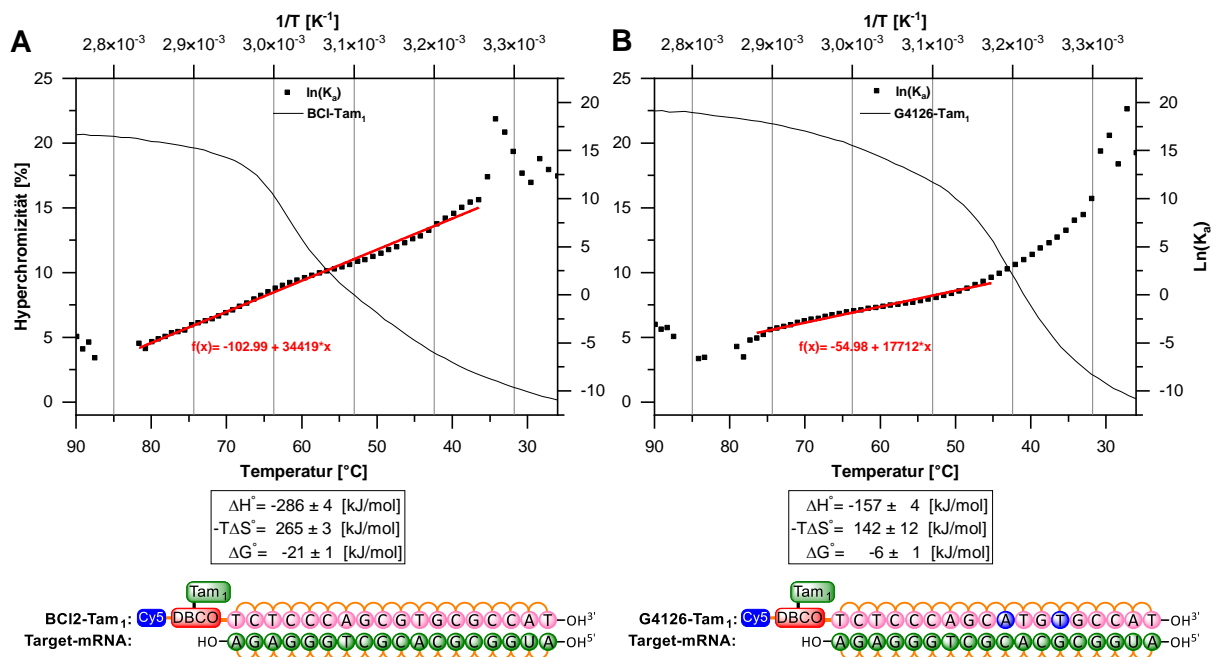
wurde die Methode der Ausgleichsgeraden angewendet und die Plateaus bei hohen bzw. niedrigen Temperaturen mit Ausgleichsgeraden angenähert. Dieses von BRESLAUER und Mitarbeitern<sup>[358]</sup> angewendete Verfahren ermöglicht trotz subjektiver Bestimmung der Messpunkte für den linearen Fit der Geraden eine genauere Bestimmung des  $T_m$  als durch simple Ableitung der Hyperchromizität nach der Temperatur.<sup>[359]</sup> Die Ableitung ist prinzipiell nur für intramolekulare Gleichgewichte eines einzelnen Strangs zulässig und Bedarf im Fall der Ableitung der mRNA-Belegung (folded fraction  $\theta$ ) nach der Temperatur als erste Näherung verschiedener Korrekturfaktoren.<sup>[360]</sup> In **Abb. 4.22** sind die Schmelzpunkte der **BCI2**- und der Mismatch-Konjugate mit der Target-mRNA angegeben (**C**). Sowohl die SERM-abgeleiteten ASO-Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>** ( $\Delta T_m = - 4.0$  °C) und **BCI2-Tam<sub>2</sub>** ( $\Delta T_m = - 1.9$  °C) als auch die Mismatch-Konjugate **G4126-Tam<sub>1</sub>** ( $\Delta T_m = - 3.7$  °C) und **G4126-Tam<sub>2</sub>** ( $\Delta T_m = - 1.8$  °C) zeigten hierbei die größten Abweichungen von den Referenz-Duplices (unmodifizierte ONs **BCI2** ( $T_m = 63.9$  °C) und **G4126** ( $T_m = 48.6$  °C)) mit der Target-mRNA. Das Estradiol-abgeleitete ASO-Konjugat **BCI2-E<sub>1</sub>** ( $\Delta T_m = - 2.2$  °C) und die Mismatch-Konjugate **G4126-E<sub>1</sub>** ( $\Delta T_m = - 0.7$  °C) und **G4126-E<sub>2</sub>** ( $\Delta T_m = - 1.0$  °C) zeigten lediglich marginal niedrigere  $T_m$ -Werte, die Duplices der Konjugate des Dummy-Liganden **BCI2-TEG** ( $\Delta T_m = + 0.1$  °C) und **G4126-TEG** ( $\Delta T_m = \pm 0.0$  °C) zeigen im Rahmen der Messgenauigkeit ein unverändertes Schmelzverhalten. Die Schmelzpunkte der Mismatch-Konjugate aller Liganden zeigten im Mittel eine Differenz von 15.3 °C im Vergleich zum Mittel der ASO-Konjugate und lagen zudem alle über 37 °C. Dies hat für die mRNA-Belegung und damit für eine potentielle biologische Wirkung die Implikation einer unzureichenden Diskriminierung zwischen Positiv- und Negativkontrolle (**D**). Die Mismatch-Konjugate belegen die Target-mRNA im Mittel zu 93.8 %, die ASO-Konjugate im Mittel zu 99.3 %, wodurch im Falle eines ribosomalen Blockings der mRNA-Translation nahezu gleiche Aktivitäten zu erwarten wären. Dies erscheint ungewöhnlich, da die von Genasense entwickelte Mismatch-Sequenz in mehreren Studien erfolgreich als Negativkontrolle herangezogen wurde, so zum Beispiel zu Untersuchungen in leukämischen K562-Zellen<sup>[361]</sup> oder in metastasierten Melanozyten (518A2-Zellen) in Kombination mit Dacarbazin.<sup>[289]</sup> Hierbei konnte neben der apoptotischen Aktivität der **G3139**-Sequenz (61%) allerdings auch eine apoptotische Aktivität von **G4126** (29%) nach Transfektion der ASOs mit Lipofectamin bei einer Konzentration von 100 nM festgestellt werden, welche sich von der

Kontrolle (11%) signifikant unterscheidet.<sup>[233]</sup> Nach drei Tagen waren die von beiden ASOs hervorgerufene Caspase 3-/7-Aktivitäten sogar annähernd gleich. In A375-Zellen hingegen war die apoptotische Aktivität von **G4126** im Vergleich zu **G3139** vernachlässigbar, die Herabsetzung des Bcl2-Protein Levels durch die ASOs konnte hierbei aber nicht bestätigt werden.<sup>[233]</sup> In ER $\alpha$ -positiven MCF7-Brustkrebszellen hingegen korreliert die Gabe der ASOs **G3139** und **G4126** als DODAC/DOPE-Liposomkomplex (800 nm ASO) allerdings sehr wohl mit der apoptotischen Wirkung. Der resultierenden zytotoxische Effekt ist in der Kontrollzelllinie MDA435/LCC6 (9-fach geringeres Expressionslevel von



**Abb. 4.22:** Schmelzkurve der Heteroduplex (C) des ASOs **BCI2** mit komplementärer Target-mRNA (A) und daraus abgeleitete Auftragung der mRNA-Belegung gegen die Temperatur (B). Die Schmelztemperaturen (F) der Heteroduplexes der Mismatch-Konjugate (D) von **G4126** und des ASOs **BCI2** liegen über 37 °C und zeigen im Mittel keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die mRNA-Belegung (E).

BCI2) gleichermaßen ausgeprägt und hebt sich deutlich von **G4126** ab.<sup>[233]</sup> Eine erweiterte Diskussion hierzu erfolgt an anderer Stelle (siehe Kapitel 4.6), da **G4126** auch in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu **G3139** keinen Unterschied in Bezug auf die biologische Wirkung in T47D und MCF7-Zellen zeigte. Aufgrund dieses wechselhaften Verhaltens wurde die Sequenz **G4126** zum Einsatz als Negativkontrolle für ungeeignet befunden und durch die neue Mismatch-Sequenz **MM** ersetzt (**Abb. 4.22 D**), welche zusätzliche Mismatches in Position 3, 12, 15 und 17 entlang 3' → 5' aufweist. Alle **MM**-Konjugate zeigten keinen  $T_m$  mit der Target-mRNA und infolgedessen auch keine mRNA-Belegung. Die alleinige Betrachtung des  $T_m$  als Maß der Duplexstabilität erlaubt allerdings nur eine Aussage darüber, ob zwei Stränge bei physiologischer Temperatur vorzugsweise als Duplex vorliegen oder nicht.<sup>[233]</sup> Ob diese Duplexbildung thermodynamisch bevorzugt ist, kann nur anhand der freien Gibbs-Energie  $\Delta G^\circ$  der Duplexbildung nachvollzogen werden, welche aus der Gleichgewichtskonstante  $K_a$  der Duplexbildung errechnet werden kann und temperaturabhängig ist (siehe Abschnitt 7.1.6.11).<sup>[362]</sup> Die Auftragung dieser aus der mRNA-Belegung  $\theta$  zugänglichen Gleichgewichtskonstanten gegen den inversen Wert der zugehörigen Temperatur in Kelvin zeigt für Verhältnisse von  $\theta$  im Bereich 0.15 - 0.85 lineares Verhalten und erlaubt die Bestimmung der Standardbildungsenthalpie  $\Delta H^\circ$  aus der Steigung und des entropischen Kompensationsfaktors  $T\Delta S^\circ$  aus dem Y-Achsenabschnitt der erhaltenen Geraden.<sup>[363,364]</sup> Dieses Vorgehen ist gültig, solange ein zwei-Zustände-Modell ( $\theta = 1$ : vollständige Duplex und  $\theta = 0$ : vollständig dissoziierte Einzelstränge) und die Unabhängigkeit der thermodynamischen Zustandsgrößen von der Temperatur innerhalb des linearen Bereichs der Van't-Hoff-Auftragung vorausgesetzt werden können. In **Abb. 4.23** sind für das ASO-Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** (**A**) und das entsprechende Mismatch-Konjugat **G4126-Tam<sub>1</sub>** (**B**) die Hyperchromizität und der natürliche Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten  $K_a$  gegen die Temperatur aufgetragen. Bereits bei Vergleich der Steigung der Hyperchromizitätskurven von **BCI2-Tam<sub>1</sub>** und **G4126-Tam<sub>1</sub>** war ersichtlich, dass die Gleichgewichtskonstanten der Mismatch-Duplex stärker temperaturabhängig sind als diejenigen der ASO-Duplex. Dies wirkt sich auf die Steigung der Ausgleichsgeraden aus, anhand welcher der Wert für die Standardbildungsenthalpie  $\Delta H^\circ$  bestimmt wird und die für die Mismatch-Duplex (-157 kJ/mol) im Vergleich zur ASO-Duplex (-286 kJ/mol) um 45% reduziert ist. Bei der



**Abb. 4.23:** Van't Hoff-Graphen der Duplices aus ASO-Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** mit der Target-mRNA (**A**) und aus Mismatch-Konjugat **G4126-Tam<sub>1</sub>** mit der Target-mRNA (**B**). Über die durch Annäherung des linearen Bereichs erhaltenen Ausgleichsgeraden wurden die thermodynamischen Zustandsgrößen ( $\Delta S^{\circ}$ ) und Potentiale ( $\Delta H^{\circ}$  und  $\Delta G^{\circ}$ ) für die Duplices bestimmt (Kästen).

Bildung der Mismatch-Duplex wurde also weniger Wärme freigesetzt, die Bindung der Target-mRNA ist demnach aufgrund des Austauschs von dC durch dT in Position 6 und von dG durch dA in Position 9 erwartungsgemäß schwächer als die des ASO-Konjugats. Die entropische Strafe zur Ausbildung dieser enthalpisch kompromittierten Duplex ( $-142$  kJ/mol) ist im Vergleich zur ASO-Duplex ( $-265$  kJ/mol) unter physiologischen Bedingungen in absoluten Werten um 46% verringert, da die Duplex nicht vollständig unter Wegfall aller notwendigen Freiheitsgrade ausgebildet werden kann. Die entropische Strafe kompensiert daher den enthalpischen Energiegewinn nur marginal schwächer (90%) als bei Ausbildung der ASO-Duplex (93%), was sich final anhand der berechneten freien Reaktionsenthalpien  $\Delta G^{37^{\circ}C}$  unter physiologischen Bedingungen zeigte. Die Bildung der ASO-Duplex (**BCI2-Tam<sub>1</sub>**) ist mit  $\Delta G^{37^{\circ}C} = -21$  kJ/mol nur um 23% weniger exergonisch als die Referenz-Duplex mit unmodifiziertem BCI2-Strang ( $-27$  kJ/mol). Es zeigte sich allerdings auch, dass die freie Energie  $\Delta G^{37^{\circ}C}$  zur Bildung der Mismatch-Duplex (**G4126-Tam<sub>1</sub>**) ( $-6$  kJ/mol) sowie der Referenz-Duplex mit unmodifizierter **G4126** Sequenz ( $-5$  kJ/mol) im Vergleich zur ASO-Duplex zwar um 72% reduziert ist, aber immer noch exergonisch verläuft. Dies ließ sich für alle Mismatch-Konjugat-Duplices finden und zeigt, dass **G4126** aufgrund des exergonischen



(spontanen) Bindungsverhaltens zur Target-mRNA als Negativkontrolle ungeeignet ist (siehe Anhang, 9.4 und 9.5).

**Tabelle 4-3:** Übersicht zu den Ausbeuten,  $T_m$ -Werten, Duplexbelegungsgraden ( $\theta_{37^\circ\text{C}}$ ), massen-spektrometrischen Charakterisierungen und thermodynamischen Parameter von **Tam**- bzw. **E**-Konjugaten im Vergleich mit nicht-konjugierten ONs.

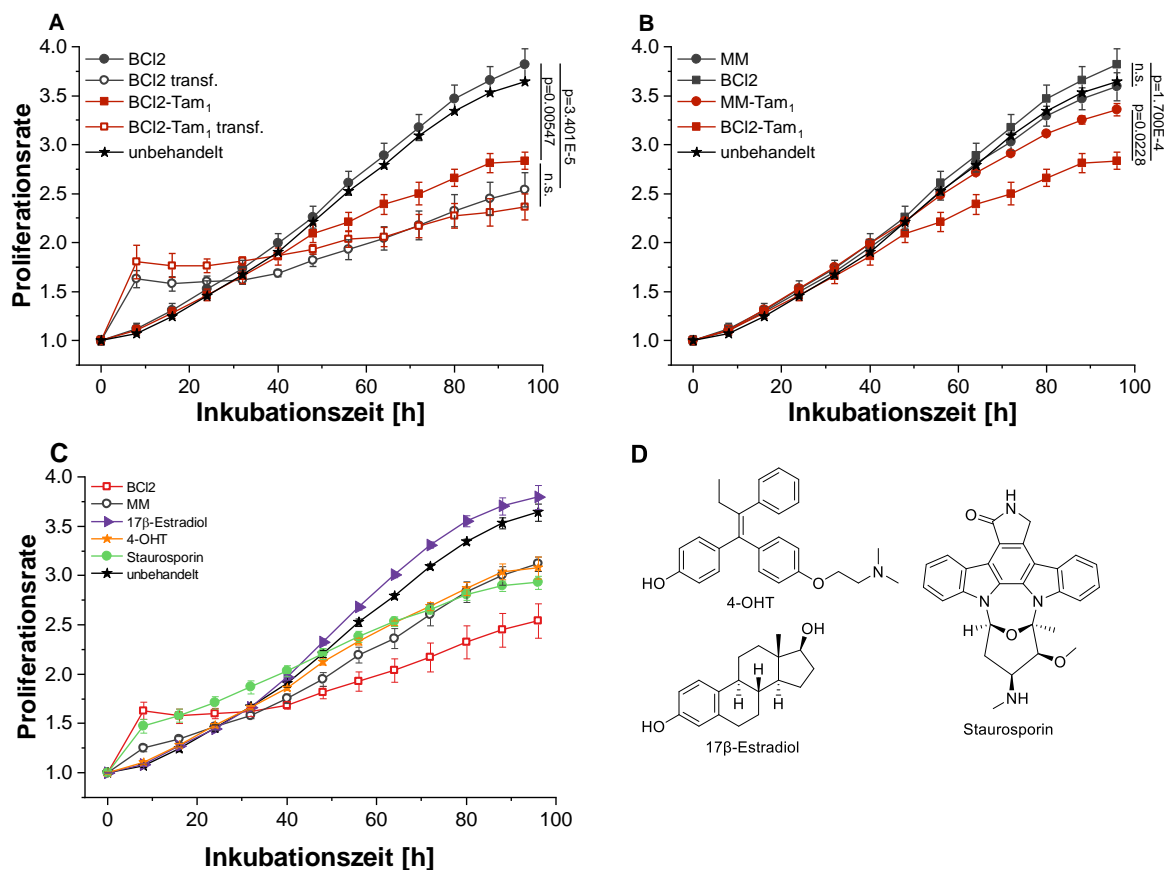
ASO	Ausbeute [%] <sup>[a]</sup>	$T_m$ [°C] <sup>[b]</sup>	$\theta_{37^\circ\text{C}}$ [%] <sup>[c]</sup>	$\Delta G$ [kJ/mol]	$M_{\text{theo.}}/M_{\text{exp.}}$ [Da] <sup>[d]</sup>
<b>BCI2-Cy5</b>	50	64.5	98.3	$-19.7 \pm 0.30$	6229.76/6229.79
<b>MM-Cy5</b>	51				6257.77/6257.79
<b>G4126-Cy5</b>	44	48.2	95.5	$-6.08 \pm 0.25$	6228.77/6228.78
<b>BCI2-TEG</b>	50	64.0	99.3	$-26.4 \pm 0.50$	7208.14/7208.17
<b>MM-TEG</b>	19				7236.14/7236.15
<b>G4126-TEG</b>	20	48.6	95.3	$-7.33 \pm 0.42$	7207.14/7207.14
<b>BCI2-Tam<sub>1</sub></b>	57	59.9	98.5	$-20.5 \pm 0.20$	7549.31/7549.31
<b>MM-Tam<sub>1</sub></b>	25				7577.32/7577.35
<b>G4126-Tam<sub>1</sub></b>	35	44.9	88.3	$-5.46 \pm 0.24$	7548.32/7548.32
<b>BCI2-Tam<sub>2</sub></b>	30	62.0	99.8	$-28.4 \pm 0.20$	7579.29/7579.36
<b>MM-Tam<sub>2</sub></b>	35				7607.30/7607.27
<b>G4126-Tam<sub>2</sub></b>	25	46.8	93.3	$-4.93 \pm 0.23$	7578.29/7578.32
<b>BCI2-E<sub>1</sub></b>	33	64.7	99.7	$-28.1 \pm 0.20$	7448.29/7448.30
<b>MM-E<sub>1</sub></b>	18				7476.30/7476.29
<b>G4126-E<sub>1</sub></b>	18	47.6	95.8	$-5.70 \pm 0.29$	7447.29/7447.31
<b>BCI2-E<sub>2</sub></b>	26	61.7	99.2	$-22.8 \pm 0.20$	7502.30/7502.33
<b>MM-E<sub>2</sub></b>	10				7530.31/7530.33
<b>G4126-E<sub>2</sub></b>	9	47.9	95.3	$-5.13 \pm 0.22$	7501.30/7501.31

[a] Ausbeuten wurden anhand der Lambert-Beer Gleichung mit den wellenlängenspezifischen Extinktionskoeffizienten,  $\epsilon_{\text{BCI2}} = 156000$  [L/(mol·cm)],  $\epsilon_{\text{MM}} = 165600$  [L/(mol·cm)] und  $\epsilon_{\text{G4126}} = 160200$  [L/(mol·cm)] bestimmt. [b] Gemessen in phosphatgepufferter Salzlösung (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 7.4), 10  $\mu\text{M}$  je Strang. [c] Über die Auftragung der „folded fraction  $\theta$ “ gegen die Temperatur in °C bestimmt. [d] Theoretische monoisotopische Masse and experimentelle monoisotopische Masse im Vergleich.

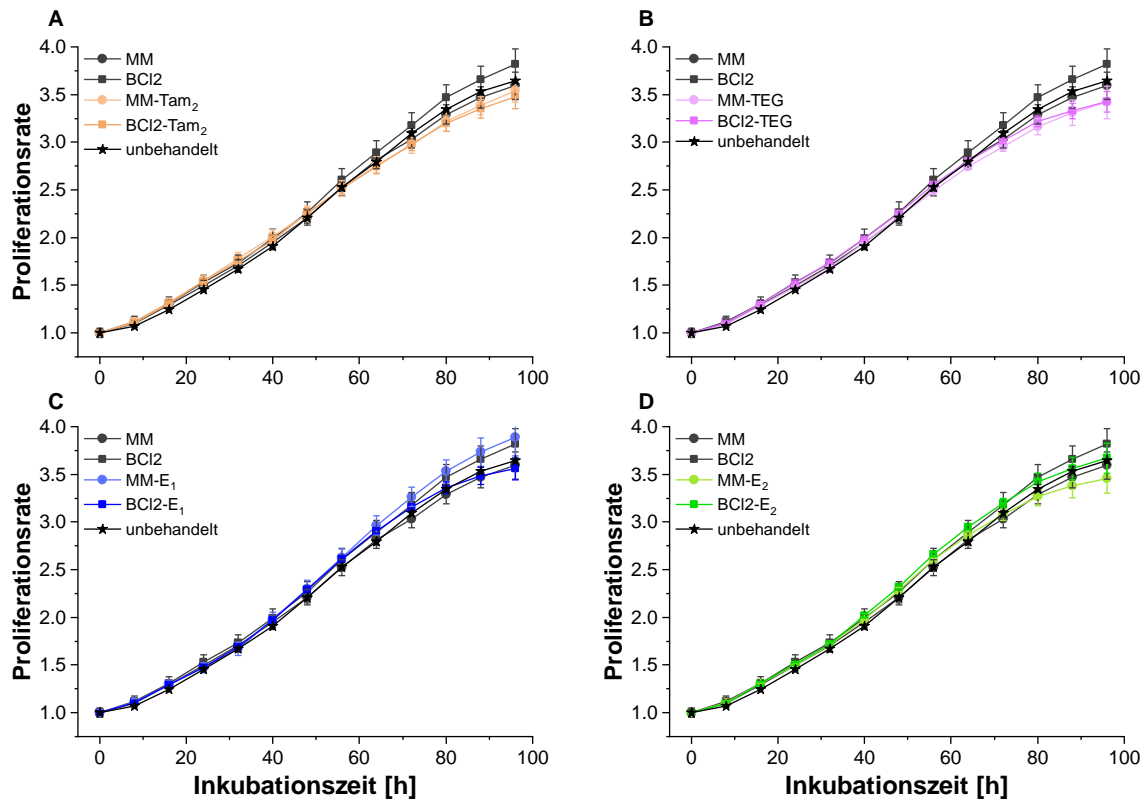
## 4.6 Biologische Evaluierung der ON-Konjugate in ER $\alpha$ -angereicherten T47D- und ER $\alpha$ -defizitären HepG2-Zellen

### 4.6.1 Proliferationsraten und Caspase-Aktivität

Sämtliche in Kapitel 4.6 dargestellten Ergebnisse wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Charlotte Dahlem im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Kiemer erzielt. Sowohl die ASO-Konjugate der Liganden **43** (BCI2-Tam<sub>1</sub>), **45** (BCI2-Tam<sub>2</sub>), **52** (BCI2-E<sub>1</sub>) und **53** (BCI2-E<sub>2</sub>) als auch die Konjugate der Liganden mit der angepassten Mismatch-Sequenz (**MM-Tam<sub>1</sub>**, **MM-Tam<sub>2</sub>**, **MM-E<sub>1</sub>**, und **MM-E<sub>2</sub>**) wurden zunächst auf ihre Hemmwirkung des Zellwachstums (Konfluenz der Zellen) untersucht. Diese gilt als Maß der wiederhergestellten apoptotischen Aktivität in ER $\alpha$ -überexprimierenden T47D-Zellen



**Abb. 4.24:** Proliferationsraten der Brustkrebszelllinie T47D als Maß der apoptotischen Aktivität nach Inkubation in 500 nM Lösung des unmodifizierten ON **BCI2** und des Konjugats **BCI2-Tam<sub>1</sub>** (transfiziert vs untransfiziert) (**A**) und Vergleich der Proliferationsraten mit den Mismatch-Kontrollen **MM** und **MM-Tam<sub>1</sub>** (untransfiziert) (**B**). Die Proliferationsraten in Gegenwart von aktiven Metaboliten 4-OHT und Estradiol sowie des Apoptose-Induktors Staurosporin (**D**) wurden als Positivkontrollen der Liganden neben der unmodifizierten Positiv- (**BCI2**) und Negativ-Kontrollsequenz (**MM**) der Konjugate (transfiziert) bestimmt (**C**).



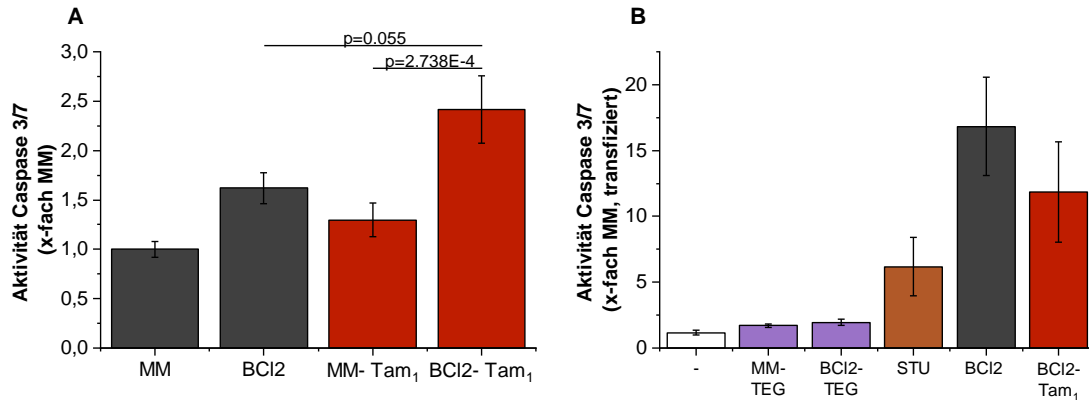
**Abb. 4.25:** Proliferationsraten der Brustkrebszelle T47D als Maß der apoptotischen Aktivität nach Inkubation in 500 nM Lösung der ASO-Konjugate bzw. Mismatch-Konjugate **BCI2/MM-Tam<sub>2</sub>** (A), **BCI2/MM-TEG** (B), **BCI2/MM-E<sub>1</sub>** (C) und **BCI2/MM-E<sub>2</sub>** (D).

in Folge einer verringerten Expression des Bcl-2-Proteins. Es wurden verschiedene Standards unter identischen Bedingungen vermessen. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin (ein Apoptose-Induktor) verwendet.<sup>[200]</sup> 4-Hydroxytamoxifen wurde als Positivkontrolle für die SERM-abgeleiteten Konjugate, Estradiol als Positivkontrolle für die entsprechend abgeleiteten Agonist-Konjugate herangezogen. Estradiol zeigte hierbei nur eine geringe Proliferationssteigerung von 7% nach 72 h, was den literaturbekannten Werten entspricht.<sup>[365]</sup> Staurosporin, 4-OHT<sup>[366]</sup> und die Mismatch-Kontrolle reduzierten in nahezu gleichem Ausmaß die Proliferation moderat um 15%. Alle Kontrollen wurden in einer Konzentration von 500 nM, diejenigen der ONs (**BCI2** und **G4126**) zusätzlich transfiziert eingesetzt. Zunächst wurde überprüft, ob die ASO-Konjugate ohne Zuhilfenahme eines Transfektionsmittels im Vergleich zu dem unmodifizierten ASO **BCI2** Einfluss auf die Proliferationsrate nehmen können (vgl **Abb. 4.24, A**). Erwartungsgemäß änderte sich die Proliferationsrate nach Gabe des unmodifizierten ASO **BCI2** im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht signifikant, das ASO-Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** hingegen hemmte die Proliferation untransfiziert nach 72 h um 21%, nach 96 h um 23%.

Beide ONs wurden daraufhin mit Transfektionsmittel inkubiert und zeigten nach 72 h eine nahezu identische Proliferationshemmung von 32% im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Nach 96 h zeigte das Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** mit 36% eine um 5% verbesserte Hemmung als das unmodifizierte ASO. Das Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** zeigt demnach untransfiziert (21% Proliferationshemmung) unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit eine nur leicht geringere Aktivität als das transfiziert eingesetzte ASO **BCI2** (31% Proliferationshemmung). Anschließend wurde überprüft, ob das untransfizierte Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** im Vergleich zur Mismatch-Kontrolle **MM-Tam<sub>1</sub>** eine signifikante Diskriminierung in Bezug auf die apoptotische Aktivität hervorruft und sich diese im Vergleich zu den unkonjugierten, untransfizierten ONs **BCI2** und **MM** signifikant unterscheidet (vgl. **Abb. 4.24, B**). Letztere zeigten im Vergleich zueinander und zu unbehandelten Zellen erwartungsgemäß keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Proliferation. Das Mismatch-Konjugat **MM-Tam<sub>1</sub>** hemmte die Proliferation hingegen um 6% nach 72 h und zeigt unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit einen statistisch signifikanten Unterschied zu ASO-Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** (21%). Hierbei trägt das Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** gemäß dem Kompetitions-Assay den potentesten, von Endoxifen abgeleiteten Liganden **43** mit tertiärer Amino-Gruppe (RBA = 25%) und zeigte hierbei als einziges der getesteten Konjugate einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation in T47D-Zellen (vgl. **Abb. 4.25**). Ferner wurde überprüft, ob die im Vergleich zum unkonjugierten ASO **BCI2** hervorgerufene Proliferationshemmung des ASO-Konjugats **BCI2-Tam<sub>1</sub>** durch die gezielte Verwendung des SERM-abgeleiteten Liganden **43** hervorgerufen wird. Ein eventueller lipophiler Beitrag zur Proliferationshemmung, welcher durch den umfassenden Spacer-Apparat über passive zelluläre Aufnahme hervorgerufen werden könnte, sollte somit unter Verwendung des Dummy-Konjugats aus Ligand **5** mit dem ASO **BCI2** abgeschätzt werden (vgl. **Abb. 4.25, D**). Die entsprechenden Konjugate **BCI2-TEG** und **MM-TEG** zeigten hierbei eine dem Mismatch-Konjugat **MM-Tam<sub>1</sub>** analoge, nicht signifikante Proliferationshemmung (5% bzw. 7%). Hieraus wurde geschlossen, dass keine Beteiligung des Spacer-Apparates an der apoptotischen Aktivität durch lipophile Beiträge des Konjugats **BCI2-Tam<sub>1</sub>** im Vergleich zu unmodifiziertem **BCI2** vorliegt. Unglücklicherweise zeigte das zweite, SERM-abgeleitete Konjugat **BCI2-Tam<sub>2</sub>** mit einer Proliferationshemmung von lediglich 6% keinen signifikanten Einfluss. Letzteres unterschied sich auch nicht von der Aktivität, welche durch das korrespondierende Mismatch-Konjugat

hervorgerufen wurde (7%). Analoges Verhalten wurde zudem für die Estradiol-abgeleiteten Konjugate **BCI2-E<sub>1</sub>** (1%) und **BCI2-E<sub>2</sub>** (0%) festgestellt. Es konnte auch keine Diskriminierung zu den entsprechenden Mismatch-Konjugaten (0% bzw. 3%) gezeigt werden (vgl. **Abb. 4.25**). Dieses Verhalten erscheint für Konjugat **BCI2-Tam<sub>2</sub>** überraschend, da die RBA des Liganden **45** zwar um den Faktor 3.5 (7.1%) im Vergleich zum Liganden **43** (25%) reduziert ist, der EC<sub>50</sub>-Wert aber immer noch im nM-Bereich liegt. Zudem handelt es sich bei beiden Liganden um SERM-abgeleitete Derivate. Die niedrigen RBA-Werte der Estradiol-Liganden **52** (0.6%) und **53** (1.3%) bieten zwar einen Erklärungsansatz für das Ausbleiben einer biologischen Aktivität in Folge einer geringen Affinität der Konjugate zu ER $\alpha$ , letztlich ist eine hohe Bindungsaffinität allein aber nicht ausschlaggebend für das Auftreten (anti-)estrogener Effekte, welche zur rezeptorvermittelten Aufnahme eines Binders führen.<sup>[330,331]</sup> Weitaus wichtiger in diesem Zusammenhang ist die Betrachtung des endosomalen Transports von therapeutischen ONs, besonders nach erfolgter Rezeptorbindung.<sup>[68,367,368]</sup> Der in Kapitel 2.5 dargestellte Sachverhalt sollte allerdings für alle Konjugate gleichermaßen gelten. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass z.B. Konjugat **BCI2-Tam<sub>2</sub>** lediglich aufgrund eines strukturellen Unterschieds in der Anbindung des TEG-Spacers stärker in den Endosomen zurückgehalten wurde als Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>**. Eine weiterführende Erklärung für das Verhalten der ASO-Konjugate **BCI2-Tam<sub>2</sub>**, **BCI2-E<sub>1</sub>**, **BCI2-E<sub>2</sub>** sowie ihrer Mismatch-Analoga konnte bisher nicht gefunden werden. Einen genaueren Einblick in die Ursache der Proliferationshemmung im Fall des Bcl-2-Targetings in Brustkrebszellen bietet hingegen die Betrachtung der Caspasen-Aktivität der behandelten Zellen.<sup>[231]</sup> Das Absinken des zellulären Bcl-2-Gehalts führt zur Destabilisierung der Mitochondrienmembran und in der Folge zur Cytochrom C-Ausschüttung.<sup>[201]</sup> Hierbei werden die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiviert,<sup>[199]</sup> wodurch der intrinsische Pathway der Apoptose in den Karzinomzellen hochreguliert wird.<sup>[204]</sup> Die Caspasen wiederum schneiden die für sie spezifische DEVD-Peptidsequenz (Asp-Glu-Val-Asp), wodurch ein entsprechend konjugierter, DANN-bindender Fluorophor freigesetzt wird, dessen Emission zur Quantifizierung herangezogen wurde (**Abb. 4.26**).

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde für das untransfiziert eingesetzte Mismatch-ON (**MM**) eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 4.2 festgestellt, für das ASO eine Steigerung um den Faktor 7 (**A**). Im Vergleich zu den Werten der



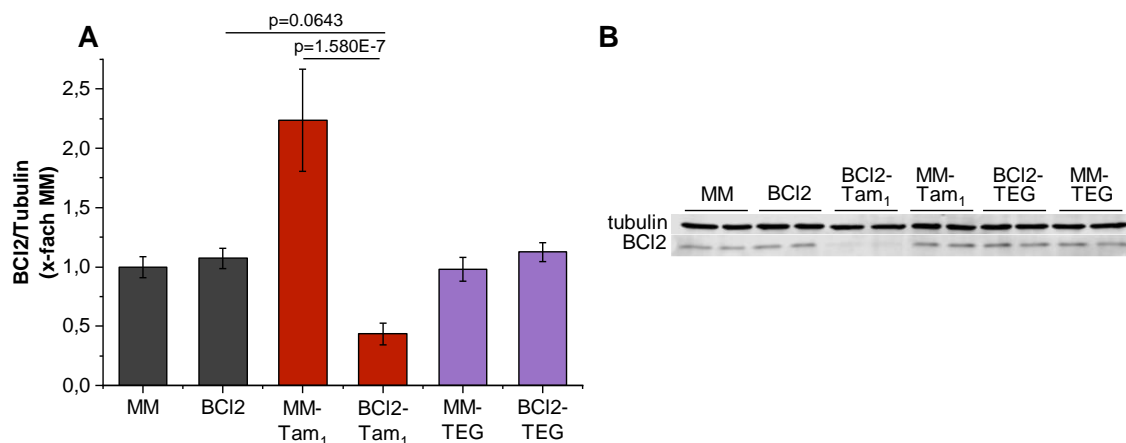
**Abb. 4.26:** Aktivität der Caspasen 3/7 nach Behandlung mit untransfiziert eingesetzten Konjugaten **BC12-Tam<sub>1</sub>** und **MM-Tam<sub>1</sub>** und unkonjugierten ONs nach 72 h (A). Die Caspase 3/7-Aktivität der transfiziert eingesetzten Leitsubstanz **BC12-Tam<sub>1</sub>** wurde mit unkonjugiertem ASO und den Dummy-Konjugaten neben unbehandelten Zellen als Kontrolle verglichen (B).

Proliferationshemmung sind dies um zwei Größenordnung verbesserte Effekte; die Proliferationshemmung wird demnach trotz stark gesteigerter Caspasen-Aktivität mutmaßlich durch andere anti-apoptotische Effektoren gehindert.<sup>[369]</sup> Das unmodifizierte ASO **BC12** steigert die Aktivität der Caspasen damit signifikant im Vergleich zu **MM** um den Faktor 1.6 und zeigt damit ein ähnliches Verhältnis im Vergleich zu den Daten der Proliferationshemmung (Faktor 2.1). Die Effekte der Konjugate **MM-Tam<sub>1</sub>** und **BC12-Tam<sub>1</sub>** wurden daher auf die Aktivität des unkonjugierten Mismatch-ON als Negativkontrolle bezogen und zeigten im Vergleich dazu eine Aktivitätssteigerung der Caspasen um 30% bzw. um den Faktor 2.4 (vgl. **Abb. 4.26, A**). Die Konjugate **MM-Tam<sub>1</sub>** und **BC12-Tam<sub>1</sub>** zeigten somit deutlich signifikante Unterschiede zueinander, das ASO-Konjugat zeigte im direkten Vergleich zu unmodifiziertem ASO **BC12** eine Steigerung der Caspasen-Aktivität von 50%. **BC12** und **BC12-Tam<sub>1</sub>** wurden daraufhin auch transfiziert eingesetzt und sowohl mit den Dummy-Konjugaten **MM-TEG** und **BC12-TEG** als auch mit der Positivkontrolle Staurosporin verglichen (**Abb. 4.26, B**). Hierbei zeigte das unkonjugierte ASO (**BC12**) analog zu den Messungen der Proliferationshemmung eine im Vergleich zum Konjugat gesteigerte Caspase-Aktivität von 42%. Das Konjugat **BC12-Tam<sub>1</sub>** selbst zeigte im Vergleich zu dem Dummy-Konjugat **BC12-TEG** eine Aktivitätssteigerung der Caspasen um den Faktor 6.2, die Dummy-Konjugate zeigten untereinander und sowohl im Vergleich zur Negativkontrolle **MM** (nicht gezeigt) als auch zu unbehandelten Zellen keinen signifikanten Unterschied in der Aktivitätssteigerung. Auch die zusätzlichen Kontrollen Estradiol und 4-Hydroxytamoxifen zeigten im Vergleich zu

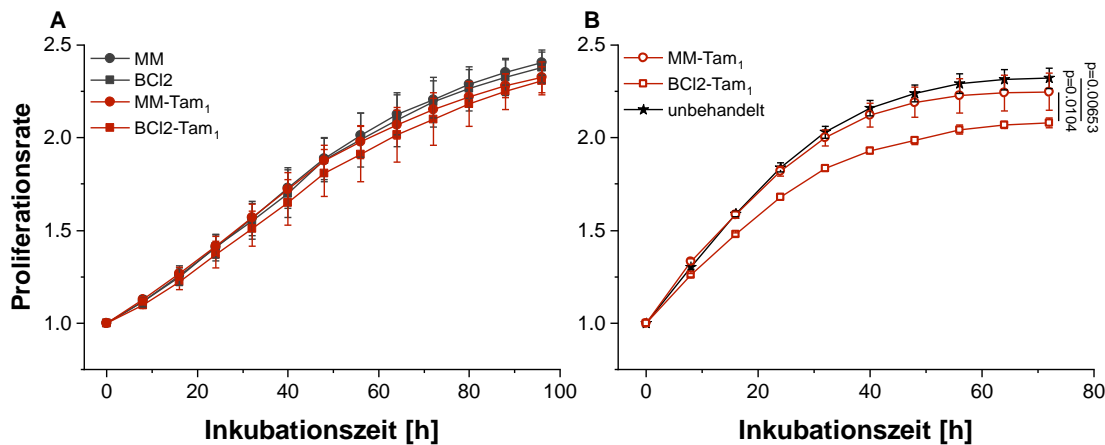
unbehandelten Zellen keinen signifikanten Unterschied in der Caspasen-Aktivität (nicht gezeigt). Hiermit konnte ein weiteres Mal gezeigt werden, dass der Spacer-Apparat aufgrund seiner Lipophilie keinen Beitrag zur Caspase-Aktivität lieferte und die Aktivität des Konjugats **BCI2-Tam<sub>1</sub>** auf den selektiven Gebrauch des kovalent angebondenen Antiestrogens 4-Hydroxytamoxifen als Targeting-Einheit zurückzuführen war.

#### 4.6.2 Western-Blot Analyse-Analyse

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass das ASO-Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** einen Einfluss auf das Zellwachstum über die Aktivierung der Caspasen 3/7 nimmt, wurde anhand einer Western-Blot-Analyse der Bcl-2-Gehalt der behandelten T47D-Zellen bestimmt. Die durch **BCI2-Tam<sub>1</sub>** hervorgerufene Proliferationshemmung infolge der Aktivierung der Caspasen 3/7 sollte so mit der Hemmung der hierfür codierenden Target-mRNA korreliert werden. Gleichzeitig wurden auch die Bcl-2-Gehalte der mit dem Mismatch-Konjugat **MM-Tam<sub>1</sub>** und mit den Dummy-Konjugaten **BCI2-TEG** und **MM-TEG** behandelten Zellen bestimmt (**Abb. 4.27, B**). Das ASO-Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** zeigte hierbei im Vergleich zu den mit unmodifiziertem ASO **BCI2** behandelten Zellen einen um 60% reduzierten Proteingehalt und damit einen deutlichen Unterschied zum Mismatch-Konjugat **MM-Tam<sub>1</sub>**, welches eine Verdopplung des Bcl-2-Proteinlevels hervorrief. Die Dummy-



**Abb. 4.27:** Bcl-2-Gehalt der mit den Konjugaten **BCI2-Tam<sub>1</sub>** und **MM-Tam<sub>1</sub>** behandelten T47D-Zellen (untransfiziert) im Vergleich zu unkonjugierten ONs und Dummy-Konjugaten **BCI2-TEG** und **MM-TEG** nach 72 h (**A**). Tubulin wurde als interner Standard verwendet. Visuell ist die Herunterregulierung des Bcl-2-Gehalts im Vergleich zu den Kontrollen im Western-Blot erkennbar (**B**).



**Abb. 4.28:** Vergleich der Proliferationsraten in HepG2 Zellen als Maß der biologischen Aktivität nach Inkubation in 500 nM Lösung der unmodifizierten ONs **BCI2** und **MM** und der Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>** und **MM-Tam<sub>1</sub>** untransfiziert (**A**) und transfiziert (**B**).

Konjugate zeigten wie die unmodifizierten ONs keine signifikante Absenkung der Proteingehalte (**B**). Die Werte sind auf die unmodifizierte Mismatch-Sequenz **MM** normiert. Zuletzt wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen dem in T47D-Zellen überexprimiert vorliegenden ER $\alpha$  und dem durch das ASO-Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** hervorgerufenen Abfall des Bcl-2-Gehalts besteht. Die Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>** und **MM-Tam<sub>1</sub>** wurden daher an ER $\alpha$ -defizitären HepG2-Zellen zunächst untransfiziert getestet und mit den unmodifizierten ONs **BCI2** und **MM** verglichen.<sup>[370]</sup> Die Abwesenheit von ER $\alpha$  verursacht erwartungsgemäß keine signifikant veränderten Proliferationsraten durch Behandlung mit den ONs untereinander und auch nicht im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**Abb. 4.28, A**). Die Verwendung eines Transfektionsmittels führte hingegen zu einer Proliferationshemmung durch das ASO-Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** im Vergleich zu unbehandelten Zellen von 11%. Damit ist im Vergleich zu T47D-Zellen einer Halbierung der antiproliferativen Aktivität festzustellen (vgl. **Abb. 4.24**). Allerdings unterscheiden sich das duktales Karzinom an Epithelzellen des Brustgewebes (T47D) auch deutlich von den Epithel-ähnlichen Karzinomen der Leber (HepG2), v.a. in Bezug auf den Grundspiel von Bcl-2 und anderer, pro- und anti-apoptotisch wirksamer Signalwege.<sup>[371]</sup> Betrachtet man die Ergebnisse zu Zellproliferation, der Caspasen-Aktivität, der Gehaltsbestimmung des Bcl-2 Proteins und der Kontrollmessungen in einer ER $\alpha$ -defizitären Zelllinie zusammen, lässt sich eine darauf aufbauende und fortführende Arbeitshypothese formulieren:

Die in Bezug auf die Apoptose signifikant gesteigerte Aktivität des in ER $\alpha$ -

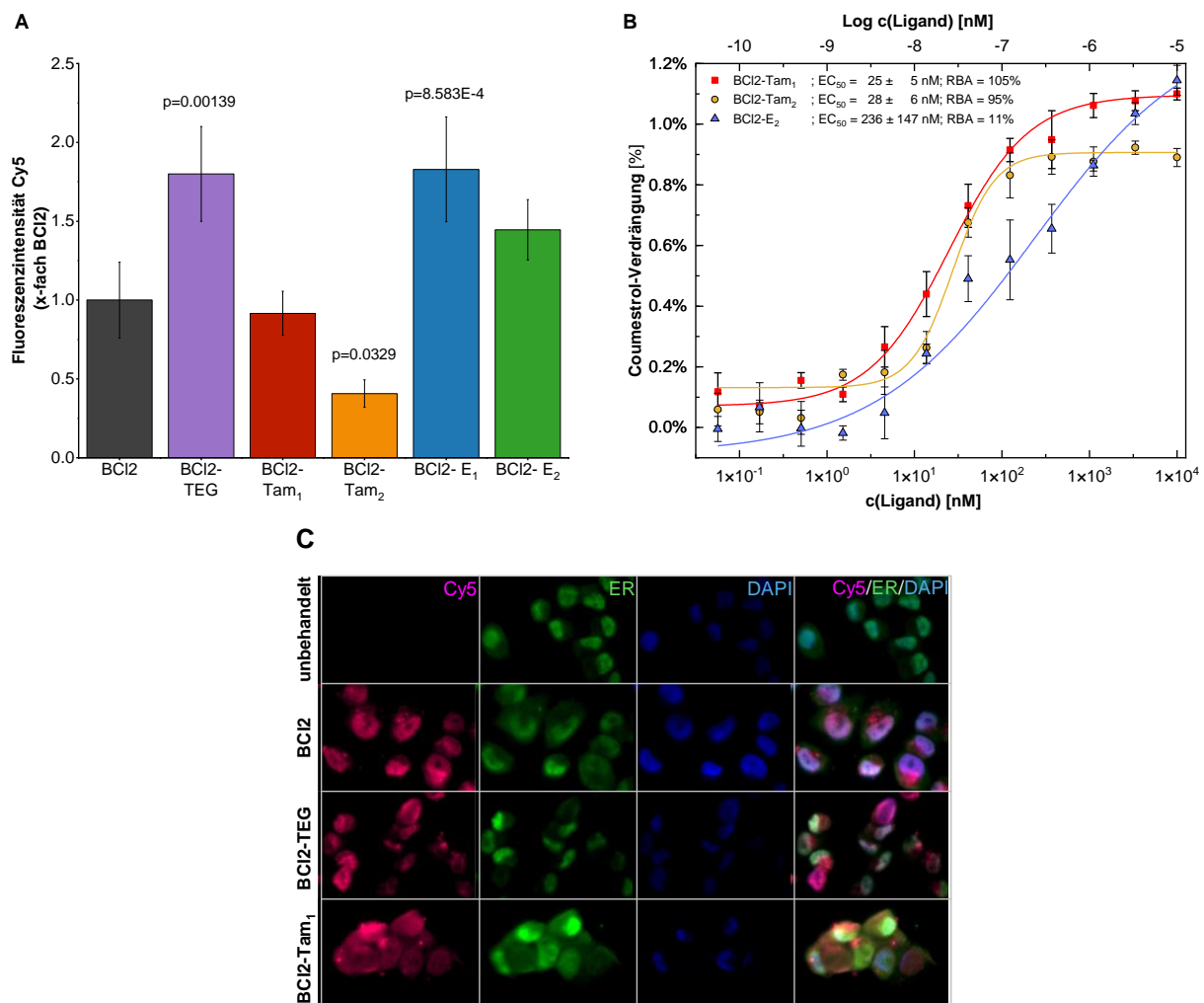


überexprimierenden T47D-Zellen untransfiziert eingesetzten ASO-Konjugats **BCI2-Tam<sub>1</sub>** wird durch eine aktive, Rezeptor-vermittelte Endozytose hervorgerufen.

#### 4.6.3 Untersuchungen zur Zellaufnahme der ON-Konjugate

Um die gesamte Arbeitshypothese zu überprüfen, wurden erste Zellaufnahmestudien durch automatisierte Fluoreszenzmikroskopie mithilfe des in den ASO-Konjugaten angebrachten Cy5-Labels durchgeführt und die Fluoreszenzsignale 24 h nach Behandlung der Zellen quantifiziert (**Abb. 4.29**). Zunächst wurde die Fluoreszenzintensität des Cy5-Labels bei 670 nm quantifiziert und die daraus bestimmten Werte für die Zellaufnahme der ASO-Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>**, **BCI2-Tam<sub>2</sub>**, **BCI2-E<sub>1</sub>** und **BCI2-E<sub>2</sub>** mit der Dummy-Kontrolle **BCI2-TEG** und dem unmodifizierten ASO **BCI2** verglichen (**A**). Die Konjugate wurden hierbei auf den Wert des unmodifizierten ASO **BCI2** normiert. Die mit Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** behandelten Zellen zeigten im Vergleich zu mit unmodifiziertem ASO **BCI2** behandelten Zellen überraschend keine signifikant gesteigerte Aufnahme. Die Internalisierung des Dummy-Konjugats **BCI2-TEG** dagegen ist im direkten Vergleich zu **BCI2-Tam<sub>1</sub>** sogar um 80% erhöht, gleiches gilt für die Konjugate **BCI2-E<sub>1</sub>** (82%) und **BCI2-E<sub>2</sub>** (45%). Konjugat **BCI2-Tam<sub>2</sub>** wurde verglichen mit unmodifiziertem ASO **BCI2** von den Zellen um 60% verringert aufgenommen. Die stärker aufgenommenen ASO-Konjugate **BCI2-E<sub>1</sub>** und **BCI2-E<sub>2</sub>** trugen den endogenen Agonisten Estradiol als Targeting-Liganden, zeigten allerdings trotz relativ niedriger RBA-Werte der Liganden **52** (0.6%) und **53** (1.3%) im Vergleich zu unkonjugiertem ASO **BCI2** keine biologische Wirkung in Bezug auf eine gesteigerte Apoptoseinduktion. Konjugat **BCI2-Tam<sub>2</sub>**, welches analog zum apoptotisch aktiven Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** den SERM 4-Hydroxytamoxifen als grundlegende Targeting-Einheit trug, zeigte trotz eines relativ hohen RBA-Wertes des entsprechenden Liganden **45** (7.1%) im Vergleich zum Liganden **43** (25%) in **BCI2-Tam<sub>1</sub>** keine Induktion von Apoptose und eine verringerte Internalisierung. Es erschien daher angebracht, die Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>** und **BCI2-Tam<sub>2</sub>** auf ihr Wettbewerbsverhalten an ER $\alpha$  zu untersuchen. Somit sollte eruiert werden, ob eventuell eine verringerte Affinität des Targeting-Liganden **43** im Konjugat **BCI-Tam<sub>1</sub>** vorliegt, welche ausschlaggebend für die verringerte Internalisierung von **BCI-Tam<sub>1</sub>** und **BCI2-Tam<sub>2</sub>** und damit für das Ausbleiben einer Apoptoseinduktion sein könnte (vgl. **Abb. 4.29, B**). Es stellte sich allerdings heraus, dass die ASO-Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>** (x 4.2), **BCI2-Tam<sub>2</sub>** (x 13.4) und **BCI2-E<sub>2</sub>** (x 8.5) wesentlich höhere Affinitäten zu ER $\alpha$  aufweisen als die entsprechend unkonjugierten

Liganden. Eine Bindungskurve des Konjugats **BCI2-E<sub>1</sub>** konnte aufgrund seiner sehr schlechten Affinität nicht aufgenommen werden. Einen möglichen Erklärungsansatz bietet die Betrachtung des raumeinnehmenden, kovalent angebindenen ASOs. Die Positionierung der Struktur vor dem Eingang der LBD bei Bindung des konjugierten Liganden verhindert möglicherweise die kompetitive Verdrängung des gebundenen



**Abb. 4.29:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von T47D-Zellen nach Gabe der ASO-Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>**, **BCI2-TEG** und **BCI2** 24 h nach Behandlung der Zellen. Die Fluoreszenzintensität der ASO-Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>** und **BCI2-TEG** wurde auf den Wert des unmodifizierten ASO **BCI2** normalisiert (**A**). Verdrängungskurven des Kompetitions-Assays an ER $\alpha$  mit den ASO-Konjugaten **BCI2-Tam<sub>1</sub>**, **BCI2-Tam<sub>2</sub>** und **BCI2-E<sub>2</sub>** sind mit ihren EC<sub>50</sub>-Werten (in nM) und RBAs (in %) gezeigt (**B**). Repräsentative Aufnahme der Zellen nach Gabe von **BCI2-TEG** im Vergleich zu **BCI2** mit Cy5-Label zur Detektion der markierten ONs (**C**). Die zelluläre Verteilung der Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>** und **BCI2-TEG** im Vergleich zu **BCI2** wurde durch zusätzliches Anfärben der Zellkerne bzw. der Konjugate mit DAPI und ER $\alpha$  mit monoklonalem Antikörper (markiert mit AlexaFluor488) visualisiert.

Liganden durch Coumestrol. Zusätzliche Stabilisierung der Konformation könnte durch hydrophobe Wechselwirkung des PT-Backbones mit der Proteinoberfläche erreicht werden, welche für PT-modifizierte ASOs für eine Vielzahl an Proteinen bereits nachgewiesen werden konnte.<sup>[27]</sup> Für die SERM-abgeleiteten Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>** (105%) und **BCI2-Tam<sub>2</sub>** (95%) konnte eine im Rahmen der Messgenauigkeit nahezu gleich hohe RBA zu ER $\alpha$  gefunden werden, wobei lediglich Ersteres auch einen biologischen Effekt zeigte. Konjugat **BCI2-E<sub>2</sub>** zeigte ebenfalls eine hohe Affinität zum Rezeptor (11%), induzierte allerdings keine Apoptose. Ein Erklärungsversuch für das Ausbleiben der Apoptose-Induktion in T47D-Zellen bei Gabe der ASO-Konjugate **BCI2-Tam<sub>2</sub>**, **BCI2-E<sub>2</sub>** und **BCI2-E<sub>2</sub>** ist demnach nicht auf Basis einer zu geringen Bindung der Konjugate an ER $\alpha$  über ihre Targeting-Einheit möglich und scheint einem komplexeren Zusammenhang zu unterliegen. Die Betrachtung der zellulären Signaltransduktionskaskade nach erfolgter Bindung eines Rezeptorliganden bietet einen anderen Ansatzpunkt zur Klärung dieser widersprüchlichen Beobachtungen. Bisher ist bekannt, dass die Signalweitergabe und damit auch die Internalisierung von ER $\alpha$  nach Bindung von Estradiol-gebundenen, makromolekularen Strukturen von der GTPase Dynamin II abhängig ist und über Caveolae vermittelt wird.<sup>[257,262]</sup> Marczell und Mitarbeiter zeigten, dass die Internalisierung eines E<sub>2</sub>-BSA-Konjugats verhindert wird, sobald die durch Dynamin II eingeleitete Vesikelbildung mit dem nicht-kompetitiven Inhibitor Dynasore unterbunden wird.<sup>[257,372,373]</sup> Durch doppelte Antikörperfärbung konnte hierbei auch gezeigt werden, dass Caveloin-1-beladene Lipid-Rafts die eingeschnürten Rezeptoren stabilisieren und im Transport der Endosomen von der Zellmembran zur Kernmembran maßgeblich beteiligt sind.<sup>[373–375]</sup> Das Zusammenspiel von ER $\alpha$  mit Dynamin II ist somit eine grundlegende Wechselwirkung, welche nach Bindung der ASO-Konjugate konserviert sein muss, um die rezeptorvermittelte Endozytose einleiten zu können. Dieser Punkt wird in **Kapitel 6** ausführlicher aufgegriffen. Ebenfalls von Interesse ist in diesem Zusammenhang die Positionierung der Helix 12 der LBD von ER $\alpha$ .<sup>[249]</sup> Die Repositionierung dieser am Carboxyl-Terminus der LBD befindlichen  $\alpha$ -Helix unterscheidet sich hinsichtlich der Bindung eines Antagonisten signifikant von der bei Bindung eines (partiellen) Agonisten und beeinflusst die Bindung weiterer Cofaktoren sowie assoziierter Proteine.<sup>[333]</sup> Agonisten wie Estradiol stabilisieren hierbei die transkriptionell aktive Konformation, welche die Bindung von Coaktivatoren in einer von Helix 3, Helix 5 und 12

geschaffenen hydrophoben Tasche zulassen.<sup>[376,377]</sup> Helix 12 wird dabei vor dem Eingang der LBD positioniert.<sup>[333,378]</sup> Bei Bindung des Antagonisten 4-OHT hingegen ist ein Verschluss der LBD durch Helix 12 aufgrund der Wechselwirkung der Dimethylamino-gruppe mit Asp-351 nicht möglich, infolgedessen die Ausbildung der hydrophoben Bindungstasche für Coaktivatoren gestört ist.<sup>[253,378]</sup> Ob diese Bindungstasche und damit die ligandspezifische Positionierung von Helix 12 auch für die Aktivierung von Dynamin II notwendig ist, konnte trotz intensiver Literaturrecherche nicht gefunden werden.

Letztlich bot die Feststellung der Co-Lokalisierung von ER $\alpha$  und den ASO-Konjugaten eine zusätzliche Möglichkeit, die rezeptorvermittelte Aufnahme zu untersuchen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von T47D-Zellen 24 h nach der Gabe von **BCI2**, **BCI2-TEG** oder **BCI2-Tam<sub>1</sub>** (untransfiziert) wurden untereinander und im Vergleich mit unbehandelten Zellen ausgewertet (**Abb. 4.29, C**). Hierbei zeigte sich, dass sowohl das unmodifizierte **BCI2** als auch die Konjugate **BCI2-TEG** und **BCI2-Tam<sub>1</sub>** von den Zellen aufgenommen wurden und sich sowohl im Cytosol als auch an der Kernmembran anlagerten. Die ONs wurden hierbei durch die Fluoreszenzemission von Cy5 im Rot-Kanal detektiert und die Zellkerne zusätzlich mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol-(DAPI)-Färbung im Blau-Kanal sichtbar gemacht. Hierdurch konnte festgestellt werden, dass das unmodifizierte ON **BCI2** sich vorzugsweise im Zellkern und an der Kernmembran anreicherte, wohingegen sich das Dummy-Konjugat **BCI2-TEG** gleichmäßig in Cytoplasma und Kern verteilte. Das ASO-Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** zeigte ähnlich wie **BCI2** eine Anreicherung in den Zellkernen, gleichzeitig ist aber auch eine stärkere Fluoreszenz des ER $\alpha$ -Antikörpers an der Kernmembran feststellbar. Der Anteil an Kernmembran-gebundenen ER $\alpha$  ist in Brustkrebszellen stets größer als der Anteil Zellmembrangebundener, wobei die Isoform ER $\alpha$ 66 vorzugsweise an der Kernmembran und die Isoform ER $\alpha$ 36 an der Zellmembran zu finden ist.<sup>[248]</sup> Im Vergleich zu mit **BCI2** bzw. **BCI2-TEG** behandelten Zellen ist bei **BCI2-Tam<sub>1</sub>**-behandelten Zellen allerdings eine stärkere Fluoreszenz in den Kernen zu beobachten. Dies ist auch im Vergleich mit unbehandelten Zellen deutlich erkennbar. Eine Erklärung für dieses Phänomen bietet die Betrachtung des Rezeptor-Shuttling von zellmembranständigen ER $\alpha$ . Nach Bindung eines Liganden in der LBD erfolgt die Einschnürung des Rezeptors an der Zellmembran zu einem Vesikel, welches zur Kernmembran transportiert wird. Dort initiiert ER $\alpha$  weitere transkriptionelle

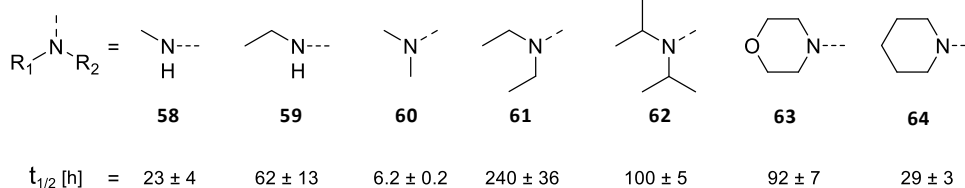
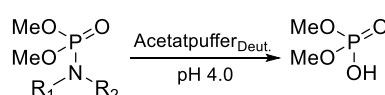
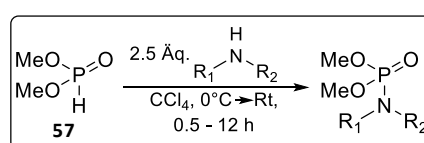
Vorgänge.<sup>[379,380]</sup> Die erhöhte Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns nach Inkubation von T47D-Zellen mit **BCI2-Tam<sub>1</sub>** im Vergleich zu unbehandelten Zellen lässt daher die Vermutung zu, dass eine Internalisierung des ASO-Konjugates nach Bindung des Rezeptors stattgefunden hat, und sowohl Konjugat als auch ER $\alpha$  somit an der Kernmembran colokalisiert vorliegen. Denkbar ist allerdings auch, dass das ASO-Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** durch andere Transportmechanismen internalisiert wurde und durch Bindung an zelluläre ER $\alpha$  an die Kernmembran gelangt ist.<sup>[381]</sup> Abschließend kann diese Frage nicht beantwortet werden. Auch die Frage, weshalb die ASO-Konjugate untereinander ein solch inkonsistentes Verhalten bezüglich der proliferativen Aktivität zeigen, und v.A. Konjugat **BCI2-Tam<sub>2</sub>** im Vergleich zu **BCI2-Tam<sub>1</sub>** in Bezug auf die zelluläre Aufnahme einen solch deutlichen Unterschied zeigt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Mögliche Optionen zur weiteren Untersuchung der rezeptorvermittelten Aufnahme werden in **Kapitel 6** aufgezeigt.

#### 4.7 Phosphoramidate als Backbone-Modifikation in Oligonucleotiden

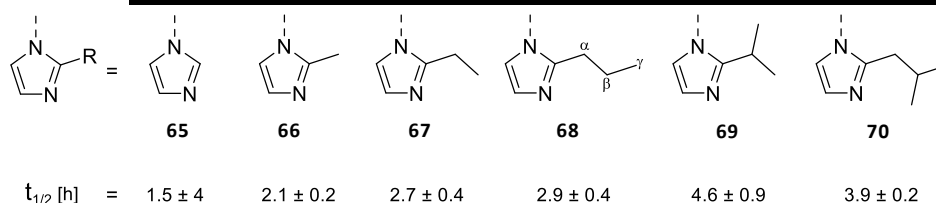
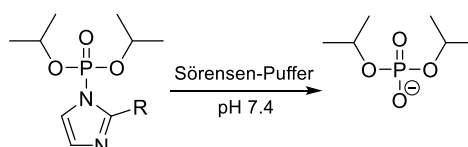
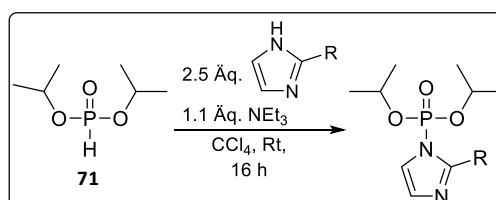
Die strukturelle Modifikation von ON-Therapeutika ist obligatorisch und hat wie in Kapitel 2.3 gezeigt den Zweck, die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften zu verbessern und damit die biologische Wirkung zu erhöhen bzw. Off-Target Effekte zu reduzieren. Hierbei sind Modifizierungen des ON-Backbones von entscheidender Bedeutung, da sie zum einen Nukleasestabilität verleihen und zum anderen eine Option zur nativen, polyanionischen Struktur bieten. Die Verwendung von Phosphor(di)amidaten hat sich in diesem Rahmen bereits als veritable Option herausgestellt<sup>[155]</sup> und wird in verschiedenen ASOs erfolgreich eingesetzt. So werden zum Beispiel zur Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie die ONs Eteplirsen<sup>[44]</sup>, Golodirsen<sup>[45]</sup>, Viltolarsen<sup>[46]</sup> und Casimersen eingesetzt.<sup>[47]</sup> Die in den genannten ONs eingesetzte Backbone-Modifizierung ist i.d.R. permanent und kann die Wirkung der Therapeutika auch negativ beeinflussen, z.B. bei der Hybridisierung mit der Target-Sequenz.<sup>[382]</sup> Um dieses Problem zu umgehen, wurden Prodrug-Ansätze auf Basis von Phosphoramidaten entwickelt, welche eine Abspaltung der ladungsmaskierenden Gruppe z.B. bei definierten pH-Werten ermöglichen.<sup>[383–386]</sup> In Anlehnung an diese Arbeiten wurde ein Prodrug-Konzept gewählt, welches auf Basis von substituierten Imidazolen die Hydrolyse der P-N-Bindung durch sterische Abschirmung mithilfe von in Position 2 installierten Alkylketten moduliert. Zu diesem Zweck wurden zunächst Referenz-

Modellverbindungen (**Abb. 4.30, A**) von einfachen, *N*-alkylierten Phosphoramidaten ausgehend von Dimethylphosphit **57** in Tetrachlorkohlenstoff über die Atherton-Todd-Reaktion hergestellt (**58 - 64**).<sup>[387,388]</sup> Die intermediär gebildeten Chlorphosphate wurden durch Substitution des Chlorids durch die eingesetzten Amine in die Amidate überführt. Die Amine werden hierbei im Überschuss eingesetzt, um die entstehende Salzsäure als Ammoniumsalz auszufällen. Die Halbwertszeit dieser Verbindungen in Bezug auf die sauer vermittelten Hydrolyse der P-N-Bindung wurde mit einer Serie von analog hergestellten Diisopropyl-(2-Alkylimidazol-1-yl)-phosphoramidaten (**65 - 70**) verglichen (**Abb. 4.30, B**). Bei der Synthese der Diisopropyl-(2-Alkylimidazol-1-yl)-

A



B



**Abb. 4.30:** Synthese von substituierten Dimethyl-*N*-Alkylphosphoramidaten aus Dimethylphosphit (**A**) und Synthese von Diisopropyl-(2-Alkylimidazol-1-yl)-phosphoramidaten aus Diisopropylphosphit (**B**) zur Untersuchung der Hydrolysegeschwindigkeit in Modelversuchen.

phosphoramidate wurde Triethylamin als Base zur Erzeugung der intermediären Chlorphosphate benutzt. Anfängliche Synthesen dieser Amidate aus Dimethylphosphit **57** verliefen leider erfolglos, weshalb auf das Homologe Diisopropylphosphit **71** zurückgegriffen werden musste. Die aliphatischen Amidate **58** bis **64** zeigten erwartungsgemäß unter physiologischen Bedingungen keine signifikante Hydrolyse,<sup>[389–391]</sup> in Essigsäure-/Acetat-Puffer hingegen konnte bei pH 4 eine Hydrolyse der P-N-Bindung beobachtet werden.<sup>[392]</sup> Die Hydrolyse wurde hierbei über das Verhältnis der Integration des <sup>31</sup>P-NMR-Signals des jeweiligen Edukts zum entsprechenden Hydrolyseprodukt (Dimethylphosphat) bestimmt und die Halbwertszeit durch Anwendung einer Kurvenanpassung für das Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung (*Box Lucas Fit*) mithilfe der Datenverarbeitungssoftware *Origin* bestimmt. Die Gleichung zur Bestimmung der Hydrolyse lautet hierbei:

$$y = a \cdot (1 - e^{-bx})$$

, wobei der Parameter a den Sättigungsbereich der Kurve und der Parameter b die Steigung zu Beginn der Zerfallsreaktion beschreibt. Aus diesen Parametern ergibt sich die Halbwertszeit ( $x = t_{1/2}$ ;  $y = 50\%$ ) durch Umstellen der Gleichung nach x zu:

$$t_{1/2} = \frac{\ln\left(-\frac{50}{a} + 1\right)}{-b}$$

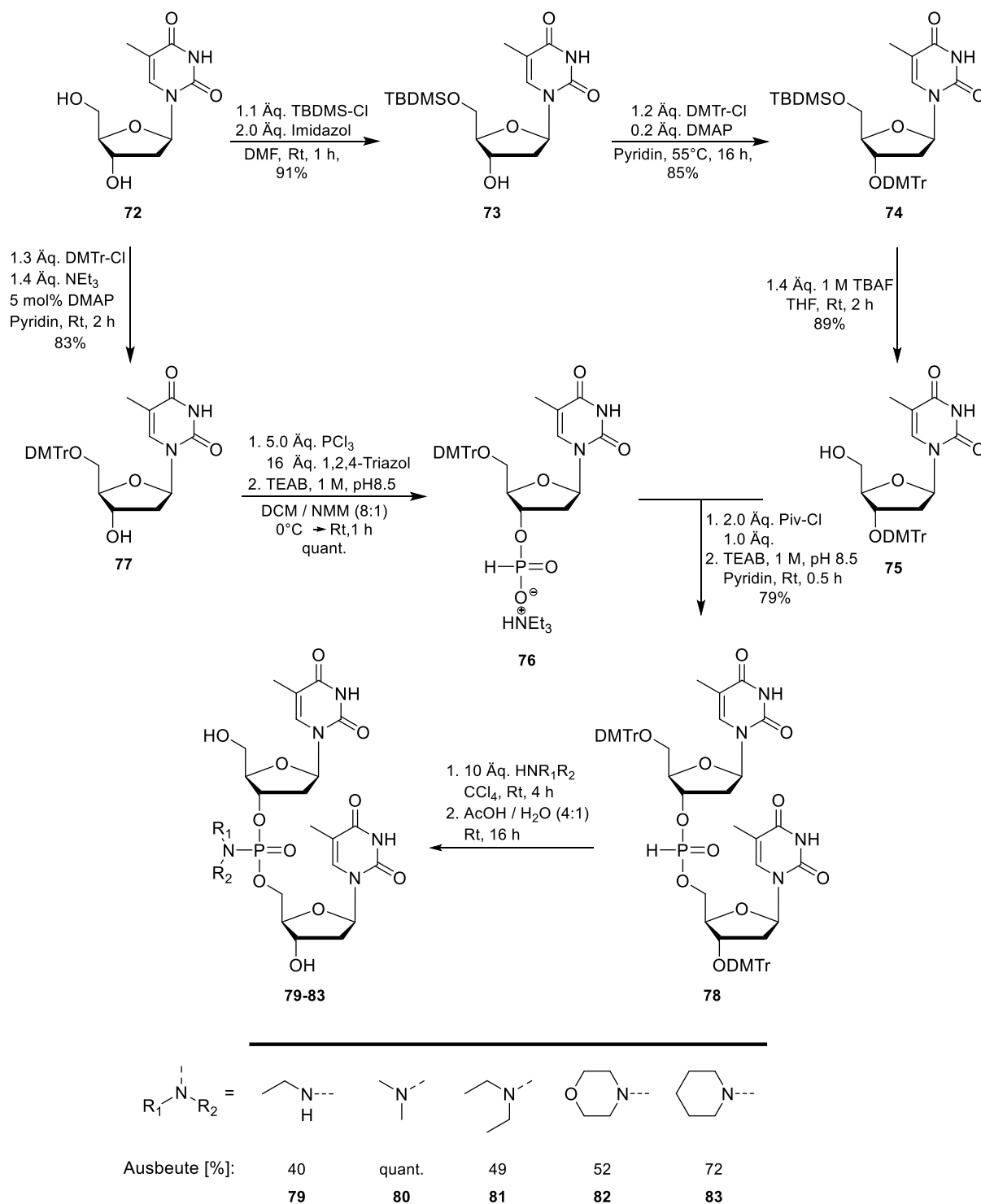
Verbindung **58** zeigte hierbei als kleinstes Homologes in der Reihe der aliphatischen Amidate eine Halbwertszeit von 23 h. Die Einführung einer zweiten Methylgruppe senkte die Halbwertszeit auf 6 h (**60**). Der zusätzliche induktive Effekt der Methylgruppe überkompensiert hierbei die sterische Hinderung zunächst, da die Basizität des disubstituierten Stickstoffs im Vergleich zum monosubstituierten erhöht und die Bindung unter sauren Bedingungen somit leichter hydrolysierbar ist. Bei Wechsel zu Ethyl-Substituenten zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Halbwertszeit bei Vergleich von **58** mit **59** um den Faktor 3 (62 h) und bei Vergleich von **59** mit dem Diethylamin-Derivat **61** um den Faktor 4 (240 h) im Falle des disubstituierten Produkts. Verbindung **61** zeigte damit in der Reihe der aliphatischen Amidate die größte Halbwertszeit (240 h). Überraschenderweise zeigte sich beim Wechsel von Ethyl-Substituenten (**61**) zu sterisch anspruchsvolleren Isopropyl-Substituenten (**62**) ein Absinken der Halbwertszeit auf 100 h, obwohl die  $pK_s$ -Werte von Diethylamin und Diisopropylamin sich kaum voneinander unterscheiden.<sup>[300]</sup> Analoges Verhalten wurde bei Vergleich des Morpholin-Derivats **63**

(92 h) mit dem Piperidin-Derivat **64** (29 h) beobachtet. Piperidin ( $pK_s = 10.9$ ) und Morphin ( $pK_s = 9.2$ ) zeigen nur einen geringen Unterschied hinsichtlich ihres  $pK_s$ -Werts und auch sterisch liegt beiden Molekülen ein Sechsring zugrunde.<sup>[300]</sup> Zusammenfassend war somit keine sterische Kontrolle der hydrolytischen Spaltung der P-N-Bindung für die aliphatischen Amidate **58** bis **64** bei pH-Wert von 4 oder unter physiologischen Bedingungen ableitbar, allerdings konnte dies für die Imidazol-Derivate **65** bis **70** unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden.<sup>[393,394]</sup> Verbindung **65** mit Imidazol als Substituenten am Phosphor zeigte hierbei eine Halbwertszeit von 1.5 h, welche sich durch Anbringen einer Methyl-Gruppe in Position 2 des Imidazol-Rings in **66** auf 2.1 h steigern lies. Die Verwendung des nächsten Homologen als Substituenten erhöhte ein weiteres Mal die Halbwertszeit auf nun 2.7 h (**67**). Unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit bewirkte die Verwendung der Propyl-Gruppe keine signifikante Steigerung der Halbwertszeit von **68** (2.9 h) im Vergleich zu **67** (2.7 h). Das Isopropyl-Derivat **69** hingegen zeigte eine deutlich erhöhte Halbwertszeit von 4.6 h. Interessant ist an dieser Stelle der Vergleich des Isobutyl-Derivats **70** mit dem Propyl-Derivat **68** und dem Isopropyl-Derivat **69**. Die zusätzliche, in  $\beta$ -Position zur in **68** vorliegenden Propyl-Gruppe angebrachte Methylgruppe modulierte die Halbwertszeit von **70** auf den Wert 3.9 h, welcher im Rahmen der Messgenauigkeit zwischen den für **68** und **69** gefundenen Werten liegt. In Verbindung **69** befindet sich die Methyl-Gruppe in  $\alpha$ -Position und erzeugt somit eine um eine Methylengruppe verkürzte Alkylkette, welche weniger Rotationsmöglichkeiten und somit eine relative sterische Fixierung aufweist. Eine Modulation der Halbwertszeit lässt sich demnach im Fall der Diisopropyl-(2-Alkylimidazol-1-yl)-Modellverbindungen vornehmen. Dies ermutigte zur Synthese von Dinukleotid-Modellen, an welchen die Hydrolyse eines DNA-Ausschnitts in einem verfeinerten Modell untersucht werden sollte. Hierfür wurden zunächst wieder aliphatische Amidate als Referenzverbindungen synthetisiert.

Die Synthese der Amidate erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von FERRIS und Mitarbeitern ausgehend von Desoxythymidin **72** (**Abb. 4.31**).<sup>[395]</sup> Der 5'-Alkohol in **72** wurde hierbei zunächst mit TBDMS-Cl und Imidazol in DMF geschützt und in Verbindung **73** anschließend eine DMTr-Schutzgruppe am 3'-Alkohol (**74**) eingeführt. Die TBDMS-Schutzgruppe wurde durch Reaktion mit 1 M TBAF-Lösung in THF entfernt und der für die Dinukleotid-Kupplung benötigte Baustein **75** mit einer Ausbeute von 69%

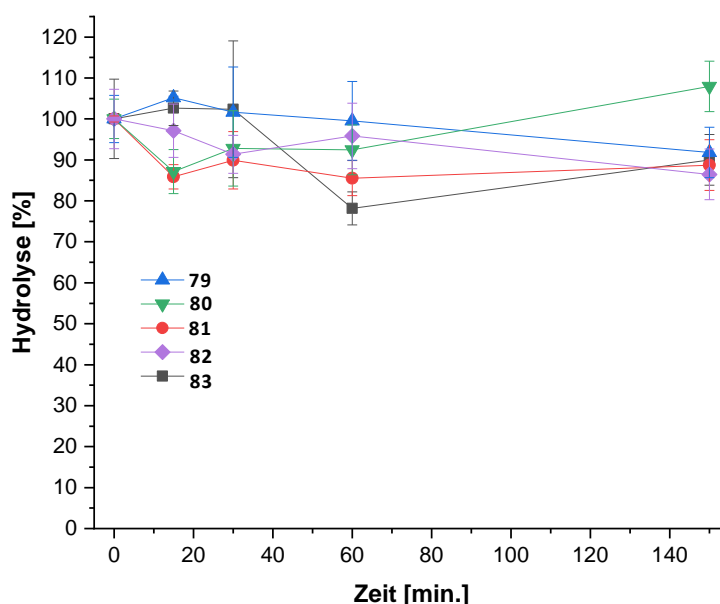


über drei Stufen erhalten. Der zweite Baustein **76** wurde durch Reaktion von 5'-DMTr-Thymidin **77** mit Phosphortrichlorid in einem Gemisch von DCM und NMM hergestellt. Die Verbindung wurde nach Behandlung des Rohprodukts mit frisch hergestellter

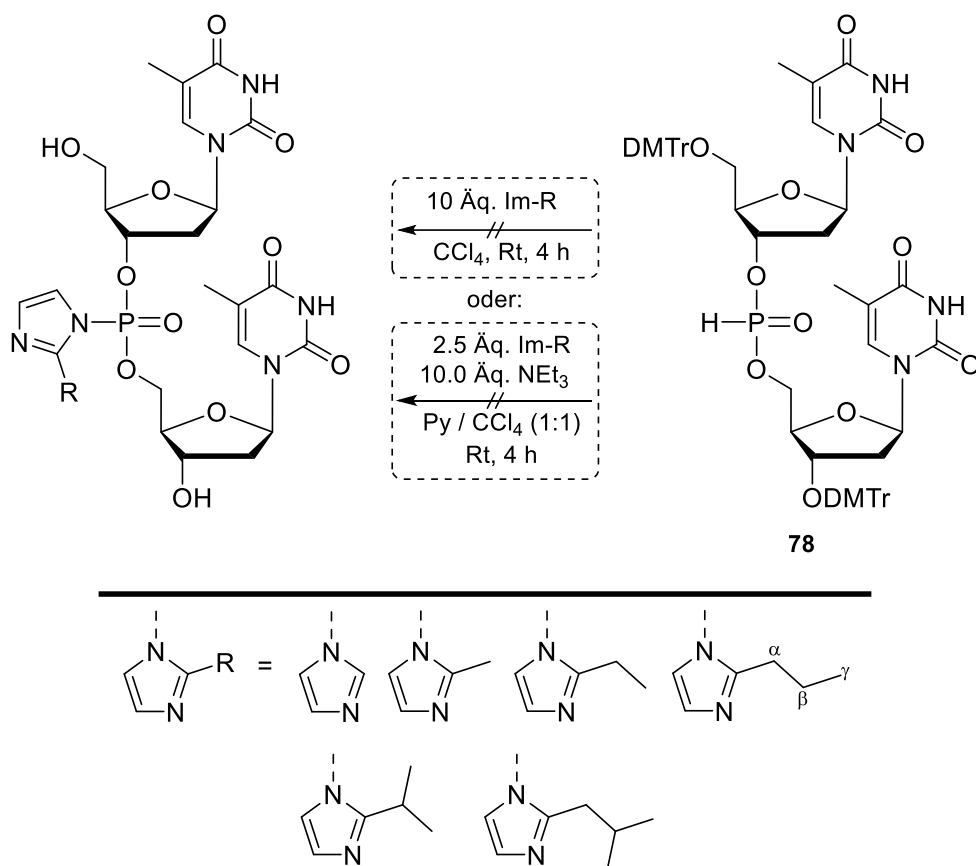


**Abb. 4.31:** Synthese von Dinucleotid-*N*-Alkyl-Phosphoramidaten ausgehend von 5'-Dimethoxytritylthymidin-(3,5)-*H*-Phosphonyl-3'-Dimethoxytritylthymidin **76** durch Atherton-Todd Reaktion.

Triethylammoniumbicarbonat-Lösung in das Triethylammoniumsalz des H-Phosphonats in quantitativer Ausbeute überführt. Die Bausteine **75** und **76** wurden anschließend mit Pivaloylchlorid als Aktivator zum H-Phosphonat-Dinukleotid **78** mit einer Ausbeute von 79% umgesetzt. Aus der Publikation von Ferris ist allerdings ersichtlich, dass eine weiterführende Abspaltung der beiden DMTr-Gruppen in **78** die hydrolytische Zersetzung des entsprechenden Dinukleotid-H-Phosphonats (nicht gezeigt) massiv begünstigt; dies konnte in einem Testansatz bestätigt werden. Daher wurden zunächst ausgehend von **78** die Derivatisierung zum Amidat durch Umsetzung mit einem Überschuss der Amine in Tetrachlorkohlenstoff erzielt; die Amine wirken hierbei auch als Base zur Erzeugung der intermediären Chlorphosphat-Zwischenstufe. Die Rohprodukte wurden durch säulenchromatographische Aufreinigung weitestgehend von den überschüssigen Aminen abgetrennt und zur Abspaltung der DMTr-Schutzgruppen in 80%iger Essigsäure weiter umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurden die Zielverbindungen **79** - **83** über zwei Stufen ausgehend von **78** in moderater bis guter Ausbeute erhalten (vgl. **Abb. 4.31**). Die P-N-Bindung dieser Referenzverbindungen zeigte in humanem Zelllysatsat allerdings keine signifikante Hydrolyse (**Abb. 4.32**).<sup>[396]</sup> Anschließend wurden mehrere Versuche unternommen, **78** analog zu den entsprechenden Thymidyl-3',5'-Thymidin-(2-Alkylimidazol-1-yl)-phosphoramidaten umzusetzen.



**Abb. 4.32:** Stabilität der Dinukleotid-*N*-Alkyl-Phosphoramidate **79** - **83** in humanen Zelllysatsat (U937) bei einer Konzentration von 3.3  $\mu$ M.



**Abb. 4.33:** Synthese von Thymidyl-3',5'-Thymidin-(2-Alkylimidazol-1-yl)-phosphoramidaten ausgehend von 5'-Dimethoxytritylthymidin-(3,5)-*H*-Phosphonyl-3'-Dimethoxytritylthymidin **78** durch Atherton-Todd Reaktionen.

Hierbei zeigte die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung der Umsetzung von **78** mit Imidazol zwar die Bildung mehrerer neuer Produkte, allerdings konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung kein Zielprodukt isoliert werden. Auch die Verwendung von 2-Isopropylimidazol, welches in **69** im Vergleich zum Imidazol-Derivat **65** einen Anstieg der Halbwertszeit um den Faktor 3 bewirkte, führte zur Bildung lediglich geringer Mengen der Zielverbindung, welche lediglich über das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum charakterisiert werden konnte. Der Versuch eines massenspektrometrischen Nachweises der Zielverbindung blieb erfolglos. Anhand der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren konnte zudem festgestellt werden, dass sich die Zielverbindung unter physiologischen Bedingungen innerhalb von 30 min. vollständig zersetzte. Imidazol ist ein schwach nucleophiler *N*-Heterozyklus und die Isolierung phosphorylierter *N*-Heterozyklen mit schwachen Nucleophilen ist aufgrund der äußerst säurelabilen P-N-Bindung oftmals problematisch.<sup>[397]</sup> Die Stabilität unter sauren Bedingungen ist allerdings eine notwendige Mindestanforderung an eine potentielle Backbone-Modifikation, da im Laufe der auf

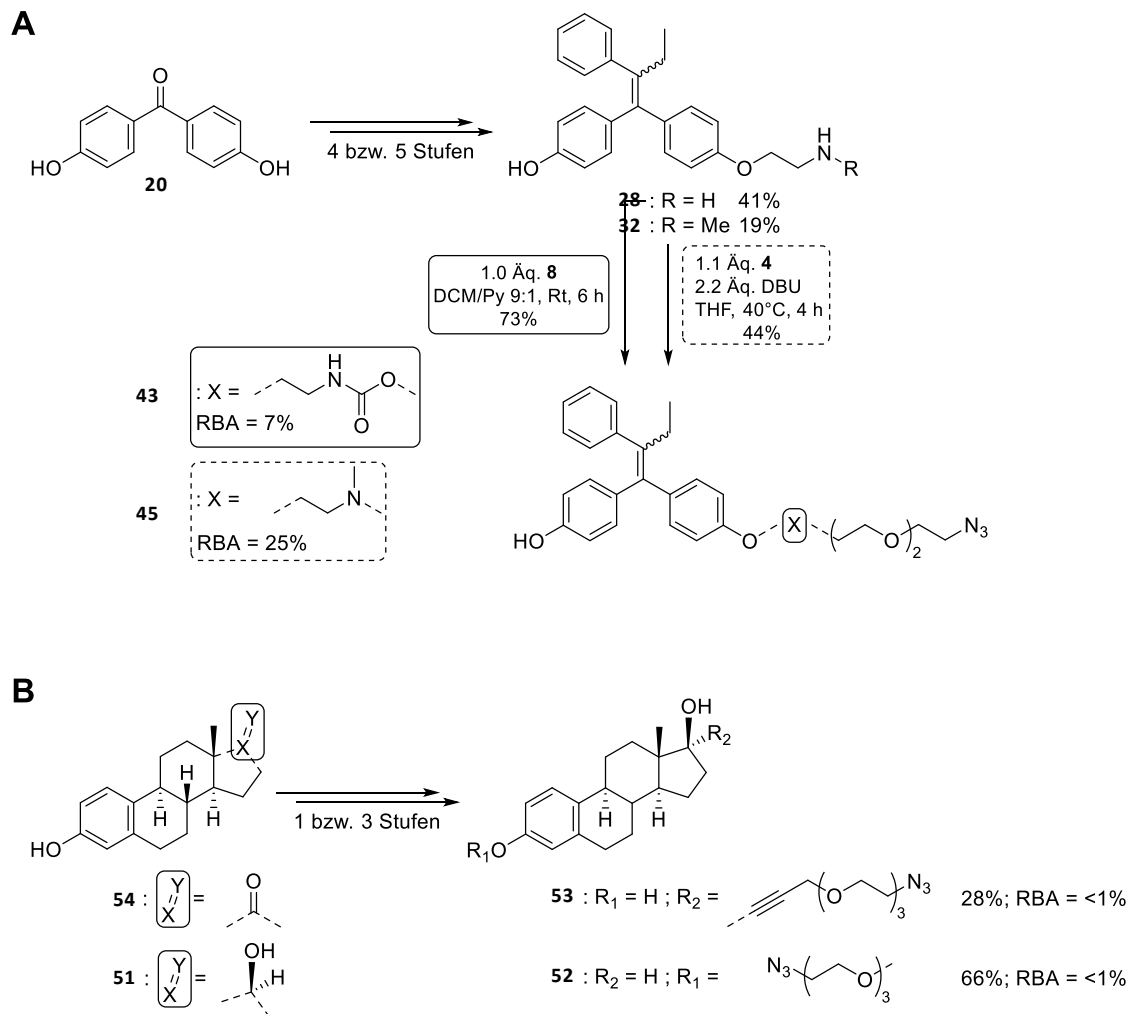
---

Amidit-Bausteinen aufbauenden, konventionellen SPOS die Abspaltung der DMTr-Gruppe mit Trichloressigsäure nach jedem Kupplungsschritt erfolgt. Die Imidazol-Amide erscheinen vor diesem Hintergrund daher zu instabil, um für eine zuverlässige Synthesestrategie im Rahmen einer SPOS einsetzbar zu sein. Sie sind somit für eine potenzielle Anwendung als Backbone-Modifizierung ungeeignet, weshalb keine weiteren Untersuchungen hierzu durchgeführt wurden.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen des vorliegenden Projekts sollte das klinisch relevante Bcl-2-ASO Oblimeren mit ausgewählten Agonisten und Antagonisten des ER $\alpha$  über einen plattformbasierten Ansatz kovalent verbunden werden. Im Sinne eines *Targeted Drug Delivery*-Ansatzes sollte untersucht werden, ob die Verwendung hochaffiner Liganden auf Basis des exogenen SERM 4-Hydroxytamoxifen als auch auf Basis des endogenen Agonisten 17 $\beta$ -Estradiol zu einer gesteigerten Internalisierung des Bcl-2-ASOs im Vergleich zu unmodifiziertem ASO in T47D-Zellen führt.

Die hierzu synthetisierten und in **Abb. 5.2** gezeigten ON-Konjugate bestehen hierbei aus modularen Bausteinen, welche erst an der Festphase zu den entsprechenden Konjugaten verknüpft wurden. Eines dieser Module stellen die mit TEG-Spacern dekorierten Rezeptorliganden aus der Gruppe SERMs **43 (Tam<sub>1</sub>)** und **45 (Tam<sub>2</sub>)** und aus der Gruppe der Östrogene **52 (E<sub>1</sub>)** und **53 (E<sub>2</sub>)** dar, welche zunächst vollsynthetisch aus kommerziell erhältlichen Grundstoffen hergestellt wurden (siehe **Abb. 5.1**). Die Synthese der hierfür notwendigen Linker auf Basis der TEG-Spacer **4** und **8** gelang nach Synthesevorschriften von Deng in einer Gesamtausbeute von 75% nach drei Stufen bzw. 81% nach zwei Stufen. Die Synthese der zum Aufbau der SERM-Liganden benötigten 4-OHT-Kerngerüste gelang hierbei unter Anwendung und Kombination von z.T. optimierten Synthesevorschriften von Gauthier, Fauq und Cushman.<sup>[288,290–292]</sup> Die aktiven Metabolite von 4-OHT, Norendoxifen **28** und Endoxifen **32** wurden jeweils nach 4 bzw. 5 Stufen mit einer Ausbeute von 41% bzw. 18% ausgehend von 4,4'-Dihydroxybenzophenon **20** erhalten, wobei die Desymmetrisierung von **20** den limitierenden Schritt in Bezug auf die Ausbeute darstellte. Die Verbindungen **28** und **32** wurden als Ausgangspunkte für die Anknüpfung der TEG-Spacer gewählt, die entsprechenden Liganden **43 (Tam<sub>1</sub>)** und **45 (Tam<sub>2</sub>)** wurden somit in einer Gesamtausbeute von 30% bzw. 13% erhalten. Die Synthese der Estradiol-Liganden gestaltete sich als weniger aufwendig, Ligand **52 (E<sub>1</sub>)** wurde analog zur Vorschrift von Bang in einer Stufe ausgehend von 17 $\beta$ -Estradiol durch Reaktion mit Spacer **4** mit einer Ausbeute von 66% erhalten. Ligand **53 (E<sub>2</sub>)** wurde durch Kombination der Vorschriften von Alexis und Adamczik nach drei Stufen mit einer Ausbeute von 28% ausgehend von Estron **54** erhalten, wobei sich die C-C-Bindungsknüpfung zwischen TBDMS-Estron **55** und Spacer **19** aus synthetischer Sicht

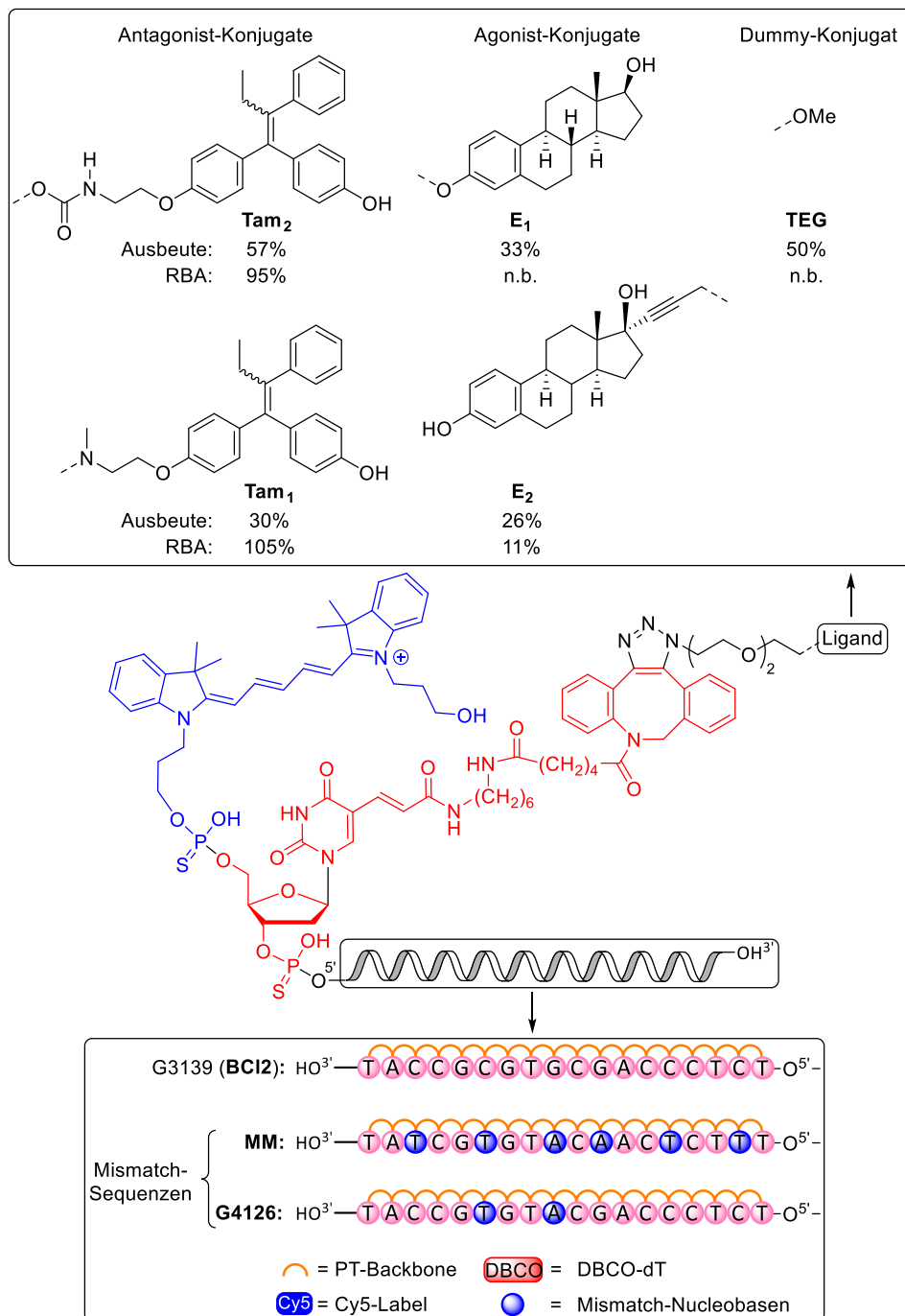


**Abb. 5.1:** Synthese der SERM-Liganden **43** und **45** ausgehend von **20** (A) und der Agonist-Liganden **52** und **53** ausgehend von Estradiol **51** bzw. Estron **54** (B) mit Angabe der Ausbeuten und relativen Bindungsaffinitäten zu ER $\alpha$ .

als Schlüsselschritt und in Bezug auf die Ausbeute als der limitierende Schritt herausstellte.

Insgesamt 12 ON-Konjugate wurden durch Reaktion der Liganden **Tam<sub>1</sub>** und **Tam<sub>2</sub>** sowie **E<sub>1</sub>** und **E<sub>2</sub>** mit der festphasengebundenen ON-Sequenz Oblimersen (**BCI2**) sowie mit zwei weiteren Mismatch-Sequenzen (**G4126** und **MM**) unter kupferfreien Klick-Bedingungen in 200 nmol Ansatzgröße dargestellt. Eine dieser Mismatch-Sequenzen ist bereits literaturbekannt (**G4126**) und wurde im Zusammenhang mit der Oblimersen-Sequenz in Publikationen stets als Mismatch-Kontrolle herangezogen. Eine zweite Mismatch-Kontrolle mit sechs anstelle von lediglich zwei Basen-Mismatches wurde notwendig, nachdem in Schmelzpunkt-Experimenten eine hohe Affinität der Sequenz **G4126** zur Target-mRNA der **BCI2**-Sequenz gezeigt werden konnte. Insgesamt sechs

Kontroll-Konjugate wurden dargestellt, welche am 5'-Ende der jeweiligen Sequenz lediglich das Cy5-Label (**BCI2-** / **G4126-** / **MM-Cy5**) oder den gesamten Spacer-Apparat (**BCI2-** / **G4126-** / **MM-Cy5**) ohne die Targeting-Einheiten **Tam<sub>1</sub>** und **Tam<sub>2</sub>** sowie **E<sub>1</sub>** und **E<sub>2</sub>** trugen. Die Ausbeuten der ON-Konjugate sind mit Werten zwischen 10% und 57% als moderat einzustufen. Die Werte inkludieren hierbei die Step-to-Step-Ausbeuten der im Verlauf der SPOS wachsenden ON-Kette, die Implementierung der Spezial-Amidite DBCO-dT und Cy5 sowie die Klick-Reaktion zwischen den festphasengebundenen ONs und den Rezeptorliganden. Aus **Abb. 4.19** ist ersichtlich, dass die Kupplung der Ultramild-Amidite  $dA^{Pac}$ ,  $dG^{iPr-Pac}$  und  $dC^{Ac}$  recht zuverlässig mit hohen Step-to-Step-Ausbeuten erfolgte, nichtsdestotrotz ist ein Austausch der Amidit-Lösungen bei längerem Gebrauch des Synthesizers ratsam. Vor Allem die Lösung von  $dG^{iPr-Pac}$  erscheint sehr instabil, was sich in einem leichten Einbruch der  $V_2$ -Werte äußerte. Die Kupplung des Branching-Amidits DBCO-dT erfolgte mit  $V_2$ -Werten  $< 50$  und ist demnach von der Qualität der Kupplungen der Standard-Amidite nicht zu unterscheiden. Dennoch konnte während der HPLC-chromatographischen Reinigung in vielen Fällen eine Fraktion isoliert werden, welche eine Retentionszeit vergleichbar mit dem als internen Standard gebrauchten, unmodifizierten ON **BCI2** aufweist (vgl. **Abb. 4.21**, Fraktion I). DBCO-dT ist aufgrund seiner Struktur unter stark oxidativen Bedingungen instabil und wird bspw. bei Oxidationen mit Iod gespalten, weshalb die Verwendung von (1S)-(+)-(10-Camphersulfonyl)oxaziridin (CSO) als Oxidans zu empfohlen ist. Zum Aufbau eines lückenlosen PT-Backbones muss allerdings eine Lösung von DDTT verwendet werden, dessen Einfluss auf die Stabilität von DBCO-dT bisher nicht eruiert wurde. Möglicherweise führt die Verwendung von DDTT zur Abspaltung der DBCO-Gruppe; diese Behauptung konnte experimentell allerdings noch nicht überprüft werden. Die Kupplung des Cy5-Amidites konnte UV-Vis-spektroskopisch am DNA-Synthesizer nicht verfolgt werden, da die Absorptionswellenlänge gerätetechnisch invariabel auf die Wellenlänge des Dimethoxytritylkations eingestellt ist. Die Elugramme der Rohlösungen der ON-Konjugate zeigten stets eine zu hohen Retentionszeiten zugehörige Fraktion (vgl. **Abb. 4.21**, Fraktion III). Diese Fraktion eluiert durchschnittlich ca. 8-10 min. vor der Zielfraktion und zeigte keine Absorption im charakteristischen Wellenlängenbereich des Cy5-Labels ( $650 \pm 20$  nm). Mutmaßlich erscheinen diese Eigenschaften für ein DBCO-**BCI2-**



**Abb. 5.2:** Strukturelle Übersicht zu den Estradiol-abgeleiteten **E<sub>1</sub>** und **E<sub>2</sub>** sowie den 4-OHT abgeleiteten **Tam<sub>1</sub>**- und **Tam<sub>2</sub>**- ON-Konjugaten mit der aktiven ASO-Sequenz **BCI2** (G3139), **G4126** und **MM**. Die Ausbeuten und RBA-Werte sind für die ASO-Konjugate angegeben.

Konjugat plausibel, welches die Klick-Reaktion nicht eingegangen ist und welches kein Cy5-Label als 5'-Terminus trägt (vgl. Kapitel 4.5.2). Dies konnte massenspektrometrisch allerdings nicht bestätigt werden.

Der biologischen Testung vorrangend wurden für ON-Konjugate typische Spezifikationen bestimmt, wozu v.A. das Schmelzverhalten der Heteroduplex aus ON-Konjugat



und Target-mRNA zählt. Auf Basis der temperaturabhängigen Hyperchromizität wurde eine Van't Hoff Analyse zur Bestimmung des mRNA-Belegungsgrads, der extensiven Zustandsgröße Entropie sowie der thermodynamischen Potentiale Gibbs-Energie und Bildungsenthalpie der Duplexbildung bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Bildung der Duplex aus Target-mRNA und der ASO-Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>**, **BCI2-Tam<sub>2</sub>**, **BCI2-E<sub>1</sub>** und **BCI2-E<sub>2</sub>** exergonisch und damit spontan verläuft. Im Vergleich zur unmodifizierten Sequenz zeigten diese Konjugate nur geringfügig verringerte Schmelzpunkte ( $\Delta T_{\max.} < 4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Der Belegungsgrad der Target-mRNA bei Verwendung der Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>** und **BCI2-Tam<sub>2</sub>** wurde zu  $> 98\%$ , bei Verwendung der Konjugate **BCI2-E<sub>1</sub>** und **BCI2-E<sub>2</sub>** zu  $> 95\%$  bestimmt; die Heteroduplex der Kontrolle **BCL2-TEG** zeigte einen Belegungsgrad von 99%. Die ASO-Konjugate zeigen somit eine hinreichende Affinität zur Target-mRNA. Die Mismatch-Konjugate mit sechs Basenfehlpaarungen (**MM-Konjugate**) zeigen erwartungsgemäß kein Schmelzverhalten mit der Target-mRNA, die Mismatch-Konjugate mit lediglich zwei Basenfehlpaarungen (**G4126-Konjugate**) hingegen solche mit einem Unterschied von  $\Delta T_{\max.} \approx 20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Bildung sowohl der ASO-Duplices als auch die der Mismatch-Konjugate auf Basis der **G4126**-Sequenz verlaufen damit exergonisch, mit Werten für  $\Delta G^\circ \approx -22 \text{ kJ/mol}$  bzw.  $\approx -6 \text{ kJ/mol}$  und somit freiwillig. Der massenspektrometrische Nachweis der ON-Konjugate erfolgte durch Dekonvolierung mittels FT-ICR-Massenspektrometrie erhaltenen, kumulierten ESI-Spektren; die Implementierung des Cy5-Labels zur zellulären Verfolgung des Internalisierungsprozesses wurde durch Aufnahme von UV-Absorptionsspektren der Konjugate verifiziert.

Die in den ON-Konjugaten integrierten, modifizierten Rezeptorliganden wurden in einem neu etablierten Kompetitionsassay an ER $\alpha$  auf ihre Rezeptoraffinität überprüft; die hieraus aufgebauten Konjugate wurden ebenfalls auf Rezeptoraffinität getestet. Hierbei zeigten die Konjugate eine um den Faktor 10 gesteigerte Rezeptoraffinität. Als Kontrollen dienten hierbei ausgewählte, in ER $\alpha$ -Assays etablierte Standards. Die gefundenen Werte wurden zum Zweck der Vergleichbarkeit auf den Standard 17 $\beta$ -Estradiol bezogen und in Form von relativen Bindungsaffinitäten (RBA) angegeben. Die Liganden **Tam<sub>1</sub>** und **Tam<sub>2</sub>** zeigten im ER $\alpha$ -Kompetitionsassay hohe Affinitäten zum Target-Rezeptor ER $\alpha$  mit RBA-Werten von 27% bzw. 7%. Die auf Basis dieser Liganden dargestellten ASO-Konjugate **BCI2-Tam<sub>1</sub>** und **BCI2-Tam<sub>2</sub>** zeigten im Rahmen der Messgenauigkeit Affinitäten, welche der Positivkontrolle 17 $\beta$ -Estradiol mit RBA-Werten von 105% bzw.

95% entsprachen. Die Liganden **E<sub>1</sub>** und **E<sub>2</sub>** zeigten hingegen nur eine sehr geringe Affinität zu ER $\alpha$  mit RBA-Werten von 0.6% bzw. 1.3%, was sich auch auf die entsprechenden Konjugate **BCI2-E<sub>1</sub>** und **BCI2-E<sub>2</sub>** auswirkte. Das Konjugat **BCI2-E<sub>2</sub>** zeigte einen RBA-Wert von lediglich 11%, die Messungen zu Konjugat **BCI2-E<sub>1</sub>** waren nicht auswertbar, weshalb das Vorhandensein einer Affinität von **BCI2-E<sub>1</sub>** zu ER $\alpha$  nicht bestätigt werden konnte.

Die ON-Konjugate wurden in *in vitro*-Experimenten hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften untersucht. Hierzu wurden sowohl die Proliferation von ER $\alpha$ -überexprimierenden T47D-Zellen im Vergleich zur Proliferation von ER $\alpha$ -defizitären HepG2-Zellen als auch der Gehalt des Bcl-2 Proteins in T47D-Zellen nach Gabe der Konjugate bestimmt. Als Kontrollen wurden die Grundstrukturen der Liganden, 4-OHT und 17 $\beta$ -Estradiol, sowie die Kontroll-Konjugate herangezogen. Hierbei konnte insbesondere eine signifikante Proliferationshemmung nach Gabe des ASO-Konjugats **BCI2-Tam<sub>1</sub>** beobachtet werden. Ebenso wurde nach Gabe des Konjugats **BCI2-Tam<sub>1</sub>** ein Absinken des Bcl-2-Gehalts beobachtet. Hier wurden alle Konjugate jeweils transfiziert und untransfiziert eingesetzt, um die Änderung des Proliferationsverhaltens von T47D-Zellen mit der Bcl-2-Expression in selbigen zu korrelieren und somit die Fähigkeit zur *self-delivery* zeigen zu können. **BCI2-Tam<sub>1</sub>** zeigte eine signifikante Proliferationshemmung von bis zu 20% in T47D-Zellen nach untransfizierter Inkubation bei einer Konzentration von 500 nM an. Diese Proliferationshemmung korrelierte hierbei mit der Caspasenaktivität, welche ein Indikator der wiederhergestellten Apoptose ist. Ebenfalls konnte durch das Western-Blot Verfahren ein Absinken des Bcl-2-Gehalts der Zellen unter die Detektionsgrenze nach Inkubation mit **BCI2-Tam<sub>1</sub>** gezeigt werden. Die im Vergleich zum untransfiziert eingesetzten ASO **BCI2** (unmodifiziert) gesteigerte apoptotische Aktivität der Zellen nach Inkubation mit ASO-Konjugat **BCI2-Tam<sub>1</sub>** konnte noch nicht abschließend und ausschließlich mit einer rezeptorvermittelten Endozytose in Zusammenhang gebracht werden (vgl. **Abb. 4.29**).

Zur genaueren Untersuchung dieses Sachverhalts wurde durch Vergleich fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen der ER $\alpha$ -überexprimierenden T47D-Zellen mit denjenigen von ER $\alpha$ -defizitären HepG2-Zellen das Aufnahmeverhalten der Zellen bewertet. Um einen lipophilen Beitrag der Sonde ausschließen zu können, welcher die Aufnahme der Konjugate durch *passives Targeting* falsch-positiv beeinflussen könnte, wurden

Kontroll-ASOs mit lediglich Cy5-terminierten Sequenzen (**BCI2-** / **G4126-** / **MM-Cy5**) herangezogen. Eine erweiterte Kontrolle stellten Dummy-Konjugate da, welche neben der Sonde auch den Spacer-Apparat ohne zusätzliche Targeting-Einheit trugen (**BCI2-** / **G4126-** / **MM-TEG**), um etwaige lipophile Beiträge durch die Target-Einheiten als Bestandteil der biologischen Wirkung eruieren zu können. Global konnte im Rahmen dieser umfangreichen Experimente keine bevorzugte Internalisierung der mit Liganden dekorierten ASOs gefunden werden. Vor Allem die im Vergleich zu **BCI2-Tam<sub>1</sub>** größere Aufnahme des Dummy-Konjugates **BCI2-TEG** wirft die Frage auf, ob nicht andere Transportmechanismen maßgeblich am Internalisierungsprozess der ON-Konjugate beteiligt sind. Dennoch konnte anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden, dass sich **BCI2**, **BCI2-TEG** und **BCI2-Tam<sub>1</sub>** in unterschiedlichem Maße in der Zelle verteilen, was aufgrund der unterschiedlichen Verteilung von ER $\alpha$  selbst nur den Schluss einer Interaktion der ON-Konjugate mit eben diesen Rezeptoren nahelegt. Anhand von Kontrollmessungen in HepG2-Zellen konnte eine Beteiligung von ER $\alpha$  an der Internalisierung der ON-Konjugate zumindest sichergestellt werden. Weitere Optionen, welche zur Klärung dieses Sachverhaltes beitragen könnten, werden im folgenden Kapitel aufgezeigt. Zuletzt erscheint naheliegend, das Potential der aus medizinal-chemischer Sicht gefundenen Hit-Verbindung **BCI2-Tam<sub>1</sub>** im Vergleich zu anderen, aus medizinischer Sicht relevanten Bcl-2-ASOs zu betrachten. An dieser Stelle wird allerdings explizit darauf hingewiesen, dass solch ein Vergleich aufgrund der vielfältigen Variationen der biologischen Evaluation nicht zielführend ist. Die in Kapitel 2.4 angeführten Beispiele unterscheiden sich hinsichtlich ihrer distinkten Sequenzen und damit in ihren mRNA-Targets. Zudem wurden die genannten ASOs in gänzlich unterschiedlichen Zelllinien bei unterschiedlichen Konzentrationen und Zellzahlen getestet. Letztendlich ist die Wahl der Detektionsmethode zur Bestimmung der Zellviabilität entscheidend und bei allen oben zitierten Quellen nicht uniform. Nichtsdestotrotz soll im anschließenden Kapitel auf verschiedene, weiterführende Überlegungen eingegangen werden, welche zum einen die Optimierung der biologischen Wirkung der Hit-Verbindung **BCI2-Tam<sub>1</sub>** und zum anderen die Verfolgung und Klärung des Internalisierungsprozesses zum Ziel haben.

## 6 Ausblick

Die anfängliche Arbeitshypothese sah vor, die pharmakokinetischen Eigenschaften des Bcl-2ASO Oblimersen durch Konjugation mit hochaffinen Rezeptoragonisten und -Antagonisten des membranständigen ER $\alpha$  zu verbessern. Anders formuliert kann die Arbeitshypothese auch lauten, sowohl die pharmakokinetischen als auch und pharmakodynamischen Eigenschaften von 4-OHT und seinen aktiven Metaboliten zu verbessern. Das übergeordnete Ziel ist, die Therapie endokrinen Brustkrebses durch Kombination der Vorteile beider Wirkstoffklassen zu verbessern.

### 6.1 Internalisierung des Konjugats BCl2-Tam<sub>1</sub>

Ein zentraler Aspekt dieses gewählten aktiven *Drug Targeting* Ansatzes ist zunächst die Internalisierung des Konjugats aus beiden Wirkstoffen durch rezeptor-vermittelte Endozytose. Das Konjugat sollte hierbei ebenfalls eine möglichst hohe Affinität zum Rezeptor besitzen, um einen potenten Kompetitionspartner im Vergleich zu endogenen Bindern wie bspw. dem Agonisten Estradiol darzustellen. Die Verdrängung des proliferativ wirkenden Estradiols durch das ON-Konjugat beruht auf einer weiteren Eigenschaft des SERM 4-OHT. Durch „Einfrieren“ der antiproliferativen Konformation des membranständigen ER $\alpha$  soll die Zellproliferation durch Eingriff in die Signaltransduktion der Karzinomzellen zunächst gestoppt werden. Konkret führt die geänderte konformative Stellung der Helix 12 zur Blockierung der transkriptionellen Aktivität der Zelle, in einem zweiten Schritt sollte das Konjugat rezeptorvermittelt in Endosomen von der Zelle aufgenommen werden.<sup>[295]</sup> Anhand der in Kapitel 4.6 diskutierten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde der Schluss gezogen, dass diese Behauptung bisher nicht zweifelslos bewiesen ist. Die zur Quantifizierung genutzte Absorption des Cy5-Labels entspricht nicht dem angenommenen Modell bzw. eine bevorzugte Internalisierung der ON-Konjugate kann trotz hoher Affinität sowohl des Liganden als auch der Konjugate nicht bestätigt werden. Allerdings ist ersichtlich, dass Konjugat **BCl2-Tam<sub>1</sub>** zusammen mit ER $\alpha$  colokalisiert in Endosomen vorliegen, wohingegen das Dummy-Konjugat eher diffus im Cytosol verteilt vorzuliegen scheinen. Einen genaueren Einblick würde die Verwendung eines hochauflösenden Fluoreszenzmikroskops, bspw. ein STED- oder 3D-SIM-Mikroskop bieten, da hier die Endosomen sowohl optisch besser aufgelöst sind als auch eine zeitaufgelöste Verfolgung derselben ermöglicht wird.

Darüber hinaus böte die *3D surface enhanced Raman spectroscopy* (3D SERD) eine Option zur genauen Lokalisierung der ASO-Konjugate im Vergleich zum Dummy-Konjugat, sofern den ON-Konjugaten nanopartikuläre Eigenschaften vorausgesetzt oder bestenfalls nachgewiesen werden können. Ein konkreter, weiterführender Nachweis zur Abhängigkeit der Bcl-2-Expression von der rezeptorvermittelten Aufnahme des ON-Konjugats böte die Rücktitration einer konstant gehaltenen Menge des ASO-Konjugates **BCI2-Tam<sub>1</sub>** mit steigenden Äquivalenten von Estradiol.<sup>[257]</sup> Mit steigender Konzentration des proliferativ wirkenden Estradiols sollten sowohl die Gesamtproliferation der Zellen als auch der Gehalt von Bcl-2 in der Zelle wieder zunehmen. In einem anschließenden, zukünftigen Experiment wird der GTPase-Inhibitor Dynsore™ dazu verwendet, die Dynamin-abhängige Endozytose des Rezeptors wieder reversibel zu beeinflussen.<sup>[373]</sup> Steigende Konzentration von Dynsore sollten bei gleichbleibender Konzentration des ASO-Konjugates die Proliferationshemmung aufheben, da die Einschnürung gebundener, membranständiger Rezeptoren durch Blockieren von Dynamin II unterbunden wird. Ein Kontrollexperiment hierzu böte die analoge Durchführung mit konstanten Mengen Estradiol als potentem und proliferativ wirkendem Agonisten. Steigende Konzentrationen von Dynasore würden dann die Proliferation der Zellen eher hemmen. Rückschlüsse auf den Internalisierungsprozess würden somit allerdings indirekt über die Zellproliferation gezogen werden. Außer Acht gelassen wird hierbei die Tatsache, dass die Abnahme des Gehalts von Bcl-2 im Konkreten durch andere antiapoptische Proteine der Bcl-2-Familie kompensiert werden kann. Die Experimente sollten daher in jedem Fall fluoreszenzmikroskopisch verfolgt werden, um eine direkte Korrelation der Zellaufnahme über das Fluoreszenzsignal des Cy5-Labels der Konjugate zeigen zu können. Titriert man also eine konstante Menge des ASO-Konjugates **BCI2-Tam<sub>1</sub>** mit steigenden Estradiol-Konzentrationen zurück, sollte die Fluoreszenzintensität abnehmen, da vermehrt Estradiol anstelle des ASO-Konjugats die Rezeptoren an der Zelloberfläche belegt und somit internalisiert wird. Gleichzeitig sollten steigende Konzentrationen von Dynasore den gleichen Effekt nicht durch kompetitive Verdrängung am Rezeptor, sondern durch zeitlich reversible Blockade der Rezeptoreinschnürung selbst zeigen – die Fluoreszenzintensität bei der Emissionswellenlänge von Cy5 nimmt bei steigender Dynasore-Konzentration innerhalb der Zelle ab.<sup>[372]</sup> Kann bei beiden Experimenten kooperatives Verhalten gezeigt werden, so liegt die Vermutung einer

rezeptorvermittelten Endozytose des ASO-Konjugats nahe. Es konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden, dass die ON-Konjugate ausschließlich über rezeptorvermittelte Endozytose in das Cytosol gelangen. Aufgrund der Vielzahl möglicher aktiver und passiver Transportmechanismen ist dies auch nicht zu erwarten. Dennoch könnte mit den oben beschriebenen Experimenten zumindest der Beitrag zur Internalisierung eruiert werden, welcher der ursprünglichen Arbeitshypothese entsprechend über den ER $\alpha$  erzielt wird.

## 6.2 Sequenz-Screening für Tam<sub>1</sub>-konjugierte ONs

Die in Kapitel 2.4 gezeigten Bcl-2-ASOs zielen auf unterschiedliche Abschnitte (Nukleotidsequenzen) derselben mRNA (Target-mRNA, Sense-Strang) ab.

**Homo sapiens BCL2 apoptosis regulator (BCL2), transcript variant alpha, mRNA**  
Sequence ID: [NM\\_000633.3](#) Length: 6881 Number of Matches: 1

Range 1: 801 to 1501 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1295 bits(701)	0.0	701/701(100%)	0/701(0%)	Plus/Plus
Query 801	TCCTCTTCTTTCTCTGGGGCCGTGGGGTGGGAGCTGGGGCGAGAGGTGCCGTTGGCCCC				860
Sbjct 801	TCCTCTTCTTTCTCTGGGGCCGTGGGGTGGGAGCTGGGGCGAGAGGTGCCGTTGGCCCC				860
TI-AS / BP1002	Query 861	CGTTGCTTTTCTCTGGGAAGGATGGCGCACGCTGGGAGACAGGGTACGATAACCGGGA			920
	Sbjct 861	CGTTGCTTTTCTCTGGGAAGGATGGCGCACGCTGGGAGAACAGGGTACGATAACCGGGA			920
	Query 921	GATAGTGATGAAGTACATCCATTATAAGCTGTCGACAGAGGGCTACGAGTGGGATGCGGG			980
	Sbjct 921	GATAGTGATGAAGTACATCCATTATAAGCTGTCGACAGAGGGCTACGAGTGGGATGCGGG			980
	Query 981	AGATGTGGGCGCCGCCCGGGGCGCCCGCCGACCGGGCATCTTCTCTCCAGCC			1040
	Sbjct 981	AGATGTGGGCGCCGCCCGGGGCGCCCGCCGACCGGGCATCTTCTCTCCAGCC			1040
	Query 1041	CGGGCACACGCCCATCCAGCCGCATCCCGGGACCCGGTCGCCAGGACCTCGCCGCTGCA			1100
	Sbjct 1041	CGGGCACACGCCCATCCAGCCGCATCCCGGGACCCGGTCGCCAGGACCTCGCCGCTGCA			1100
	Query 1101	GACCCGGCTGCCCGCGCCCGGGGCGCCCGGGGCTGCGCTCAGCCCGGTGCCACCTGTGGT			1160
	Sbjct 1101	GACCCGGCTGCCCGCGCCCGGGGCGCCCGGGGCTGCGCTCAGCCCGGTGCCACCTGTGGT			1160
	Query 1161	CCACCTGACCTCCGCCAGGCCGGCGACGACTTCTCCCGCCGTACCGCCGCGACTTCGC			1220
	Sbjct 1161	CCACCTGACCTCCGCCAGGCCGGCGACGACTTCTCCCGCCGTACCGCCGCGACTTCGC			1220
	Query 1221	CGAGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGACGCCCTTACCAGCGGGGACGCTTTGCCACGGT			1280
	Sbjct 1221	CGAGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGACGCCCTTACCAGCGGGGACGCTTTGCCACGGT			1280
ASO-2009	Query 1281	GGTGGAGGAGCTCTCAGGGACGGGGTGAACGGGGAGGATTGTGGCCTCTTTGAGTT			1340
	Sbjct 1281	GGTGGAGGAGCTCTCAGGGACGGGGTGAACGGGGAGGATTGTGGCCTCTTTGAGTT			1340
	Query 1341	CGGTGGGGTCATGTGTGGAGAGCGTCAACCGGAGATGTCGCCCTGGTGGACAACAT			1400
	Sbjct 1341	CGGTGGGGTCATGTGTGGAGAGCGTCAACCGGAGATGTCGCCCTGGTGGACAACAT			1400
	Query 1401	CGCCCTGTGGATGACTGAGTACCTGAACCGCACCTGCACACCTGGATCCAGGATAACGG			1460
	Sbjct 1401	CGCCCTGTGGATGACTGAGTACCTGAACCGCACCTGCACACCTGGATCCAGGATAACGG			1460
	Query 1461	AGGCTGGGATGCCCTTGTGGAACTGTACGGCCCCAGCATGC			1501
	Sbjct 1461	AGGCTGGGATGCCCTTGTGGAACTGTACGGCCCCAGCATGC			1501
					ASO-4625 / ASO-5005

**Abb. 6.1:** Ausschnitt des mRNA-Transkript des humanen Bcl-2-Proteins (Isoform Alpha) im FASTA-Format. Dargestellt sind Abfrage (Query) und Datenbankeintrag (Sbjct). Die Target-Sequenzen der Bcl-2-ASOs innerhalb der Target-mRNA sind hervorgehoben. BLAST Sequenz ID: NM\_000633.3.

Diese wird auf Basis des codogenen Strangs der für das Bcl-2-Protein codierenden DNA durch Transkription erzeugt. Letztendlich entspricht also die Sequenz des eingesetzten ASOs des für das Bcl-2 Protein codierenden (nicht als Templat für die RNA-Polymerase genutzten) DNA-Strangs. Das Transkript des codogenen Strangs, die mRNA, ist in **Abb. 6.1** dargestellt. Hierbei ist lediglich der Bereich von Nukleotid 801 bis 1501 dargestellt; die folgende Tabelle fasst hierzu die Target-Sequenzen mit Positionen innerhalb der Target-mRNA (nt-Nr.) der prominentesten Bcl-2-ASOs mit ihrer jeweiligen Kettenlänge (nt) zusammen.

**Tabelle 6-1:** Sequenz-Übersicht prominenter ASOs gegen Bcl-2 mit Sequenzlänge und Lage der Target-Sequenz innerhalb des für Bcl-2 translatierenden Bereichs.

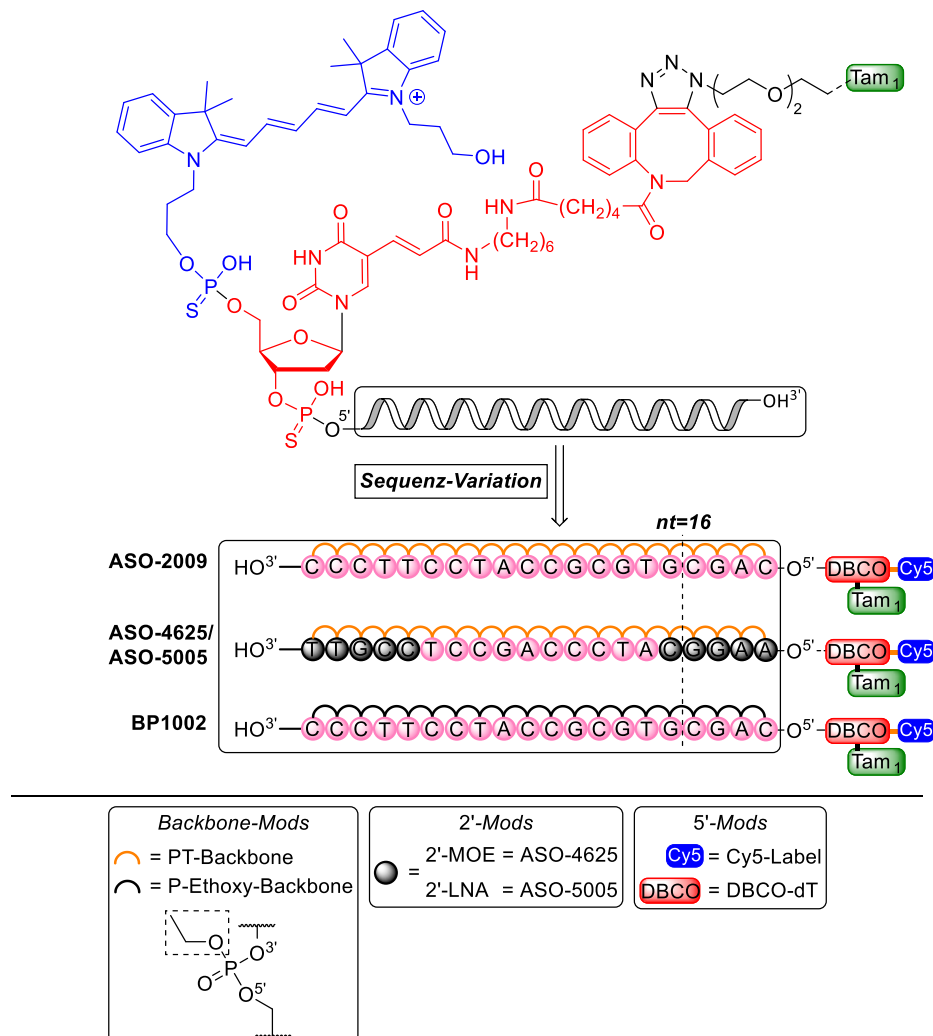
Eintrag	nt-Sequenz (5'→3')							nt	ASO-Name / Komplementär zu
1	ASO	TCT	CCC	AGC	GTG	CGC	CAT	18	Oblimersen Translations-Initiations Region
	Target	AUC	GCG	CAC	GCU	GGG	AGA		
2	ASO	CAG	CGT	GCG	CCA	TCC	TTC	20	TI-AS/BP1002 Pre-Translationsregion
	Target	GGG	AAG	GAU	GGC	GCA	CGC		
3	ASO	AAT	CCT	CCC	CCA	GTT	CAC	20	ASO-2009 Translationsregion
	Target	GGG	UGA	ACU	GGG	GGA	GGA		
4	ASO	AAG	GCA	TCC	CAG	CCT	CCG	20	ASO-4625/5005 Translationsregion
	Target	AAC	GGA	GGC	UGG	GAU	GCC		
5	ASO	CTC	CCA	ACG	TGC	GCC	A	16	SPC2996 n.a.* <sup>2</sup>
	Target	UGG	CGC	ACG	UUG	GGA	G		
6	ASO	CAC	GCA	CGC	GCA	TCC	CCG	24	PNT100 P1 Promotorregion
	Target	CAC	GGG	CGG	GGA	UGC	GCG		

\*1 nicht-translatierender Bereich \*2 abgeleitet von Oblimersen (3x MM)

Die Auswahl weiterer ASO-Sequenzen für ein Targeting der Bcl-2-mRNA mit der neu etablierten Konjugations-Plattform ist hierbei durchaus vielversprechend und aus synthetischer Sicht mit nur geringem Aufwand verbunden. Allerdings sollten folgende Punkte berücksichtigt werden. Auffällig ist, dass die Target-Sequenz von Oblimersen sich mit der Target-Sequenz der ASOs TI-AS bzw. BP1002 überschneidet. Die ersten 13 nt von Oblimersen entsprechen den letzten 13 nt der Sequenz von TI-AS bzw. BP1002. Nur 5 nt befinden sich zusätzlich vor der Translations-Initiationssequenz (Codon 1-6 des translatierenden Bereichs). Das ASO SPC2996 stellt lediglich eine Scramble-

Variante von Oblimersen dar und weist im Vergleich zu Oblimersen sogar 3 Basenmismatches in Bezug auf die Target-Sequenz (Codon 1-6) auf. ASO-2009 zielt ebenso wie Oblimersen auf den translatierenden Bereich, allerdings auf die Codons 141-147. Gemäß der Arbeit von Zangenmeister-Wittke zeigten diejenigen ASOs, welche diesen Target-Sequenzbereich avisierten, die größte Zytotoxizität.<sup>[209]</sup> Das ASO PNT100 zielt auf die P1-Promotorregion ab, dessen Target-Sequenz im nicht-translatierendem Bereich der Bcl-2 mRNA liegt und somit nicht in **Abb. 6.1** gezeigt ist. Die Sequenz erscheint nur in der beschriebenen Formulierung als Lipoplex eine Option zu sein, da nur so starke und unerwünschte Toxizitäten vermieden werden können.<sup>[225]</sup>

Aufgrund der guten bis moderaten Reduktion des mRNA- und Bcl-2-Proteinlevels in MDA-MB-231 und MCF-Zellen kommen die ASOs 4625 und 5005 als potentielle Sequenzen für eine Verwendung in der neu etablierten Konjugationsplattform in Betracht.



**Abb. 6.2:** Explorativer Ansatz für ein Screening in Bezug auf Proliferationshemmung durch Verknüpfung anderer Bcl-2-ASOs mit der ER $\alpha$ -basierten Konjugationsplattform DBCO-Tam<sub>1</sub>.



Allerdings gilt zu beachten (siehe Kapitel 2.4), dass die Ergebnisse mit transfizierten ASOs erzielt wurden. Letzter potenzielle Kandidat wäre das ASO BP1002 (*P*-Ethoxy-Modifikation), welches sich aktuell noch in der klinischen Studie Phase II befindet und vielversprechende Ergebnisse in AML-Zelllinien zeigte. Eine Testung mit der Estrogen-unabhängigen Zelllinie MDA-MB-231 und der Estrogen-abhängigen MCF-7 ist bisher nicht literaturbekannt. Hier böte sich eine komparative Untersuchung mit dem iso-sequenziellen ASO 2009 an (PT-Backbone), um den Einfluss der *P*-Ethoxy-Modifikation im direkten Vergleich zu eruieren.

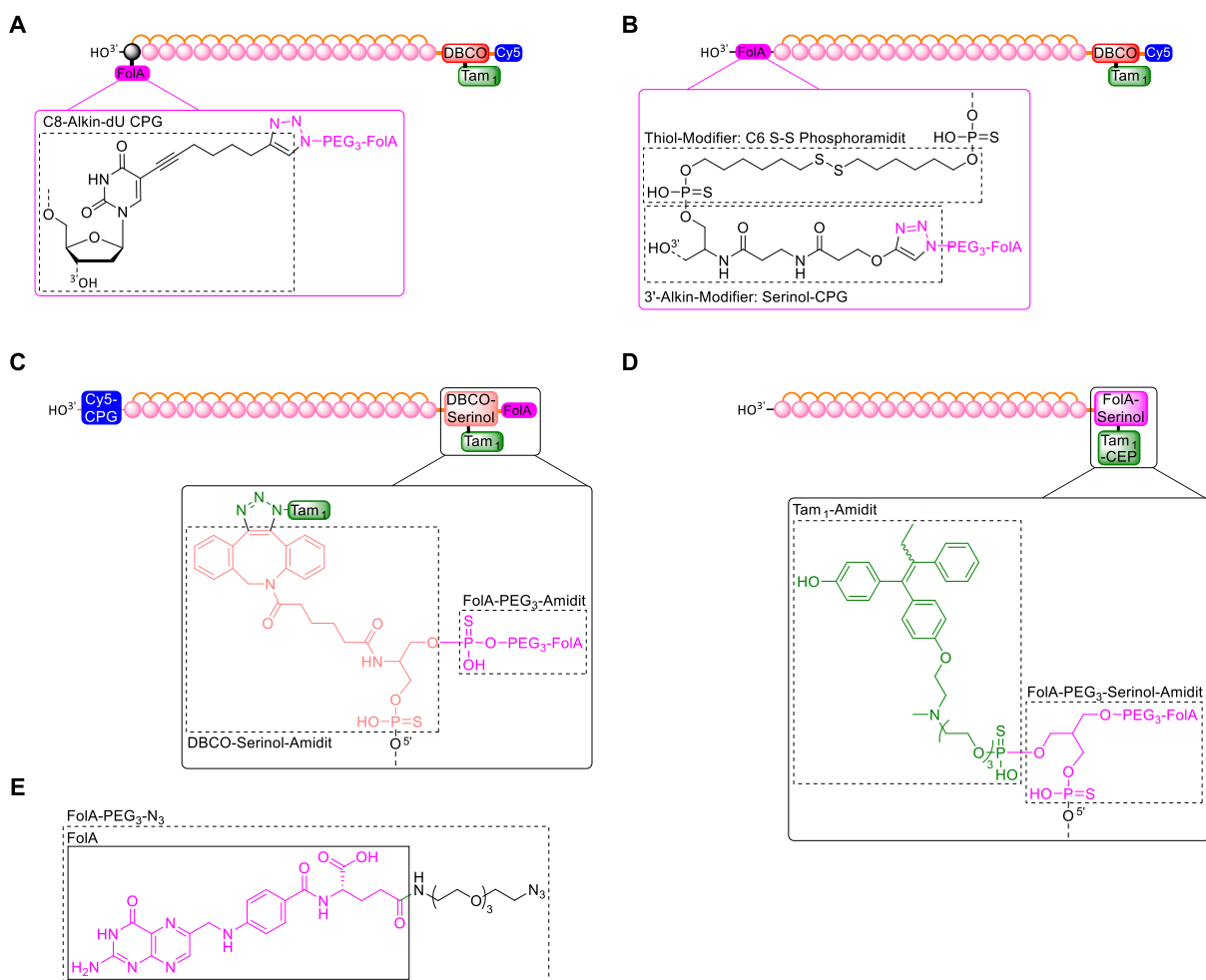
### 6.3 Erweiterung der Konjugationsplattform von BCl2-Tam<sub>1</sub>

Die Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften therapeutischer ONs hat oftmals die Steigerung der Bioverfügbarkeit von ASOs zum Ziel, welche als Nadelöhr der biologischen Aktivität dieser Wirkstoffklasse gilt.<sup>[115]</sup> Nun ist der Begriff der Pharmakokinetik als Gesamtheit aller Prozesse im Körper definiert, denen ein Arzneistoff nach Aufnahme bis zur Eliminierung aus dem Stoffwechsel unterworfen ist. Die unter dem Akronym „ADME“ zentral zusammengefassten Prozesse sind im bisherigen Stadium der *in vitro*-Testung nicht alle gleichzeitig einer Untersuchung zugänglich. Lediglich auf die Untersuchung bzw. Steigerung der Zellaufnahme der vorliegenden Hit-Verbindung **BCl2-Tam<sub>1</sub>** und der Freisetzung aus den Endosomen mit anschließendem intrazellulärem Transport kann im Weiteren eingegangen werden. Der Internalisierungsprozess von einzelsträngigen ASO-Konjugaten ist allerdings sehr komplex und mehrere Schaltstellen begrenzen die Bioverfügbarkeit bzw. den Transport solcher Strukturen, v.A. der Transport über mehrere Membranen hinweg zum Wirkort, dem Cytosol oder dem Nukleus.<sup>[18,214,398]</sup> Hierbei muss nach Gabe der ON-Therapeutika und Erreichen des Wirkortes (diese Schaltstellen sind in der *in vitro*-Testung nur schwer simulierbar) nicht nur die Außenmembran überwunden werden. Die Freisetzung der ONs aus den eingeschnürten Vesikeln, den Endosomen, wurde bereits vielfach als weiteres Nadelöhr identifiziert, worauf in Kapitel 2.2 bereits eingegangen wurde.

Zurzeit werden vier Strategien zur Steigerung der Bioverfügbarkeit, der zellulären Aufnahme und Freisetzung von ON-Therapeutika diskutiert und verfolgt.<sup>[399]</sup> Ein Ansatzpunkt stellt die bereits in **BCl2-Tam<sub>1</sub>** angewendete Konjugation mit hochaffinen Liganden dar, um Rezeptoren an der Zelloberfläche zum Zweck des aktiven Transports in die

Zielzellen zu nutzen.<sup>[1]</sup> Darauf aufbauend bietet die erweiterte Konjugation mit lipophilen, endogenen Effektor-Molekülen wie Cholesterol,  $\alpha$ -Tocopherol oder Folsäure die Möglichkeit, über die Modulation der Plasmaproteinbindung einen zusätzlichen Transportkanal für modifizierte ONs zu akquirieren bzw. die Verteilung durch unspezifische Proteinbindung zu beschränken. Wie bereits in Kapitel 2.2 und 2.3 gezeigt, wird v.A. die duale Konjugation von Cholesterol/GalNAc dazu verwendet, die Verteilung eines gegen die mRNA des Apolipoprotein B gerichteten ASOs zwischen Nieren und Leber in Bezug auf die Akkumulation in der Leber zu begünstigen.<sup>[400]</sup>

In Brustkrebszellen hingegen ist der Folatrezeptor- $\alpha$  (FR $\alpha$ ) neben ER $\alpha$  überexprimiert und wird bspw. als Indikator für die Rückfallwahrscheinlichkeit herangezogen.<sup>[401,402]</sup>



**Abb. 6.3:** Vorschläge zu Strukturmotiven für ein doppeltes Targeting von ER $\alpha$  und FR $\alpha$ . Plattformbasierte Syntheseoptionen (**A**, **B**) beruhen auf der Verwendung kommerziell erhältlicher Amidite und CPG-Materialien, wohingegen ein Monomer-basierter Ansatz (**C**, **D**) die Synthese von maßgeschneiderten Phosphoramiditen voraussetzt. Ein Folsäure-PEG-Spacer zur on-bead-Kupplung (**E**) ist bereits kommerziell verfügbar.

Zur Verbesserung der Aufnahme in Mammakarzinomzellen, wie z.B. in T47D-Zellen, könnte das Vorhandensein von GPR-FR $\alpha$  daher im Sinne eines doppelten Targetings mit in **BCI2-Tam<sub>1</sub>** vorhandenen ER $\alpha$ -Antagonisten und Folsäure (FolA) ausgenutzt werden. Hierbei bieten sich verschiedene Anknüpfungsmöglichkeiten für einen Folsäure-Liganden auf Basis der Struktur von **BCI2-Tam<sub>1</sub>** an. Dohmen wählte die Konjugation von FolA am 5'-Ende des sense-Strangs einer siRNA über einen spaltbaren PEG-Spacer mit Disulfidbrücke an der Festphase (**Abb. 6.3, B**)<sup>[403]</sup>, Carell hingegen eine postsynthetische Variante in Lösung durch Kupfer-katalysierte Klick-Reaktion zwischen einer am 3'-Ende des sense-Strangs implementierten C<sub>8</sub>-Alkin-dU-Einheit mit einem TEG-Azid-dekorierten Folsäure-Liganden (**Abb. 6.3, A**).<sup>[404]</sup> Unter Verwendung eines speziellen Propargyl-Phosphoramidites ist auch der Einbau an verschiedenen Positionen innerhalb des Backbones über eine kupfer-katalysierte Klick-Reaktion an der Festphase denkbar.<sup>[61]</sup> Allerdings sei darauf hingewiesen, dass es sich bei allen Beispielen um Modifikationen von siRNAs handelt. Zur Gewährleistung einer potenziellen RNase H-Aktivität sollte im Fall von ASOs eine Modifizierung der Gap-Region nicht die erste Wahl sein.<sup>[19]</sup> Je nach Wahl des Synthese-Ansatzes ergeben sich nun mehrere Möglichkeiten zur Realisierung eines solchen dualen ON-Konjugats. Der aus synthetischer und zeitlicher Sicht geringste Aufwand dürfte unter Beibehaltung eines plattformbasierten Ansatzes zu erwarten sein. Hierbei kann auf kommerziell erhältliche Bausteine mit etablierten Syntheseprotokollen zurückgegriffen werden, wobei z.B. auch die Anknüpfungsstelle für einen Azid-terminierten Folsäure-Liganden berücksichtigt werden kann (3'-Ende oder 5'-Ende, vgl. **Abb. 6.3, A-C**).

So ist z.B. der am 3'-Ende der G3139-Sequenz vorliegende Nukleosid-Baustein passenderweise eine dT-Einheit. Ein CPG-gebundenes Derivat von dU, welches in Position 5 des Pyrimidinrings eine terminale C<sub>8</sub>-Alkynyl-Einheit trägt, ist kommerziell erhältlich. Die Verwendung dieses festphasengebundenen Startnukleosids (**Abb. 6.3, A**) ermöglicht die Implementierung sowohl des **Tam<sub>1</sub>**-Bausteins als auch des ebenfalls kommerziell erhältlichen FolA-PEG-N<sub>3</sub>-Bausteins (vgl. **Abb. 6.3, E**) durch plattformbasierte, orthogonale Klick-Chemie an der Festphase (vgl. **Abb. 6.3, A**). Hierbei steht allerdings die dT-Base für eine Watson-Crick Basenpaarung mit dem mRNA-Target nicht mehr zur Verfügung, zudem ist die (zusätzliche) Triazol-Bindung *in cellulo* nicht mehr spaltbar. Interessant erscheint daher in diesem Zusammenhang die Verwendung eines zellulär

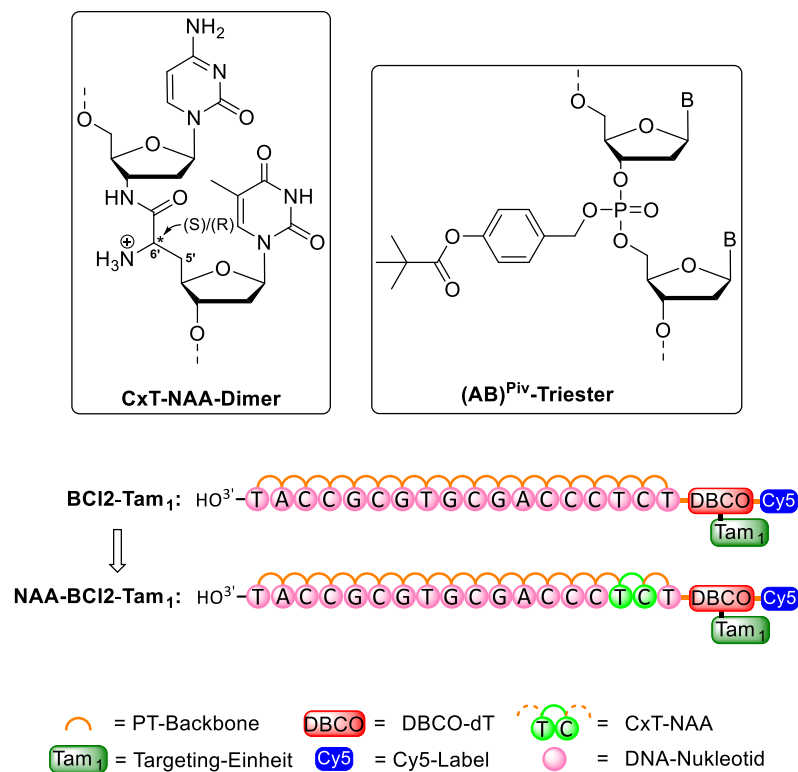
spaltbaren Linkers wie in **Abb. 6.3, B** gezeigt. Als Startpunkt der SPOS wird ein Serinol-CPG verwendet, an welches zunächst ein C<sub>6</sub>-Alkylspacer mit Disulfidbrücke (C<sub>6</sub> S-S) gekuppelt wird. Bereits vor der SPOS könnte die Modifizierung des CPG-Materials und damit des 3'-Endes mit FOLA-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> unter kupferhaltigen Bedingungen erfolgen, um die Integrität des DNA-Einzelstrangs nicht zu gefährden. Analog hierzu ist die Möglichkeit der Anbindung von FOLA-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (vgl. **Abb. 6.3, E**) *post*-SPOS auch unter Verwendung der von Carell etablierten Protokolle möglich.<sup>[193,347,404]</sup> Im Falle eines Transports des avisierten dualen Konjugats in die Zielzellen ist eine Spaltung der Disulfidbrücke unter reduktiven Bedingungen, bspw. durch Glutathion möglich. Somit wäre ein direkter Vergleich der Internalisierung mit der Hit-Verbindung **BCI2-Tam<sub>1</sub>** möglich, der Benefit des dualen Targetings könnte somit direkt ausgelesen werden. In Anlehnung an die Arbeit von Wada und Mitarbeitern zur Synthese des dualen Cholesterol/GalNAC-Konjugats können die Target-Einheiten für ER $\alpha$  und FR $\alpha$  auch in räumliche Nähe am 5'-Ende zusammengebracht werden, wobei auf einen monomerbasierten Ansatz zurückgegriffen werden muss (**Abb. 6.3, C**). Der zur Installation von **Tam<sub>1</sub>** benötigte DBCO-dT-Spacer kann hierbei auf ein Minimum unter Verwendung des alternativen (kommerziell erhältlichen) DBCO-Serinol-Spacers verschlankt werden. Hierdurch entfällt auch das zusätzliche dT-Nukleotid, wodurch die G3139-Sequenz originär ohne zusätzliche Basen verwendet werden kann. Das Cy5-Label kann über ein entsprechendes CPG-Derivat am 3'-Ende angebracht werden, die Bestimmung von V<sub>2</sub>-Werten zur Reaktionsverfolgung ist dann allerdings aufgrund der MMTr-Schutzgruppe nicht mehr möglich (vgl. Kapitel **4.5.1**). Über den DMTr-geschützten primären Alkohol der Serinol-Einheit ist dann die Anknüpfung eines FOLA-PEG<sub>3</sub>-Phosphoramidts möglich, welches nach der patentierten Vorschrift von Barta und Hodges hergestellt werden kann.<sup>[405]</sup> Ebenfalls im Patent beschrieben ist die Synthese eines FOLA-PEG<sub>3</sub>-Serinol-Phosphoramidts, welches die Anknüpfung von **Tam<sub>1</sub>** ohne zusätzliche Linker-Einheit ermöglicht (**Abb. 6.3, D**). Dieser vollständig monomerbasierte Ansatz setzt die Synthese von Phosphoramiditen beider Targeting-Einheiten voraus und ist vermutlich am aufwendigsten, allerdings benötigt dieses Konstrukt ein Minimum an Spacer-Chemie. Ist ferner der Grad der Internalisierung einer solchen dualen Targeting-Einheit bekannt oder die Implementierung des Cy5-Spacers nicht gewünscht, bietet das in **Abb. 6.3 D** gezeigte Konstrukt vermutlich die kompakteste Option. Dieses neue Template könnte bei ausreichender Menge der

**Tam<sub>1</sub>**- und Fola-PEG<sub>3</sub>-Serinol-Phosphoramidite dazu verwendet werden, verschiedene BCl<sub>2</sub>-ASOs nebeneinander zu testen, um die in T47D-Zellen aktivste Sequenz zu eruieren.<sup>[221]</sup> Unter Berücksichtigung der von Barta und Hodges gewählten Schutzgruppen-Strategie könnte das Internalisierungsverhalten dieser dualen ON-Konjugate und damit das „Internalisierungs-Potenzial“ des dualen Templates unabhängig von einem (meist Basen-sensitiven) Fluoreszenzlabel über einen Luziferase-Reporter-Gen-Assay bestimmt werden. Vorteilhaft ist hier die Spezifität des von den Dioxetanen von Luciferin emittierten Lichts, die hohe Empfindlichkeit der Lumineszenzmessung und die apparativ überschaubare Durchführung der Messung.<sup>[406–408]</sup>

Ein dritter Ansatzpunkt besteht in der Modifizierung des Backbones zum Zweck der Erhöhung von Nukleasestabilität und Ausnutzung von Proteinbindung(en). Dies wurde durch Implementierung des mittlerweile als Standard geltenden PT-Backbones bereits genutzt. Das PT-Backbone verleiht dem ON zwar einen gewissen Grad an Lipophilie, allerdings stellt die polyanionische Struktur ein zentrales Problem beim Transport durch die Zellmembran, vor allem der endosomalen Membran da. Sollte anhand von hochauflösenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen tatsächlich ein Trapping von **BCl<sub>2</sub>-Tam<sub>1</sub>** in den Endosomen festgestellt werden, so bieten folgende Optionen einen Ansatzpunkt, sich dem Problem anzunähern. Hierbei sollte im Vorfeld entschieden werden, welche der Vorschläge unter Berücksichtigung des zeitlichen als auch synthetischen Aufwands adäquat erscheint. Eine Option böte die Implementierung der im Arbeitskreis Ducho etablierten Nukleosylaminosäuren (NAA) als modularen Baustein in der SPOS (**Abb. 6.4**).<sup>[409–412]</sup> Diese *high carbon nucleosides* verfügen über eine protonierbare primäre Aminogruppe in der stereogenen C-6'-Position des Furanose-Rings und kompensieren somit eine negative Nettoladung unter Ausbildung eines (partiell) zwitterionischen Backbones. Die NAA-Modifizierung verleiht ferner Nukleasestabilität, allerdings auf Kosten der Duplexstabilität ( $\Delta T_m = -4 \text{ °C/Mod.}$ ).<sup>[186]</sup> Diese Bausteine werden als Phosphoramidite von Dimeren in der auf P(III)-Amiditen aufbauenden SPOS eingesetzt, sind allerdings aufwendig in ihrer Herstellung. Bisher sind die Dimere TxT, AxT sowie CxT zugänglich, wobei die Phosphoramidit-Gruppe am 3'-Ende der T-Base installiert ist. In Bezug auf die Oblimersen-Sequenz G3139 käme somit lediglich der Einbau des NAA-Bausteins CxT als Ersatz der Nukleotide an Position 2 und 3 vom 5'-Ende aus betrachtend in Frage (vgl. **Abb. 6.4**).

Die Kompensation der negativen Ladung durch den Einbau kationischer Gruppen reduziert allerdings nicht die Gesamtzahl der Ladungen innerhalb des Backbones. Zur Steigerung der lipophilen Eigenschaft böte sich ferner die Verwendung der in der Arbeitsgruppe behandelten (AB)-modifizierten Acyloxybenzyl-Bausteine an, welche im Sinne eines Prodrug-Ansatzes die negativ geladene Phosphatgruppe nach Hydrolyse des Triesters wieder freisetzen. Potenziell käme hierbei die Pivaloyloxybenzyl-Maskierungseinheit in Frage, welche eine HWZ von ca. 5 h in humanem Plasma aufweist.<sup>[413]</sup> Allerdings setzt die Verwendung dieser basenlabilen Prodrug-Strukturen die Verwendung einer speziellen Schutzgruppenstrategie mit angepassten Startnucleosiden voraus, was aktuell noch Gegenstand von Forschungsarbeiten ist.

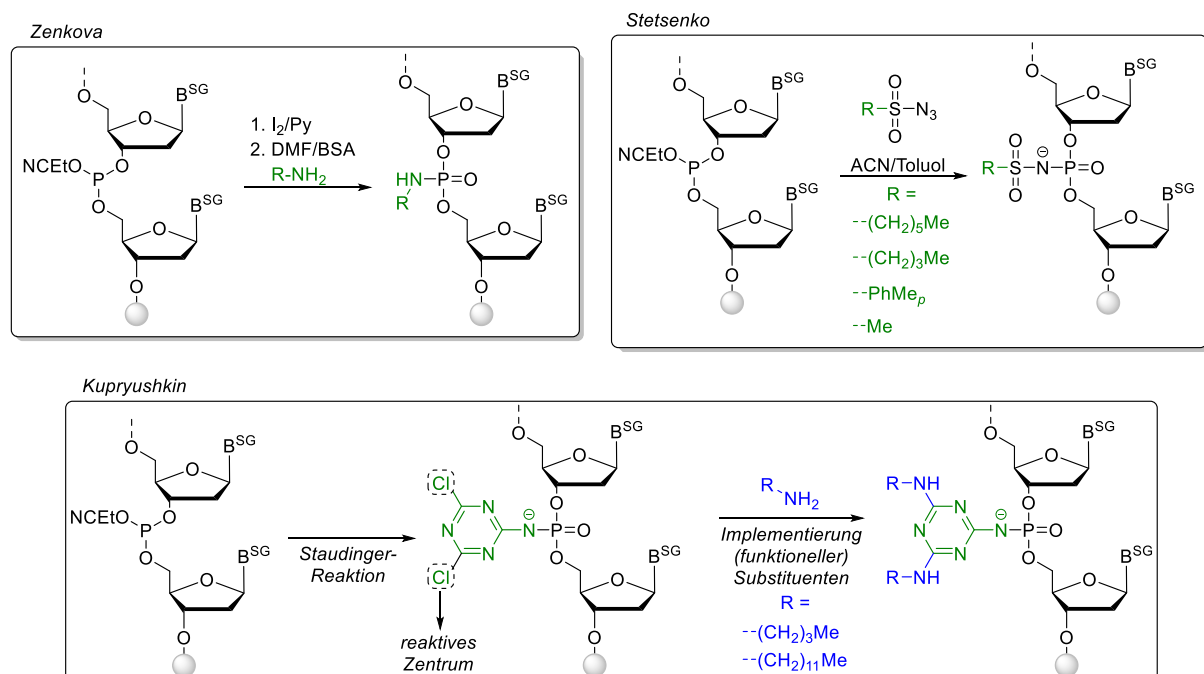
Eine seit Jahrzehnten erprobte Backbone-Modifikation stellen die von Fröhler und Letsinger entwickelten Phosphoramidate da.<sup>[155,414,415]</sup> Genauer böten Phosphoramidate und Phosphoramidate der zweiten Generation auf Basis der aktuellen Arbeiten von Stetsenko<sup>[416–420]</sup>, Zenkova<sup>[421]</sup> und Kupryushkin<sup>[422]</sup> eine vielversprechende, mit über-



**Abb. 6.4:** Mögliche Optionen zur Modifizierung des Backbones der Hit-Verbindung **BC12-Tam<sub>1</sub>** durch Implementierung eines CxT-NAA-Bausteins oder AB<sup>Piv</sup>-Bausteins.

schaubarem Zeit- als auch Arbeitsaufwand verbundene Option, die pharmakokinetischen Eigenschaften von **BC12-Tam<sub>1</sub>** zu verbessern. Ein entscheidender Vorteil der

genannten Arbeiten im Vergleich zu den Pionierarbeiten von u.A. Letsinger liegt in der Verwendung konventioneller P(III)-Amidit-Bausteine anstelle der H-Phosphonat-Monomere, sodass kein Wechsel der in der SPOS verwendeten Synthesechemie notwendig ist. So kann ausgehend von den intermediären Phosphittriestern der SPOS das entsprechende Phosphoramidat<sup>[423]</sup> durch Aktivierung der festphasengebundenen und wachsenden ON-Kette mit einer wasserfreien Lösung von Iod in Pyridin und anschließender Oxidation mit dem gewünschten aliphatischen Amin in einem Gemisch von DMF/Bis(trimethylsilyl)acetamid erhalten werden. Die Oxidation kann hierbei sequenziell und muss nicht zwingend global erfolgen, sodass verschiedene Kombinationen an Backbone-Modifizierungen möglich werden.<sup>[421]</sup> Über diesen simplen Wechsel des Oxidations-Protokolls sind Alkylketten verschiedener Länge einführbar und das Backbone kann somit zu einem gewünschten Grad hydrophobiert werden. So konnte in A549-, KB-8-5- und HEK293-Zellen die Akkumulation von Duplices solcher als *transport oligonucleotides* (tON) bezeichneter ASO-Gegenstränge mit den entsprechenden, biologisch aktiven Sequenzen in gleichem Maße festgestellt werden, wie es unter Verwendung des als Goldstandard geltenden Transfektionsmittels Lipofectamin™ möglich ist. Hierbei waren bereits drei Dodecyl-Einheiten am 5'-Ende des tON ausreichend, um



**Abb. 6.5:** Generelle Syntheschemata zur Darstellung aliphatischer Phosphoramidate nach Zenkova, zur Darstellung *N*-sulfonylamidophosphat- und Triazinylamidophosphat-modifizierter ONs.

diesen Effekt zu erzielen. Von besonderem Interesse gelten zurzeit Kombinationen von PT-modifizierten Backbone-Abschnitten mit akzeptorsubstituierten PAs, v.A. den Methyl-Phosphoramidaten (MsPA) nach Stetsenko. Diese Strukturen sind durch Staudinger-Reaktion von Sulfonylaziden mit den festphasengebundenen Phosphittriestern zugänglich.<sup>[424]</sup> Da durchschnittlich in einem PT-ASO 10-13 PT-Motive für eine ausreichende Bindung des mRNA-Targets und zur Gewährleistung von Nukleasestabilität ausreichend sind, besteht ein gewisser Grad an Freiheit, bei längeren ASOs zusätzliche Backbone-Modifizierungen vorzunehmen.<sup>[425]</sup> Permutierende Kombinationen von MsPA- und PT-Modifikationen zeigten hierbei sowohl in *in vitro*- als auch in *in vivo*-Tests eine stärkere Aktivierung der RNase H sowie eine verringerte unspezifische Proteinbindung bei gleichzeitiger Steigerung des therapeutischen Index im Vergleich zu vollständig PT-modifizierten ASOs.<sup>[424,426]</sup> Interessanterweise mimikrieren MsPA-Modifikationen die negative Ladung des Backbones am Stickstoff der Amidat-Gruppe, sodass auch im geringen Maße inflammatorische sowie toxische Effekte beobachtet werden konnten. Dennoch gelten MsPA/PT-Kombinationen in Bezug auf das Design von Gapmer-ASOs als zukunftsweisend.<sup>[424]</sup> Auf der Staudinger-Reaktion aufbauend entwickelte die Gruppe um Kupryushkin das Triazinylamidophosphat-Motif, welches als isolierbares Intermediat zunächst die negative Ladung der Phosphatgruppe als Amidophosphit-Spezies neutralisiert. Durch Reaktion der festphasengebundenen Phosphittriestere mit 2-Azido-4,6-dichlor-1,3,5-triazin kann eine festphasengebundene Plattform geschaffen werden, an welcher zusätzlich durch Substitutionsreaktion der in Position 4 und 6 befindlichen Chloratome weitere Stickstoff-Nucleophile angebracht werden können. In der Arbeit von Kupryushkin wurden aliphatische Amine nach dem Vorbild von Zenkova gewählt, allerdings sind auch andere Effektor-Moleküle mit primärer Amino-Gruppe denkbar, welche im Backbone über die Amidophosphat-Gruppe angebunden werden könnten. Die erhaltenen Triazinylamidophosphat-ONs sind im Vergleich zu klassischen, aliphatischen Phosphoramidaten in saurem Medium stabil und wurden von HEK293T-Zellen und T98G-Zellen ohne Transfektionsmittel (Lipofectamin™) im gleichen Maße internalisiert wie die mit Transfektionsmittel inkubierte Kontrolle. Zudem bieten diese Modifikationen die größte Nukleasestabilität am 5'-Ende des ASO und zeigen eine nahezu unveränderte Bindung des mRNA-Targets, wie anhand von Schmelzpunktexperimenten gezeigt werden konnte.<sup>[422]</sup>



---

Die vierte und letzte Strategie zur Verbesserung von Bioverfügbarkeit und Internalisierung von ON-Therapeutika stellt die nanopartikuläre Formulierung derselben als verkapselte Liposomen, anorganische Nanopartikel oder extrazelluläre Vesikel dar. Ausführungen auf diesem Gebiet würden den Rahmen der vorliegenden Arbeit weit überschreiten, weshalb abschließend an dieser Stelle auf interessante Übersichtsartikel verwiesen wird.<sup>[117,171,427,428]</sup> Zuletzt böte der Vergleich der Proliferationshemmung durch verschiedene Bcl-2-ASOs<sup>[221]</sup> (vgl. **2.4**) unter Verwendung der in **BCI2-Tam<sub>1</sub>** verwendeten Plattformchemie eine Möglichkeit, das *best-in-class*-ASO für die Behandlung in Brustkrebszelllinien T47D zu identifizieren.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeines

#### 7.1.1 Präparative Vorgehensweisen

Alle Reaktionen wurden, soweit nicht anders vermerkt, in mehrfach ausgeheizten Glasapparaturen unter Verwendung der Schlenktechnik durchgeführt. Als Inertgas diente über Phosphorpentoxid getrockneter Stickstoff (5.0). Zur Reaktionsführung bei tiefen Temperaturen ( $T < 0\text{ °C}$ ) wurden geeignete Kältemischungen (NaCl in Eis, Trockeneis/Aceton, Trockeneis/Isopropanol, Aceton/flüssiger Stickstoff) verwendet.

#### 7.1.2 Edukte und Reagenzien

Alle Edukte und Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen *ABCR*, *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Fluka*, *TCI*, *Merck*, *Roth*, *Sigma Aldrich* und *VWR* oder von Dienstleistern des *Zentralen Chemikalienlagers der Universität des Saarlandes* in Synthesequalität bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Phosphoramidit-Reagenzien sowie weitere Reagenzien und Lösungen für die festphasengestützte Oligonucleotid-Synthese wurden über die Firma *Glen Research* in höchstmöglicher Qualität bezogen. Gelöste cytosolische Estrogenrezeptoren für den Rezeptorbindungs-Assay wurde von der Firma *Thermo Fischer Scientific* aus der PolarScreen-Reihe (A15882) bezogen. Coumestrol als auch Standardverbindungen zur Negativkontrolle für den Assay wurden von der Firma *Cayman Chemical* in höchstmöglicher Qualität bezogen. Kommerzielle Oligonucleotide zur Verwendung in Schmelzpunktexperimenten oder weiteren zellbiologischen Assays wurden von der Firma *Sigma Aldrich* bezogen; hierbei wurde eine firmenseitige HPLC-Reinigung veranlasst, die Produkte wurde in trockener Form geliefert und in 1X TE-Puffer resolubilisiert. Triethylamin ( $\text{NEt}_3$ ) wurde über das Zentrale Chemikalienlager im Reinheitsgrad „zur Analyse“ bezogen, entgast und über Molekularsieb (4 Å) getrocknet und gelagert.

#### 7.1.3 Lösungsmittel

Folgende Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und vor ihrer Verwendung für Reaktionen oder säulenchromatographische Aufreinigungen ohne Inertgas an einem Großrotationsverdampfer frisch destilliert: Petrolether (60/40), Ethylacetat, Dichlormethan. Alle weiteren Lösungsmittel wurden mit dem Reinheitsgrad „HPLC-

Grade“ bezogen und ohne weiter Aufreinigung verwendet. Für Synthesen in wässrigem Milieu wurde bi-destilliertes Wasser verwendet. Für Analysen im Wässrigen oder zur Darstellung von Pufferlösungen sämtlicher Art wurde über Umkehrosiose gereinigtes Wasser verwendet ( $R > 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ).

#### 7.1.4 Absolute Lösungsmittel

Alle Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden mit absoluten Lösungsmitteln unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. Hierfür wurden folgende Lösungsmittel mit dem Reinheitsgrad *HPLC-Grade* bezogen und an einem Lösungsmittelaufreinigungssystem der Firma *MBraun* (Model *MB SPS 800*) getrocknet: DCM, THF, DMF, Diethylether, Acetonitril. Die Lösungsmittel wurden jeweils über geeignetem, aktiviertem Molsieb (Acetonitril, Dichlormethan, Dimethylformamid: 0.3 nm; Diethylether, Tetrahydrofuran: 0.4 nm) aufbewahrt. Methanol, Pyridin und Toluol wurden mit dem Reinheitsgrad *Extra Dry over Molecular Sieve, AcroSeal®* von der Firma *Acros Organics* bezogen. Entnommene Volumina wurden über aktiviertem Molsieb (Methanol: 0.3 nm, Pyridin; Toluol: 0.4 nm) statisch getrocknet (24 h) und vor der Benutzung entgast. Das bei 120 °C vorgetrocknete Molsieb wurde vor der Verwendung unter Zuhilfenahme einer Heißluftpistole im Hochvakuum (mind.  $1 \cdot 10^{-2}$  mbar) für min. 2 h aktiviert.

#### 7.1.5 Manuelle Chromatographie

##### 7.1.5.1 Dünnschichtchromatographie

Zur Reaktionskontrolle wurden Kieselgel-beschichtete Aluminiumplatten mit Fluoreszenzindikator (Silica Gel 60 F254) der Firma *VWR* unter Kammersättigung verwendet. Die Detektion UV-aktiver Substanzen wurde unter Zuhilfenahme einer UV-Lampe bei 254 nm resp. 365 nm vorgenommen. Substanzen, welche nicht UV-aktiv sind, wurden mithilfe folgender Tauchbäder detektiert:

##### *Vanillin-Schwefelsäure-Lösung*

4.00 g Vanillin, 25 mL konz. Schwefelsäure, 80 mL Eisessig, gelöst in 680 mL Methanol.

##### *Ninhydrin-Lösung*

0.30 g Ninhydrin, 3.0 mL Eisessig, gelöst in 100 mL Butanol.

### *Kaliumpermanganat-Lösung*

1.00 g Kaliumpermanganat, 6.00 g Natriumcarbonat, 1.5 mL NaOH<sub>aq.</sub> (5%, w/v) gelöst in 100 mL Wasser.

#### 7.1.5.2 Flash-Chromatographie

Zur Säulenchromatographie unter Flash-Bedingungen wurde Kieselgel der Firma *VWR* verwendet (Si-60, 0.040-0.063 mm, 230-400 mesh), welches zunächst im Starteluenten suspendiert und in die Säulen gefüllt wurde. Säulen ohne Fritte wurden zudem zunächst mit einem Wattebausch und einer 2 cm dicken Schicht aus gereinigtem Quarzsand (*ZChL*) am Säulenauslass versehen. Das zu reinigende Substanzgemisch wurde im Eluenten gelöst (sofern möglich) oder auf Kieselgel im Verhältnis 10:1 (w/w) aufgezogen. Die Trennung wurde mit konstantem Druck unter Zuhilfenahme einer Aquariumpumpe mit Umgebungsluft durchgeführt und die Fraktionen in dem Querschnitt und der Fließgeschwindigkeit der Säule angepassten Reagenzgläsern gesammelt.

### **7.1.6 Instrumentelle Analytik**

#### 7.1.6.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten der Firma *Bruker* aufgenommen: *Avance-500 Ultra Shield<sup>TM</sup> (B-ACS-60 Autosampler)*, *Avance-DRX-500* sowie an einem *Avance-III-500* mit TCI Cryo-Probenkopf (<sup>1</sup>H-NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 126 MHz, <sup>31</sup>P-NMR: 162 MHz). Die Restprotonensignale der verwendeten deuterierten Lösungsmittel dienten als interner Standard. Alle <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden <sup>1</sup>H-entkoppelt aufgenommen. Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen, sofern nicht anders deklariert. Die chemische Verschiebung ( $\delta$ ) ist in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten in Hertz (Hz) auf die erste Nachkommastelle (0.1 Hz) gerundet. Zur Unterscheidung doppelter Signalsätze (im Falle von stereoisomeren Gemischen) in <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurde dem Isomer, welches im Unterschuss vorlag hinter der Nummer ein hochgestelltes i (!) zugewiesen. Protonen von Methylengruppen in Nukleosiden, welche basisliniengetrennte Signale aufweisen, werden mit den Deskriptoren „a“ und „b“ unterschieden, wobei dem hochfeldverschobenen Proton der Deskriptor „a“, dem tiefeldverschobenen der Deskriptor „b“ zugeordnet wird. Doppelte Signalsätze, welche im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum nicht basisliniengetrennt sind und daher als einfacher Peak erscheinen, sind als „br“ (breit) angegeben. Die Zuordnung der Signale erfolgte unter

Zuhilfenahme von  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^1\text{H}$ -COSY, HSQC- und HMBC-Spektren. Die koppelnden Kerne wurden im Falle von  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -Korrelationen hierbei nicht als solche bezeichnet. Die Spektren wurden mit der Software *ACD/NMR Processor Academic Edition, Version 12.01* ausgewertet und dargestellt.

#### 7.1.6.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von Kleinmolekülen

ESI-Massenspektren wurden an einem Gerät der Firma *Thermo Scientific* mithilfe der Modellausstattung *Dionex Ultimate 3000* (Degasser, Pumpe, Autosampler) aufgenommen. Hochauflösende Massenspektren unter Elektrosprayionisation (ESI-HRMS) im Positiv- und Negativmodus für Kleinmoleküle wurden in der Fachrichtung Pharmazie der Universität des Saarlandes an einem Gerät der Firma *Thermo Scientific*, Modell *Ultimate 3000* mit einem DAD-Detektor 3000 (RS) und einem MWD-Detektor 3000 (RS), einer *Accucore TM RP-Phenyl-X* (2  $\mu\text{m}$ , 100 x 3 mm) Säule und einem *Thermo Scientific Q Exactive* ESI-Massenspektrometer mit *Orbitrap<sup>TM</sup>*-Detektor von Steffanie Weck aufgenommen. Die Spektren wurden mit der Firmensoftware *Freestyle 1.7* ausgewertet.

#### 7.1.6.3 Massenspektrometrische Charakterisierung von Oligonucleotiden und ihrer Konjugate

Massenspektren von Oligonucleotiden und ihrer Konjugate wurden mit freundlicher Unterstützung der Servicestelle Massenspektrometrie des Arbeitskreis Prof. Dr. Christopher Kay von Philipp Jochum unter Anleitung von Dr. Klaus Hollemeyer an einem FT-ICR der Firma *Bruker* (Model *SolariX 7 Tesla*) aufgenommen. Zur Ionisierung wurde die Elektrosprayionisation im Negativmodus verwendet. Hierzu wurden Stammlösungen der Oligonucleotide in ultrareinem Wasser ( $R > 18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$  bzw.  $\kappa = 0,055 \mu\text{S/cm}$ ) zu 100 pmol/ $\mu\text{L}$  angesetzt und auf 2 pmol/ $\mu\text{L}$  ( $\approx 10 \mu\text{g/mL}$ ) in  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (1:1, v/v, 5 mM  $\text{NEt}_3$ ) verdünnt. Die Proben wurden mittels einer Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 120  $\mu\text{L/h}$  in das Massenspektrometer überführt. Die Einstellungen des Massenspektrometers waren hierbei wie folgt:

Zur Ionisation der Proben wurde eine Spannung von 4.5 kV an der Spitze der Kapillare und eine von -0.5 kV am Ende der Kapillare angelegt. Der Druck des zur Trocknung angelegten Stickstoffs betrug 1.0 bar, der Durchfluss betrug 4.0 L/min, die Temperatur des Gases betrug 220 °C. Während des Ionentransfers lag am Ende der Kapillare eine Spannung von -200 V, an der Deflektorplatte eine Spannung von -180 V, am ersten

Funnel eine Spannung von -100 V und am ersten Skimmer eine Spannung von -15 V an. Die Funnel-RF-Amplitude beträgt 150 Vpp. Die Frequenz des Oktopols betrug 5 MHz bei einer RF-Amplitude von 300 Vpp. Die Flugzeit in der Transferoptik betrug 1 ms bei einer Frequenz von 4 MHz und eine RF-Amplitude von 410 Vpp. Der Gasfluss lag hierbei bei 32%. Die Spannung am Transferausgang der Infinity-Zelle betrug 14 V, am Eingang 7 V, am Seitentritt 0 V, der Seitentrittversatz betrug 1.5 V, die Spannung an der vorderen und hinteren Auffangplatte betrug -0,5 V. Die Sweep Excitation Power lag bei 12%. Im Hexapol wurden die Ionen für 0.4 s akkumuliert. Der Messbereich betrug 100-2.500 m/z. Das Gerät wurde mit Natriumtrifluoracetat (0.01 mg/mL) kalibriert. Die Spektren wurden mit der *FTMS-Control* Software (*Bruker*, Version 5.0) aufgenommen. Die Auswertung verschiedener Ladungszustände und die Dekonvolution wurden mithilfe der *Compass Data Analysis* Software (*Bruker*, Version 5.0) durchgeführt.

#### 7.1.6.4 Infrarotspektroskopie (IR)

IR-Spektren wurden an einem Fouriertransformations-Infrarot-Spektrometer (FTIR) der Firma *Bruker* (Model *Alpha*) mit einer integrierten *PlatinumATR*<sup>®</sup>-Einheit der Firma *Bruker* gemessen. Angegeben sind die Wellenzahlen  $\tilde{\nu}$  in  $\text{cm}^{-1}$  der 10 Banden mit den intensivsten Transmissionen. Die Kalibrierung des Spektrometers erfolgte über die Polystyrolbande bei  $1601 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 7.1.6.5 UV-Vis-Spektroskopie an Kleinmolekülen

UV-Vis-Spektren wurden mithilfe eines Spektrophotometers der Firma *Varian* (Model *Cary-100 BIO*) aufgenommen. Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 800 nm bis 200 nm mit einer maximalen Extinktion von 1.5 gemessen. Angegeben sind die Wellenlängen der Absorptionsmaxima  $\lambda_{\text{max}}$ . Es wurde gegen einen Blank des entsprechenden Lösungsmittels in einer Quarzglas-Küvette der Firma *Hellma* (Modell *Halb-Mikro-Küvette 108-QS*, 10 mm Schichtdicke) gemessen.

#### 7.1.6.6 UV-Vis-Spektroskopie an Oligonucleotiden

Oligonucleotide und ihre Konjugate wurden an einem *NanoDrop 200* Spektrophotometer der Firma *Thermo Fisher* vermessen. Zur Konzentrationsbestimmung vor der Aufreinigung wurde ein Aliquot der Entschützungslösung (10  $\mu\text{L}$ ) zunächst im Verhältnis 1:9 mit TE-Puffer (1X) verdünnt. Zur Konzentrationsbestimmung und Quantifizierung nach

der Aufreinigung wurden die getrockneten Oligonucleotide zunächst in 300  $\mu\text{L}$  TE-Puffer (1X) gelöst und ein Aliquot (10  $\mu\text{L}$ ) vor der Messung im Verhältnis 1:9 mit TE-Puffer (1X) verdünnt (Gesamtvolumen der Messlösung: 100  $\mu\text{L}$ ) um eine Messung im linearen Bereich des Gerätes zu gewährleisten. Der Messbereich wurde zwischen 190-340 nm gewählt und die Konzentration der Lösung über die Extinktion im Absorptionsmaximum der Nucleobasen (260 nm) bestimmt. Hierfür wurde der Extinktionskoeffizient mithilfe eines Online-Tools ([www.atdbio.com/tools/oligo-calculator](http://www.atdbio.com/tools/oligo-calculator)) für die jeweiligen Sequenzen in Anpassung an den Cy5-Farbstoff bestimmt und zur Ausbeuteberechnung herangezogen. Vollspektren gereinigter Oligonucleotide und ihrer Konjugate wurden im Bereich 190-840 nm bei einem Extinktionswert von maximal 1.5 bei 260 nm aufgenommen und auf die Extinktion bei 340 nm referenziert. Alle Messungen wurden bei einer Schichtdicke von 10 mm durchgeführt. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte auf Basis des Lambert-Beerschen Gesetzes gemäß der folgenden Formel:

$$n[\text{nmol}] = \frac{E_{260\text{nm}} \cdot V_{\text{Mess}}[\mu\text{L}]}{\epsilon_{\text{Oligo}}[\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}] \cdot d[\text{cm}]} \cdot F$$

$E_{260\text{nm}}$ : gemessene Extinktion bei 260nm

$V_{\text{Mess}}$ : Gesamtvolumen der Messlösung in  $\mu\text{L}$  (100  $\mu\text{L}$ )

$\epsilon_{\text{Oligo}}$ : molarer Extinktionskoeffizient des Oligonucleotids in  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$d$ : Schichtdicke der Probe in cm

$n$ : Stoffmenge des Oligonucleotides in der Messlösung

$F$ : Konversionsfaktor zur Umrechnung von  $\mu\text{L}$  in L und mol in nmol ( $F=10^3$ )

Hiermit wird die Stoffmenge von Oligonucleotid im Aliquot (10  $\mu\text{L}$ ) bestimmt, eine Umrechnung auf das Gesamtvolumen des gelösten Oligos in TE-Puffer ist im Anschluss zu berücksichtigen.

#### 7.1.6.7 Präparative HPLC an Oligonucleotiden

Präparative IEX-HPLC wurde an einer Anlage der Firma *Agilent* (1200 series, Degaser (G1379B), Binärpumpe (G1312A), Säulenofen (G1316A), VWD-Detektor (G1414B)) durchgeführt. Zur Trennung wurde eine Anionenaustauscher-Säule der Firma *Thermo Fisher* (*DNAPac*, Model *PA200*: 4  $\mu\text{m}$ , 3.0 x 100 mm) mit Vorsäule (4  $\mu\text{m}$ , 3.0 x 10 mm) und passendem Vorsäulenhalter mit Kuppler (*Acclaim*) verwendet. Zur Elution wurden Eluent A (0.1 M TEAA, pH 7) und Eluent B (0.1 M TEAA, pH 7 / MeCN, 1:3 v/v) in

angepassten Gradienten verwendet. 50  $\mu\text{L}$  der Oligonucleotid-Rohlösung wurden über ein Sechskanal Rheodyne mit passender Probenschleife (50  $\mu\text{L}$ ) injiziert. Trennungen mit Rohlösungen wurden bei Raumtemperatur und einem Fluss von 0.400  $\mu\text{L}/\text{min}$  durchgeführt. Analytische Trennungen (1 nmol Oligonucleotid) wurden bei 60 °C und einem Fluss von 700  $\mu\text{L}/\text{min}$  durchgeführt. Die Trennungen wurden bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleobasen) und 595 nm (Absorption des Cy5 Label) aufgezeichnet. Die einzelnen Fraktionen wurden an einer Vakuumzentrifuge der Firma *Thermo Fisher* (Model *SPD130DLX*; Kühlfalle *RVT400*; Membranpumpe *MPC 601 Tp*, Fa. *ILMVAC*) zunächst eingeeengt (20 mbar, 65 °C, 1 h), entsprechende Fraktionen vereinigt und anschließend bis zur Trockne eingeeengt (20 mbar, 65 °C, 2 h). Die getrockneten Oligonucleotide wurden in TE-Puffer (1x, 300  $\mu\text{L}$ ) resolubilisiert und anschließend charakterisiert.

#### 7.1.6.8 Gelelektrophorese an Oligonucleotiden

Analytische Trennungen von zuvor über die HPLC gereinigten Oligonucleotiden wurden an einem Sequenzier-Gel auf Polyacrylamid-Basis (Urea-PAGE, 20%ig, 7 M Harnstoff, Schichtdicke 1.5 mm) durchgeführt. Zur Herstellung der Monomer-Lösung wurde Harnstoff (37.8 g, 630 mmol) in *RotiphoreseGel-30-Mix* (ready-to-use, 37.5:1, 45 mL, *Carl Roth*) gelöst und mit TBE-Puffer (10x, 9 mL) versetzt. Nach Rühren der Lösung bei Raumtemperatur (1 h) wurde die Lösung mit ultrareinem Wasser ( $R > 18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$  bzw.  $\kappa = 0,055 \text{ }\mu\text{S}/\text{cm}$ ) auf 90 mL aufgestockt. Anschließend wurde unter starkem Rühren TE-MED (70  $\mu\text{L}$ , *Carl Roth*) hinzugegeben und die Lösung mit dem Radikalstarter APS (10% in  $\text{H}_2\text{O}$ , 500  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Die Monomer-Lösung wurde daraufhin unverzüglich und vorsichtig zwischen die Platten der Elektrophoresevorrichtung (*C.B.S. Scientific*, LSG-400-20) gegossen und auf die Vermeidung von Luftblasen geachtet. Ein Kamm mit einer der Beladung entsprechenden Kammergröße wurde in das Kopfende der Apparatur geschoben und das Gel 1 h bei Raumtemperatur polymerisiert. Im Anschluss wurde der Kamm entfernt, die Kammern mit Puffer gespült und die mit Loading Dye (100  $\mu\text{L}$ ) versetzten Proben (je 1 nmol in 100  $\mu\text{L}$  TBE-Puffer, 0.5x) in die Kammern gegeben. Die Laufzeit des Gels betrug 3 h bei folgenden Geräteeinstellungen des Netzgerätes: 770 V, 45 mA, 35 W. Die Banden wurden in einer UV-Kammer (*Vilber Lourmat*, Model *CX5 TS*) bei 260 nm detektiert.



### 7.1.6.9 Schmelzpunktbestimmung von Kleinmolekülen

Der Schmelzpunkt als Feststoff vorliegender Reinstoffe wurden unter Verwendung eines Schmelzpunktbestimmungsgerätes der Firma *Bibby Stuart Scientific* (Model *SMP3*) bestimmt und ist in °C angegeben.

### 7.1.6.10 Duplex-Schmelzkurven von Oligonucleotiden

Schmelzkurven der Oligonucleotide mit der zur Bcl-2-Sequenz komplementären RNA-Sequenz wurden in Phosphat-gepuffertes Salzlösung (PBS, 12 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl) an einem Gerät der Firma *Varian* (Model *CARY-100 Bio*) mit linearem Temperaturgradienten aufgenommen. Zur Messung wurde eine Lösung der Einzelstränge (10 µm je Strang in 1000 µL PBS) in einer Quarzküvette (Modell *Halb-Mikro-Küvette 108-QS*, 10 mm Schichtdicke) mit 300 µL Silikonöl überschichtet und anschließend mit Stopfen verschlossen. Die Messlösung wurde vor Aufzeichnung von Abkühlkurven zunächst für 3 min. auf 90 °C erhitzt. Der Temperaturbereich der Messung wurde auf 25-90 °C bei einer Heizrate von 0.7 °C/min festgelegt. Das Datenintervall betrug 1.0 °C bei einer Bandbreite des Ausgabesignals von 1 nm. Die Abkühlkurven wurden in Triplikaten gemessen und die Absorption bei 260 nm für jede Temperatur gemittelt. Die Hyperchromizität *H* wurde gemäß der Formel zu

$$H[\%] = \frac{A_{x^{\circ}\text{C}}^{260\text{nm}} - A_{25^{\circ}\text{C}}^{260\text{nm}}}{A_{25^{\circ}\text{C}}^{260\text{nm}}} \quad (1)$$

bestimmt und gegen die Temperatur in °C aufgetragen. Sowohl das obere ( $T \gg T_m$ ,  $\theta=0$ ) als auch das untere asymptotische Plateau ( $T \ll T_m$ ,  $\theta=1$ ) des erhaltenen Sigmoids wurden mithilfe einer linearen Anpassung angenähert, um zwei Hilfsgeraden nach der *Methode der Ausgleichsgeraden* zu erhalten. Die Y-Werte der hieraus konstruierten Ausgleichsgeraden ( $\theta=0.5$ ), deren Schnittpunkt mit dem Sigmoid den Schmelzpunkt ( $T_m$ ) der Duplex anzeigt, wurden gemäß der Formel

$$H(\theta_{0.5}) = \frac{H(\theta_0) - H(\theta_1)}{2} + H(\theta_1) \quad (2)$$

erhalten. Der Deskriptor  $\theta$  beschreibt hierbei das Mengenverhältnis der Einzelstränge ( $\theta_0$ ) zur Duplex ( $\theta_1$ ) über die Hyperchromizität in Abhängigkeit der Temperatur und ist auch unter der Bezeichnung *Fraction Folded* literaturbekannt.<sup>[359]</sup> Die Schmelzkurven der jeweiligen Duplices können dem Anhang (siehe **9.4**) entnommen werden.

### 7.1.6.11 Van't Hoff Analyse der Duplexbildung

Mithilfe der aufgezeichneten Duplex-Schmelzkurven sind die thermodynamische Zustandsgrößen  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$  sowie  $\Delta G^0$  zur Charakterisierung der Duplexbildung zugänglich. Durch Gleichsetzen der beiden Gleichungen zur Berechnung der freien Standard Gibbs-Energie gemäß

$$\Delta G^0 = -RT \ln(K_a) = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (3)$$

ergibt sich durch Umformung und Umstellen nach  $\ln(K_a)$  ein linearer Zusammenhang gemäß

$$\ln(K_a) = -\frac{\Delta H^0}{RT} - \frac{\Delta S^0}{R} \quad (4)$$

, wobei die Affinitätskonstante  $K_a$  als Verhältnis der Konzentrationen der Duplex zu den ungebunden vorliegenden Einzelsträngen definiert ist. Genauer ist der Parameter  $K_a$  in vereinfachter Form über das Massenwirkungsgesetz als das Verhältnis des rechnerischen Produkts der Produktkonzentrationen zum rechnerischen Produkt der Eduktkonzentrationen definiert. Konkret auf den Fall der Duplexbildung angewandt ergibt sich demnach  $K_a$  zu

$$K_a = \frac{[Duplex]}{[Strang_1][Strang_2]} = \frac{[Duplex]}{[Strang_{12}]^2} = \frac{\theta_T}{(1-\theta_T)^2} \quad (5)$$

, wobei die Konzentration der Duplex mit  $\theta_T$  (fraction folded) angegeben wird. Da beide Einzelstränge im äquimolaren Verhältnis zueinander vorliegen, können beide Konzentrationen zu  $[Strang_{12}]$  zusammengezogen werden. Zur Bestimmung der Zahlenwerte von  $\theta_T$  und damit von  $\ln(K_a)$  können die zur Bestimmung der Duplex-Schmelztemperatur herangezogenen Hilfsgeraden  $\theta_1$  und  $\theta_0$  verwendet werden. Der absolute Anteil der Duplex ist hierbei als Maß der Differenz der Hyperchromizitätswerte zwischen der extrapolierten oberen Asymptote ( $\theta_0$ ) und der Ausgleichsgeraden ( $\theta_{0.5}$ ) erhältlich. Setzt man diesen Wert mit dem Wert des durch die Hilfsgeraden  $\theta_1$  und  $\theta_0$  aufgespannten Hyperchromizitätsbereichs ins Verhältnis, so ergibt sich der prozentuale Anteil der Duplex zu

$$\theta_T [\%] = \frac{H(\theta_0) - H(x)}{H(\theta_0) - H(\theta_1)} \quad (6)$$

, wobei  $H(x)$  den Hyperchromizitätswert des Sigmoids bei Temperatur  $X$  darstellt. Durch Auftragung der nun zugänglichen Werte von  $\ln(K_a)$  (Gleichung 5) gegen den reziproken Wert der Temperatur in Kelvin wird eine Gerade erhalten, aus deren Steigung der Wert

für  $\Delta H^0$  entnommen werden kann. Aus dem Y-Achsenabschnitt ist  $\Delta S^0$  erhältlich (Gleichung 4). Die Van't-Hoff-Darstellungen der jeweiligen Duplices können dem Anhang (siehe 9.5) entnommen werden.

### 7.1.7 Hydrolysekinetik von Phosphoramidaten

Hydrolysekinetiken bei einem pH-Wert von 7.4 wurden in zweifach konzentriertem Sörensen-Puffer und einem Gesamtposphatgehalt von 160 mM bei 37 °C aufgenommen. Hydrolysekinetiken bei einem pH-Wert von 4 wurden in deuterierter Acetat-Puffer (1 M) bei 37 °C aufgenommen. Zur Untersuchung der aliphatischer Modell-Amidate wurden  $^1\text{H}$  und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren über einen Zeitraum von mindestens 24 h stündlich aufgenommen. Zur Untersuchung imidazolischer Modell-Amidate wurden  $^1\text{H}$  und  $^{31}\text{P}$ -Spektren über einen Zeitraum von maximal 12 h in Abständen von mindestens 10 min. aufgenommen. Die Hydrolyse wurde im Fall der aliphatischer Modell-Amidate durch Verhältnisbildung des integrierten Edukt- und Hydrolyseproduktsignals im  $^{31}\text{P}$ -Spektrum bestimmt. Die Hydrolyse wurde im Fall imidazolischer Modell-Amidate durch Verhältnisbildung eines charakteristischen und basisliniengetrennten, integrierten Edukt- und Hydrolyseproduktsignals im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bestimmt. Die erhaltenen Werte der Hydrolyse wurden gegen die Zeit in Stunden aufgetragen und die Kurve durch einen exponentiellen Fit mit *zero-offset* angenähert ( $Y = y_0 + A_0 \exp(-x/t)$ , *Box Lucas Fit*). Anhand der erhaltenen Fit-Parameter wurde die Gleichung für einen Hydrolyse-Wert von  $Y = 0,50$  nach der Zeit  $x$  umgestellt. Der erhaltene Zeit-Wert  $x$  des Box Lucas Fit entspricht der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  in [h].

### 7.1.8 Hydrolyse von Dinukleotid-*N*-Alkyl-Phosphoramidaten

#### 7.1.8.1 Herstellung von humanem Zelllysats

Zur Gewinnung des humanen Lysats wurden U937-Zellen in RPMI-Medium der Firma Thermo Fischer Scientific in einer Petrischale ausgesät und für 11 d bei 37°C im Inkubator wachsen gelassen. Währenddessen wurde zweimal eine Teilung der Zellmenge auf zwei Petrischalen vorgenommen und dabei das Medium erneuert. Durch Zentrifugation (4000 g, 4 °C) wurde das Medium vom Zellpellet getrennt und der Überstand entfernt. Das so erhaltene Pellet wurde mit PBS-Puffer (pH 7.4) der Firma Thermo Fischer Scientific gewaschen und anschließend in PBS-Puffer (45 mL) aufgenommen. Es wurden 150,000,000 Zellen gezählt und durch Zentrifugation (4000 g, 4 °C) die Zellen

vom Puffer getrennt. Das so erhaltene Zellpellet wurde bei 0 °C mit Lyse-Puffer (40 mL) und einer Tablette des Protease-Inhibitor-Cocktails von der Firma Roche versetzt. Es fand eine Zelllyse auf Eis per Ultraschall statt (fünf Zyklen und 20% Leistung mit 15 s Pulszeit und jeweils 45 s Pause). Durch erneute Zentrifugation (17000 g, 4 °C) wurde der Zellrückstand als Pellet vom Zelllysate getrennt. Der Überstand wurde in Eppendorf-Caps aliquotiert (200 µL) und bei – 80 °C gelagert.

#### 7.1.8.2 Darstellung des Lyse-Puffers

Für 10 mL des Lyse-Puffers wurden ein 1M Tris-HCl-Puffer (pH 7.5, 500 µL), NaCl (58.4 mg), 1M DTT-Lösung (Dithiothreitol, 10 µL), Glycerol (500 µL) und 250 mM PMSF-Lösung (8 µL) in Milli-Q-Wasser (5 mL) gelöst und mit Milli-Q-Wasser auf 10 mL aufgefüllt.

#### 7.1.8.3 Durchführung der Hydrolysebestimmung

Zu jedem Assay wurde eine frisch hergestellte Kalibriergerade in Milli-Q-Wasser vermessen. Hierzu wurde zuerst die 20 mM Stammlösung (in DMSO) der jeweiligen Probe mit Milli-Q-Wasser zu einer 100 µM Lösung verdünnt. In weiteren Verdünnungsschritten wurden nun Konzentrationen von 15 µM, 3 µM, 1.5 µM, 0.75 µM und 0.3 µM erhalten, die die Kalibrierpunkte darstellten. Anschließend wurden 30 µL jedes dieser Kalibrierpunkte mit 60 µL der Stopplösung (1.5 µM Diphenhydramin-Lösung als interner Standard in MeCN) versetzt. Folgende Endkonzentrationen wurden somit für die Kalibriergerade erhalten: 5 µM, 1 µM, 0.5 µM, 0.25 µM und 0.1 µM. Die finale Konzentration des internen Standards Diphenhydramin betrug 1 µM. Für die Assays wurden zu sechs verschiedenen Inkubationszeitpunkten jeweils Duplikate gemessen. Für Messungen in humanem Lysat wurden folgende Zeitpunkte gewählt: 0<sub>1</sub> min. (Zugabe von Stopplösung vor zu testender Substanz), 0<sub>2</sub> min. (Zugabe von Stopplösung nach zu testender Substanz, innerhalb von 5 s), 15 min, 30 min, 60 min und 150 min. Die Inkubationstemperatur betrug stets 37 °C. Pro Assay wurden 12 Eppendorf-Caps benötigt und in den Caps wurden 27 µL biologisches Medium vorgelegt. Die zu testende Substanz (3 µL einer 100 µM wässrigen Lösung) wurde zugegeben, ausgenommen für den Zeitpunkt 0<sub>1</sub> min. In der so erhaltenen Lösung lag eine Substanzkonzentration von 10 µM vor. Nach Erreichen der jeweiligen Zeitpunkte wurde immer zu zwei Caps die Stopplösung (60 µL einer 1.5 µM Diphenhydramin-Lösung als interner Standard in MeCN)

gegeben. Die finale Substanz-Konzentration lag somit bei 3.3  $\mu\text{M}$  und die von Diphenhydramin bei 1.0  $\mu\text{M}$ . Nach Zugabe der Stopplösung wurden die Caps 1 min. bei 17000 g zentrifugiert und der Überstand für die HPLC-HRMS-Analyse in Messvials überführt. Es wurde die HPLC-Methode 11 gemäß der Arbeit von Verena Böttner verwendet (VB\_MEOH40Grad\_26).<sup>[413]</sup> Zur Bestimmung der Halbwertszeiten wurden die ermittelten Konzentrationen gegen die Zeit aufgetragen. Es wurde ein Zerfall erster Ordnung angenommen und entsprechend Exponentialfunktionen gefittet. Aus den daraus resultierenden Exponentialgleichungen konnte die Halbwertszeit berechnet werden.

## 7.2 Oligonucleotide und ihre Konjugate

### 7.2.1 Reagenzien für den DNA-/RNA-Synthesizer

Die am Synthesizer verwendeten Reagenzien, Modifizierer und Lösungsmittel sind im Folgenden aufgelistet.

- Lösungsmittel: Acetonitril, Reinheitsgrad *for DNA synthesis* (*Sigma-Aldrich*).  
Pyridin Reinheitsgrad 99.5%, *Extratrocken über Molekularsieb* (*Across Organics*).  
Dimethylformamid, Reinheitsgrad 99.8%, *Extratrocken über Molekularsieb* (*Across Organics*).
- Entschützung: Trichloressigsäure (3% in DCM, *Sigma-Aldrich*).
- Aktivator: Hyacinth BMT (0.25 M in MeCN, *empBiotech*).
- Oxidation: Zum Phosphat-Triester: THF/H<sub>2</sub>O/Py/I<sub>2</sub>, (66/12/22/0.6, v/v/v/w) (*Sigma Aldrich*).  
Zum Phosphorthioat-Triester: 0.05 M DDTT (Py<sub>abs.</sub>/MeCN<sub>abs.</sub>, 60/40, v/v) (*Glen Research*).
- Capping: Cap A, (THF, Essigsäureanhydrid, Pyridin, 8/1/1, /v/v/v) + Cap B (MeCN/N-Methylimidazol/Py, 8/1/1, v/v/v) (beide *Sigma Aldrich*).  
Ultramild Capping Pac<sub>2</sub>-Anhydrid (5 wt% in THF/Py, 1:1, v/v).
- 5'-Modifizierer: DBCO-dT-Phosphoramidit (0.05 M in MeCN, *Glen Research*); Cy5-amidit (0.05 M in MeCN/DCM, 3/1, v/v), *Glen Research*).
- Monomere: Ultramild-Amidite (Ac-dC-CE, Pac-dA-CE, iPr-Pac-dG-CE); dT-CE (*Glen Research*).

CPG-Säulen: dT-CPG (1000 Å), Ac-dC-CPG (1000 Å), Pac-dA-CPG (1000 Å), iPr-Pac-dG-CPG (1000 Å) (K&A).

### 7.2.2 Synthese von Oligonucleotiden und ihrer Konjugate

#### *Automatisierte festphasengestützte Oligonucleotidsynthese*

Sämtliche Synthesen von festphasengebundenen Oligonucleotiden wurden an einem Gerät der Firma K&A (Modell *H-8 Standard*) unter Schutzgasatmosphäre (Argon, 5.0) und striktem Wasserausschluss durchgeführt. Als Syntheseplattform wurden CPG-gefüllte Säulen mit einer Beladung von 200 nmol/Säule des Startnucleosids und einer Porengröße von 1000 Å gewählt (K&A). Der Syntheszyklus bestand aus 4 Schritten: 1. Entschützung 2. Kupplung 3. Oxidation 4. Capping. Die im Vergleich zur klassischen Synthese von Phosphaten invertierte Reihenfolge von Oxidation und Capping ist zur Erzeugung eines Phosphorthioat-Backbones obligatorisch. Zu Beginn der Synthese wurde die endständige 5'-DMTr-Schutzgruppe des Startnucleosids durch Spülen des CPGs mit TCA (3% in DCM) entfernt und die Menge an verfügbaren Startnucleosid UV-Vis spektroskopisch durch Detektion des dimensionslosen Transmissionswerts des gebildeten Tritylkations erfasst ( $V_k$ ). Anschließend erfolgte die Kupplung eines entsprechenden Phosphoramidit-Monomers unter Aktivierung der freigelegten 5'-OH Gruppe mit Aktivator-Lösung (0.25 BMT) unter Bildung eines Phosphit-Triesters. Dieser wurde durch Spülen der Säule mit Oxidations-Lösung (0.05 M DDTT) in den entsprechende Phosphorthioat-Triester überführt. Zuletzt erfolgte die Absättigung nicht umgesetzter 5'-OH Gruppen mit der Capping-Lösung (5% Pac<sub>2</sub>) unter Bildung eines Pac-Esters, welcher in nachfolgenden Kupplung nicht weiterreagiert. Daraufhin erfolgte die Entschützung des ersten gekuppelten Nucleosids, mit dessen Transmissionswert ( $V_2$ ) die Kupplungseffizienz ( $Y_k$ ) unter Zuhilfenahme des Tritylmonitor Kalibrationswerts ( $V_{CAL} = 1100$ ) gemäß der folgend Gleichung bestimmt wurde:

$$Y_k = \frac{\log \frac{V_k}{V_{CAL}}}{\log \frac{V_2}{V_{CAL}}} \cdot 100\%$$

Bei Werten von  $V_2 \geq 50$  wurde die Synthese des Oligonucleotids abgebrochen, da eine Fortführung jeder weiteren Kupplung zu einem massiven Einbruch der Gesamtausbeute geführt hätte. Eine tabellarische Übersicht zur Programmierung der einzelnen Schritte

(Kupplungs- und Reaktionszeiten) der automatisierten Festphasensynthese kann dem Anhang entnommen werden (siehe **9.1**).

#### *Konjugation ausgewählter Liganden an DBCO-dT/Cy5-modifizierte Oligonucleotide*

Das CPG-Material der Säulen wurde aus diesen mechanisch entfernt und in ein Kryovial (ca. 1.5 mL) gegeben. Das Material wurde mit einer Stammlösung des gewünschten Liganden in DCM (4  $\mu\text{mol}$  Ligand, 20 äq., 500  $\mu\text{L}$ , 8 mM) überschichtet und mithilfe eines Vortexers (*IKA*) suspendiert. Die Reaktionslösung wurde in einem Thermoschüttler unter Lichtausschluss inkubiert (40 °C, 900 rpm, 24 h). Im Anschluss wurde die Reaktionslösung zentrifugiert (20 °C, 5 mins., 4 krpm) und der Überstand mithilfe einer Pipette *vorsichtig* entfernt und verworfen. Das CPG-Material wurde zwei weitere Male mit 500  $\mu\text{L}$  frischem DCM gewaschen.

#### *Abspaltung der Oligonucleotide vom CPG-Träger und Abspaltung der Schutzgruppen*

Nach *vorsichtiger* Trocknung des CPG-Materials in einem Argon-Strom wurde das Material mit 1000  $\mu\text{L}$  einer frischen, wässrigen ammoniakalkalischen Lösung (25%  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) überschichtet. Die Reaktionslösung wurde in einem Thermoschüttler unter Lichtausschluss inkubiert (25 °C, 900 rpm, 2 h). Im Anschluss wurde die Reaktionslösung zentrifugiert (20 °C, 5 mins., 4 krpm) und der Überstand mithilfe einer Pipette *vorsichtig* in ein Eppendorfgefäß (1.5 mL) transferiert. Das CPG-Material wurde zwei weitere Male mit 200  $\mu\text{L}$  frischem, ultrareinem Wasser ( $R > 18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$  bzw.  $\kappa = 0,055 \mu\text{S/cm}$ ) gewaschen und die Überstände vereinigt (insgesamt ca. 1400  $\mu\text{L}$ ). Die vereinigten Überstände wurden an einer Vakuumzentrifuge (*SpeedVac SPD130DLX, Thermo Fisher*) auf ca. 500  $\mu\text{L}$  eingeeengt (20 mbar, 65 °C, 30 min) und unmittelbar danach chromatographisch aufgereinigt (siehe **7.1.6.7**).

### **7.3 Kompetitionsassay am Estrogenrezeptor Alpha**

Die zur Konjugation verwendeten Liganden sowie die ausgewählten Standards Tamoxifen, Norendoxifen, Endoxifen, 4-Hydroxytamoxifen, Estradiol, Ethinylestradiol und Estron wurden in einem Kompetitionsassay auf ihre Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor Alpha ( $\text{ER}\alpha$ ) gemäß einer angepassten Vorschrift von Gurer *et al.* untersucht.<sup>[302]</sup> Der ursprüngliche Assay wurde hierzu vom 96-Well-Format auf das 384-Well-Format umgestellt und durch die Bestimmung der Bindungsaffinität der o.g. Standards verifiziert

(siehe 4.4.1). Hierbei wurde cytosolischer, in Insektenzellen exprimierter, nativer und humaner ER $\alpha$  der Firma *ThermoFisher Scientific* im Qualitätsgrad *Research Grade* eingesetzt. Als fluoreszente Sonde wurde Coumestrol der Firma *Merck* im Qualitätsgrad *BioReagent, suitable for fluorescence,  $\geq 97.5\%$  (HPLC)* eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) im Qualitätsgrad *suitable for cell culture* verwendet. Als Negativkontrolle wurde ein frisch hergestellter Mastermix aus ER $\alpha$  und Coumestrol verwendet. Zur Herstellung von Verdünnungen wurde der im ER $\alpha$ -Kit mitgelieferte *ES2 Screening Buffer* (BB) zunächst mit DMSO versetzt (4%, v/v) und sodann als *Binding Buffer* eingesetzt. Die seriellen Verdünnungen wurden in Well-Platten im 384er Format der Firma *Corning* (Ref: 4514; schwarz, non-binding surface, U-bottom) angesetzt. Die Platten wurden an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät der Firma *BMG Labtech* (Modell *POLARstar Omega*) mit Top-Optik vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 355 nm, die Emissionswellenlänge 405 nm, die Bandbreite beider Filter betrug 20 nm. Zur Datenerfassung und -ausgabe wurden die implementierten Programme (*Omega Star*, Version 1.30; *Mars Data Analysis*, Version 2.10 R3) mit folgenden Einstellungen verwendet: Positioning Delay = 0.2 s, No. of flashes per well = 20, Gain-Value = 1500. Unmittelbar vor Beginn der Messung wurde die Well-Platte innerhalb des Gerätes geschüttelt (double-orbital, 10 s, 500 rpm). Mit diesen Einstellungen wurden Fluoreszenzintensitäten im Bereich  $6 \cdot 10^5$  bis  $19 \cdot 10^5$  erzielt. Die folgende, allgemeine Arbeitsvorschrift ist für eine Messung von zwei Testsubstanzen in 12 seriellen Verdünnungen im Sextuplikat mit Positiv- und Negativkontrollen (je 12 Wells) ausgegeben (14 Reihen, 12 Verdünnungen, 168 Wells).

#### *Stammlösungen der Testsubstanzen*

Verdünnungen der zu testenden Substanzen wurden im Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$ –0.05 nM in serieller Verdünnung mit dem Faktor 3 (12 Verdünnungen) in den Wells der Testplatte angesetzt. Hierzu wurden zunächst Stammlösungen der Substanzen zu 1 mM in DMSO angesetzt (in 1000  $\mu\text{L}$ ), von welchen je 8  $\mu\text{L}$  in ein PCR-Röhrchen (200  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen) zusammen mit 192  $\mu\text{L}$  BB gegeben wurden (= Tube A, 40  $\mu\text{M}$ ). Jede weitere serielle Verdünnung ergibt sich durch Entnahme von 40  $\mu\text{L}$  aus dem vorangegangenen Röhrchen (Start bei Tube A) und Zugabe zu 80  $\mu\text{L}$  BB im folgenden PCR-Röhrchen (hier z.B. Tube-B, Gesamtvolumen 120  $\mu\text{L}$ ). So wurden sukzessiv zunächst 12 Verdünnungen mit einer je vierfach höheren Konzentration als im Well benötigt



erhalten (40  $\mu\text{M}$ -0.20 nM). Die serielle Verdünnung wurde zur Erzeugung eines biologischen Replikates neu aus der Stammlösung (1 mM) angesetzt. Die Stammlösung selbst wurde nach Lagerung bei -25 °C spätestens nach zwei Wochen verworfen.

#### *Stammlösung der Positivkontrolle ( $K_{\text{pos.}}$ )*

Aus einer Stammlösung von  $E_2$  in DMSO (1 mM) wurden 24  $\mu\text{L}$  entnommen und zu 576  $\mu\text{L}$  BB in einem Eppendorfgefäß (1.5 mL) gegeben. Das Gesamtvolumen wurde auf sechs PCR-Röhrchen zu je 100  $\mu\text{L}$  aufgeteilt (6x 100  $\mu\text{L}$  à 40  $\mu\text{M}$ ). Die Konzentration war vierfach höher als im Well benötigt wird. Die Lösungen wurden zur Erzeugung eines biologischen Replikates neu aus der Stammlösung (1 mM) angesetzt. Die Stammlösung selbst wurde nach Lagerung bei -25 °C spätestens nach zwei Wochen verworfen.

#### *Stammlösung des Mastermix (Negativkontrolle $K_{\text{neg.}}$ )*

Aus der kommerziellen Rezeptor-Stammlösung (hier z.B. 3770 nM) wurden 106  $\mu\text{L}$  zu 894  $\mu\text{L}$  BB zur Herstellung einer Verdünnung gegeben (1000  $\mu\text{L}$ , 400 nM). Die Konzentration war vierfach höher als im Well benötigt wird.

Aus einer Stammlösung von Coumestrol in DMSO (1 mM) wurden zunächst 10  $\mu\text{L}$  zu 90  $\mu\text{L}$  BB gegeben (100  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{M}$ ). Aus dieser Lösung wurden wiederum 8  $\mu\text{L}$  zu 392  $\mu\text{L}$  BB geben (400  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{M}$ ). Aus dieser Lösung wurden wiederum 200  $\mu\text{L}$  zu 800  $\mu\text{L}$  BB gegeben (1000  $\mu\text{L}$ , 400 nM). Die Konzentration ist vierfach höher als im Well benötigt wurde.

Die beiden Verdünnungen von Coumestrol (400 nM, 1000  $\mu\text{L}$ ) und  $\text{ER}\alpha$  (400 nM, 1000  $\mu\text{L}$ ) wurden in einem Eppendorfgefäß (2.5 mL) vereinigt und durch vorsichtiges Aufziehen und Leeren der 1 mL-Pipettenspitze vermischt (nicht vortexen!). Die Konzentration des Mastermix war zweifach höher als im Well benötigt wurde. Der Mastermix wurde eine halbe Stunde vor Zugabe zur Well-Platte unter Lichtausschluss auf Eis gestellt.

#### *Präparieren der Messplatte*

Mithilfe einer Zwölfkanal-Pipette mit 6 Spitzen zu je 10  $\mu\text{L}$  am Ende einer Seite wurden zunächst 5  $\mu\text{L}$  BB in jedes Well pipettiert, in die Wells der Negativkontrolle wurden zudem weitere 5  $\mu\text{L}$  BB gegeben (10  $\mu\text{L}$  gesamt). Anschließend wurden 5  $\mu\text{L}$  der Verdünnung der Positivkontrolle (40  $\mu\text{M}$ ) in die Wells der Positivkontrolle gegeben (Wells B2-

L2, 10 µL gesamt). Die Konzentration der Positivkontrolle ist nun zweifach höher als im Well benötigt wird (20 µM). Je 5 µL der jeweiligen Verdünnung der Testsubstanzen wurden in die vorgesehenen Wells gegeben. Substanz 1: Verdünnungen entlang der Wells B3-M3, technische Replikate entlang der Wells B3-B8 (10 µL gesamt). Substanz 2: Verdünnungen entlang der Wells B9-M9, technische Replikate entlang der Wells B9-B14 (10 µL gesamt). Die Konzentrationen der seriellen Verdünnungen sind nun zweifach höher als im Well benötigt wird (20 µM - 0.10 nM). Zuletzt wurden 10 µL des Mastermix (je 200 nM ERα und Coumestrol) in jedes Well gegeben. Mit Erreichen des finalen Arbeitsvolumens von 20 µL pro Well sind die gewünschten Arbeitskonzentrationen erreicht (Positivkontrolle: 10 µM E<sub>2</sub> + je 100 nM ERα und Coumestrol, Negativkontrolle: je 100 nM ERα und Coumestrol, serielle Verdünnungen: 10 µM - 0.05 nM + je 100 nM ERα und Coumestrol). Die fertig präparierte Well-Platte wurde auf einem feuchten Tuch in einen Lagerkasten für Mikroröhrchen gelegt, verschlossen, und 1 h bei Raumtemperatur bei mittlerer Geschwindigkeit auf einen Wippschüttler gestellt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Platte unter o.g. Konditionen vermessen.

#### *Auswertung des Assays*

Die dimensionslosen Werte der erhaltenen Fluoreszenzintensitäten wurden in *Coumestrol-Verdrängung* transformiert, indem die Werte der Intensitäten der seriellen Verdünnungen ( $I_x$ ) mit den gemittelten Intensitätswerten der Positivkontrolle ( $\bar{I}_+$ ) und der Negativkontrolle ( $\bar{I}_-$ ) gemäß der Formel

$$\text{Coumestrol – Verdrängung [\%]} = \frac{\bar{I}_+ - I_x}{\bar{I}_+ - \bar{I}_-}$$

in Bezug gesetzt wurden. Die nun in Prozent vorliegenden Werte wurden gegen den negativen dekadischen Logarithmus der Konzentration (in [M]) aufgetragen. Messwerte außerhalb des Streubereichs wurden aus der Auswertung entfernt (maximal 3 Werte). Die Werte wurden mithilfe der 4-Parameter-Logistik Funktion *DoseResp* der Kategorie *Growth/Sigmoidal* in *Origin2020b* angenähert. Dem Fit konnten *relative IC<sub>50</sub>*-Werte entnommen werden.

Die Güte des Assays konnte zudem über den von Zhang *et al.* eingeführten dimensionslosen Z-Faktor gemäß der folgenden Formel bewertet werden.<sup>[324]</sup>

$$Z = 1 - \frac{3\sigma_+ + 3\sigma_-}{|\bar{I}_+ - \bar{I}_-|}$$

Die Parameter  $\sigma_+$  und  $\sigma_-$  waren hierbei die Standardabweichungen der Werte  $\bar{I}_+$  und  $\bar{I}_-$ . Der Z-Faktor erlaubte eine Aussage über die dynamische Breite des Signals sowie über das Verhältnis des gemessenen Signals im Vergleich zum „Grundrauschen.“ Je kleiner der Wert des Zählers, umso größer ist das Separationsband, d.h. die Werte für Positiv- resp. Negativkontrolle lagen weit genug auseinander, um sie klar voneinander trennen zu können.<sup>[325]</sup> Der Assay ist gut geeignet und valide ( $Z = 0.5$ ) bzw. hervorragend geeignet ( $Z = 0.8$ ). Es wurden Werte von Z im Bereich von 0.6-0.9 gefunden.

## 7.4 Biologische Testung *in vitro*

Die Biologische Testung wurde von Frau Dr. Charlotte Dahlem im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Alexandra Kiemer durchgeführt.

### 7.4.1 Zelltestung

#### *Herstellung der Kulturmedien*

Für die *in vitro*-Experimente wurden T47D-Zellen (ER-exprimierend) in RMPI-1640-Medium (Sigma #R0883) und HepG2-Zellen (ER-defizitär) in DMEM-Medium (Sigma #D6546), bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Medien wurden mit 10% FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 mg/mL Streptomycin und 2 mM Glutamin supplementiert. Das Passagieren der Zelllinien erfolgte nach Vorgaben der American Type Culture Collection (ATCC).

#### *Kultivierung der Zelllinien*

Für die *in vitro* Experimente wurden T47D-Zellen (ER-angereichert) in RMPI-1640-Medium und HepG2-Zellen (ER-defizitär) in DMEM-Medium kultiviert. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre in 96-Well Platten ausgesät.

#### *Passagieren der Zellen*

Subkulturen wurden gemäß den Vorgaben der American Type Culture Collection (ATCC) erzeugt.

#### *Proliferation*

15000 Zellen wurden in einer 96-Well Platte pro Well ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit 100 µL einer 500 nM Lösung des jeweiligen Konjugats

(50 pmol) in TE-Puffer (1x) dem Überstand der Transfektion zugeführt. Die Konfluenz wurde mikroskopisch mit einem automatisiertem *IncuCyte*<sup>®</sup> S3 System überwacht und auf den ersten Messpunkt unmittelbar nach der ersten Behandlung normalisiert.

### *Apoptose*

Die Aktivierung von Caspase 3/7 wurde parallel zur Konfluenz mithilfe des automatisierten *IncuCyte*<sup>®</sup> S3 Systems analysiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Überstände in den Wells durch im gleichen Medium gelöstes *IncuCyte*<sup>®</sup> Caspase-3/7 Green Reagenz (*Sartorius*, #4440) gemäß dem Herstellerprotokoll ausgetauscht. 2 h später wurden die Zellen dann mit dem Überstand, welcher die 500 nm Lösung des jeweiligen Konjugates beinhaltet oder Staurosporin (Positivkontrolle) behandelt. Konfluenz und apoptotische Ereignisse wurden parallel überwacht. Fluoreszenzsignale, welche durch apoptotische Zellen hervorgerufen werden, wurden auf die Zellkonfluenz normiert.

### *Transfektion*

Transfektion wurde nach Herstellerangaben des *Lipofectamin 3000* Kits (*Thermo Fisher Scientific*) durchgeführt.

### *Western Blot*

Die Zellen wurden nach 72 h in RIPA Lysepuffer mit einem Proteaseinhibitor-Mix (*Roche* #4693159001) lysiert. Das Lysat wurde bei 10000 x g und 4 °C für 10 min. zentrifugiert. Der Proteingehalt wurde über den Pierce BCA-Assay bestimmt und 30 µg Protein mithilfe eines 12% SDS-PAGE Gels aufgetrennt und auf Nitrocellulose Membranen transferiert (*Merck*, Immobilon-FL #IPFL00010).

Die Membranen wurden via Behandlung in Rockland Blocking Buffer für 2 h geblockt und mit den primären Antikörpern Anti-Bcl-2 (1:1.000, *Cell signaling* #4223) oder Anti-Tubulin (1:2.000, *Merk* #T9026) bei 4 °C über Nacht inkubiert. IRDye680-konjugiertes Anti-rabbit Immunglobulin G (IgG) (*LI-COR Bioscience* #926-68071) und IRDye800-konjugiertes Anti-mouse Immunglobulin G (*LI-COR Biosciences* #926-32210) wurden als sekundäre Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur verwendet. Die Signalintensitäten von Bcl-2 und Tubulin wurden unter Verwendung eines *Odyssey near-infrared imaging system* von *LI-COR Bioscience* bestimmt. Die Intensitäten wurden unter Verwendung von *Image Studio lite* quantifiziert.

### Immunofluoreszenz

Die Zellen wurden in Kammerobjektträgern ausgesät und am nächsten Tag für 24 h mit einer 500 nm Lösung des jeweiligen Konjugats behandelt. Die Zellen wurden fixiert (4% PFA), permeabilisiert (0.2% TritonX-100 in PBS) und geblockt (2% BSA, 10% FCS in 0.05% Tween-20/PBS) bevor sie mit primären Antikörper (anti-ER alpha 1:200, *Santa Cruz* #sc-8005 in Blocking Buffer) bei 4°C über Nacht inkubiert wurden. Die Zellen wurden gewaschen und mit sekundärem Antikörper (Anti-mouse AlexaFluor488 1:200, *Molecular Probes* #A11017) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zellkern wurde durch Behandlung mit DAPI (10 ng/ml) für 15 min. angefärbt. Die Proben wurden für das Imaging mit *FluorSave* (*Merk* #345789) vorbereitet. Fluoreszenzmikroskopie wurde mithilfe eines *Zeiss Cell Observer Microscope* durchgeführt.

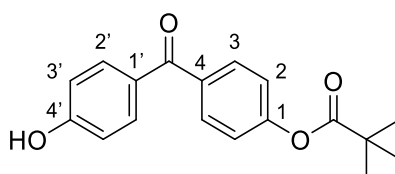
### Statistische Analyse

Die Datenanalyse erfolgte mit MS-Excel (*Microsoft*), die statistische Auswertung mit OriginPro (*Additive*). Falls nicht anders angegeben, wurden die Experimente in biologischen Triplikaten inklusive zweier technischer Replikate durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung ( $\pm$  SEM) angegeben. Zur Statistischen Analyse wurde *one-way ANOVA* mithilfe der *Tukey's posthoc analysis* durchgeführt.

## 7.5 Synthesen

### 7.5.1 Synthese von Triphenylethylen-Derivaten

#### 4-(4-Hydroxybenzoyl)phenylpivalat



22

#### Synthese ausgehend von 4,4'-Dihydroxybenzophenon

4,4'-Dihydroxybenzophenon **20** (5.35 g, 25.0 mmol) wurde in THF (60 mL) gelöst und mit Natriumhydrid (60% in Mineralöl, 1.65 g, 27.5 mmol) portionsweise über einen Zeitraum von 15 min. unter Eisbadkühlung versetzt. Nach 30 min. wurde zu der Suspension Pivalinsäurechlorid (3.1 mL, 25.0 mmol) portionsweise über einen Zeitraum

von 15 min. unter weiterer Eisbadkühlung hinzugetropft und die Reaktionsmischung weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (40 mL) beendet und das Reaktionsvolumen auf ca. ein Drittel im Vakuum eingengt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Essigsäureethylester extrahiert (4 x 50 mL) und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (5 x 20 cm, DCM:EtOAc 19:1). Die Titelverbindung wurde als weißer, fluffiger Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 3.37 g (11.3 mmol, 46%).

*Synthese ausgehend von 4,4'-Bis(trimethylacetoxy)benzophenon*

4,4'-Bis(trimethylacetoxy)benzophenon (3.82 g, 10.0 mmol) wurde in DMSO (100 mL) gelöst und mit Kaliumcarbonat (1.38 g, 10.0 mmol) und 4,4'-Dihydroxybenzophenon (2.14 g, 10.0 mmol) versetzt. Die Reaktion wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt, durch Zugabe von dest. Wasser (400 mL) beendet und das Reaktionsgemisch mit Essigsäureethylester (4 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumchlorid-Lösung (100 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (5 x 20 cm, DCM:EtOAc 19:1). Die Titelverbindung wurde als weißer, fluffiger Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 2.60 g (8.72 mmol, 87%).

**DC:**  $R_f = 0.65$  (DCM:EtOAc 19:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\delta$  in ppm):

1.37 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 6.98 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, H-2), 7.31 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2'), 7.70 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-3), 7.82 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3'), 9.30 (s, 1H, OH).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\delta$  in ppm):

27.30 ( $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 39.81 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 116.04 (C-3'), 122.53 (C-2), 130.01 (C-1'), 131.84 (C-2'), 133.44 (C-3), 136.82 (C-4), 155.01 (C-1), 162.13 (C-4'), 176.96 ( $\text{O}\underline{\text{C}}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 194.45 (C=O).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 169$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2972, 2874, 2770, 1752, 1638, 1599, 1252, 1199, 1109, 1030.

**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 257, 294$ .

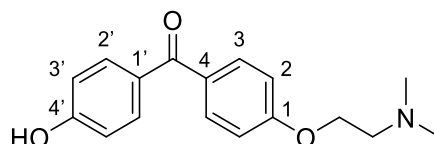
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 299.2$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> (298.12)

ber.: 299.1277 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 299.1283 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 4-(4-hydroxybenzoyl)phenylpivalat



26

4,4'-Dihydroxybenzophenon **20** (9.97 g, 46.5 mmol) wurde in DMF (100 mL) gelöst und mit Cäsiumcarbonat (45.6 g, 140 mmol) versetzt. Die Suspension wurde zunächst auf 80°C erhitzt und 2-(Dimethylamino)ethylchlorid-Hydrochlorid (7.27 g, 50.5 mmol) portionsweise über einen Zeitraum von 2 h zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei 80°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur gebracht und die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (300 mL) beendet. Die Reaktionsmischung wurde mit Essigsäureethylester (4 x 100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (3 x 24 cm, EtOAc:MeOH 9:1 + 1% NEt<sub>3</sub>). Die Titelverbindung wurde als beiger Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 5.64 g (19.8 mmol, 42%).

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.25 (EtOAc:MeOH 9:1 + 1% NEt<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, MeOD<sub>4</sub>, δ in ppm):

2.37 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.82 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H, (CH<sub>2</sub>)N), 4.20 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H, (OCH<sub>2</sub>)), 6.80 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-3'), 6.84 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2), 7.65 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3), 7.71 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-2').

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD<sub>4</sub>, δ in ppm):

45.46 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 57.93 ((CH<sub>2</sub>)N), 65.18 (OCH<sub>2</sub>), 113.81 (C-2), 115.50 (C-3'), 130.98 (C-2'), 132.14 (C-3), 132.37 (C-4), 132.48 (1'), 161.62 (C-4'), 165.12 (C-1), 194.41 (C=O).

**Schmelzpunkt:** T<sub>m</sub> = 89 °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3441, 2962, 2664, 2497, 1793, 1640, 1595, 1576, 1458, 1244.

**UV/VIS/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\max} = 222, 294$ .

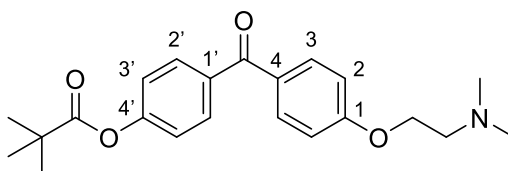
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 286.1$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> (285.13)

ber.: 286.1437 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 286.1426 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 4-(4-(2-(Dimethylamino)ethoxy)benzoyl)phenylpivalat



24

(4-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)(4-hydroxyphenyl)methanon **26** (3.79 g, 13.3 mmol) wurde in THF (60 mL) gelöst und mit Natriumhydrid (60% in Mineralöl, 840 mg, 21.0 mmol) portionsweise über einen Zeitraum von 15 min. unter Eisbadkühlung versetzt. Nach 15 min. wurde unter Eisbadkühlung Pivalinsäurechlorid (1.9 mL, 15.9 mmol) portionsweise über einen Zeitraum von 15 min. zugetropft und die Reaktionsmischung 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (50 mL) beendet und das Reaktionsvolumen auf ca. ein Drittel im Vakuum eingengt. Das Gemisch wurde mit Essigsäureethylester (3 x 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen (50 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM:MeOH 10:1 + 1% NEt<sub>3</sub>). Die Titelverbindung wurde als gelblicher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 4.68 g (12.7 mmol, 95%).

**DC:**  $R_f = 0.32$  (DCM:MeOH 10:1 + 1% NEt<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, MeOD<sub>4</sub>,  $\delta$  in ppm):

1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.36 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.48 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H, (CH<sub>2</sub>)N), 4.18 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H, (OCH<sub>2</sub>)), 6.99 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-2), 7.18 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-3'), 7.81 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-3), 7.82 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-2').

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD<sub>4</sub>,  $\delta$  in ppm):



27.08 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 39.20 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 45.81 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 58.04 ((CH<sub>2</sub>)N), 66.12 (OCH<sub>2</sub>), 114.13 (C-2), 121.35 (C-3'), 130.18 (C-2'), 131.26 (C-4), 132.43 (C-3), 135.52 (C-1'), 154.01 (4'), 162.41 (C-1), 176.67 (OC(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 194.41 (C=O).

**Schmelzpunkt:** T<sub>m</sub> = 96 °C.

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2972, 2874, 2770, 1752, 1638, 1599, 1252, 1199, 1109, 1030.

**UV/VIS (MeOH):**  $\lambda_{\max}$  = 287.

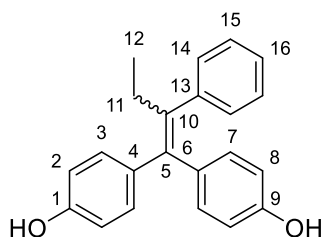
**MS (ESI<sup>+</sup>):** m/z = 370.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub> (369.19)

ber.: 370.2012 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 370.2001 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 4,4'-(2-Phenylbut-1-ene-1,1-diyl)diphenol



49

Zink (4.11 g, 62.5 mmol) wurde in THF (40 mL) suspendiert, unter Eisbadkühlung zügig mit Titan(IV)-Chlorid (3.2 mL, 28.5 mmol) versetzt und die Reaktionslösung für 3 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur gebracht und eine Lösung von 4,4'-Dihydroxybenzophenon **20** (1.07 g, 5.00 mmol) und Propiophenon (2.0 mL, 15.0 mmol) in THF (40 mL) zügig hinzu getropft. Die Reaktionsmischung wurde 3 h unter Lichtausschluss zum Rückfluss erhitzt und auf Raumtemperatur gebracht. Die Reaktionsmischung wurde in eine Kaliumcarbonat-Lösung (10%, 200 mL) gegossen und filtriert. Der Filterkuchen wurde in Essigsäureethylester resuspendiert und erneut filtriert. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Phasen der vereinigten Filtrate wurden getrennt, die wässrige Phase auf ca. ein Drittel des Gesamtvolumen im Vakuum eingengt und mit Essigsäureethylester (4 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen (50 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Titelverbindung kann entweder säulenchromatographisch an Kieselgel

gereinigt werden (31 x 1.5 cm, DCM:MeOH 9:1) oder durch mehrfaches Fällern aus *n*-Hexan als weißes Pulver erhalten werden (E/Z = >99:1).

**Ausbeute:** 1.03 g (3.27 mmol, 65%).

**DC:**  $R_f = 0.50$  (EtOAc:PE 1:4).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, MeOD<sub>4</sub>,  $\delta$  in ppm):

0.92 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H, H-12), 2.47 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H-11), 6.40 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8), 6.65 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2), 6.76 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7), 7.02 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3), 7.04-7.16 (m, 5H, H-14/15/16).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz, MeOD<sub>4</sub>,  $\delta$  in ppm):

14.09 (C-12), 30.00 (C-11), 115.19 (C-8), 115.94 (C-2), 127.0 (C-3), 128.97 (C-7), 131.06 + 131.73 + 133.20 (C-14/15/16), 136.33 + 136.70 (C-5/10), 140.14 + 141.64 + 144.42 (C-4/6/13), 156.45 + 157.34 (C-1/9).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 200$  °C.

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3400, 3039, 2960, 2870, 1670, 1505, 1430, 1234, 1166, 1103.

**UV/VIS (MeOH):**  $\lambda_{\text{max}} = 289$ .

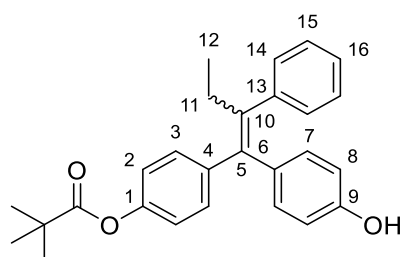
**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 317.3$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub> (316.14)

ber.: 317.1530 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 317.1492 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 4-(1-(4-Hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat



23

Zink (11.5 g, 175 mmol) wurde in THF (120 mL) suspendiert, unter Eisbadkühlung zügig mit Titan(IV)-Chlorid (8.8 mL, 80.0 mmol) versetzt und die Reaktionslösung für 2 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur gebracht und eine Lösung von 4-(4-Hydroxybenzoyl)phenylpivalat **22** (4.17 g, 14.0 mmol) und Propiophenon (5.6 mL, 42.0 mmol) in THF (120 mL) zügig hinzu getropft. Die

Reaktionsmischung wurde 3 h unter Lichtausschluss zum Rückfluss erhitzt und auf Raumtemperatur gebracht. Die Reaktionsmischung wurde in eine Kaliumcarbonat-Lösung gegossen (10%, 400 mL) und filtriert. Der Filterkuchen wurde in Essigsäureethylester resuspendiert und erneut filtriert (2x). Die Phasen der vereinigten Filtrate wurden getrennt, die wässrige auf ein ca. Drittel des Gesamtvolumen im Vakuum eingeeengt und mit Essigsäureethylester (4 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen (100 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Titelverbindung kann entweder säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt werden (31 x 1.5 cm, DCM:MeOH 9:1) oder auch durch mehrfaches Fällern aus *n*-Hexan als weißes Pulver erhalten werden (E/Z = >99:1).

**Ausbeute:** 5.50 g (13.7 mmol, 98%).

**DC:**  $R_f = 0.29$  (EtOAc:PE 1:7).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, MeOD<sub>4</sub>,  $\delta$  in ppm):

0.92 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H, H-12), 1.39 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.47 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2H, 11-H), 6.40 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8), 6.65 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2), 6.76 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7), 7.02 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3), 7.04-7.16 (m, 5H, H-14/15/16).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD<sub>4</sub>,  $\delta$  in ppm):

14.09 (C-12), 30.00 (C-11), 115.19 (C-8), 115.94 (C-2), 127.0 (C-3), 128.97 (C-7), 131.06 + 131.73 + 133.20 (C-14/15/16), 136.33 + 136.70 (C-5/10), 140.14 + 141.64 + 144.42 (C-4/6/13), 156.45 + 157.34 (C-1/9), 175.33 (OC(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 173$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3446, 3058, 2968, 2931, 2869, 1728, 1610, 1510, 1269, 1191.

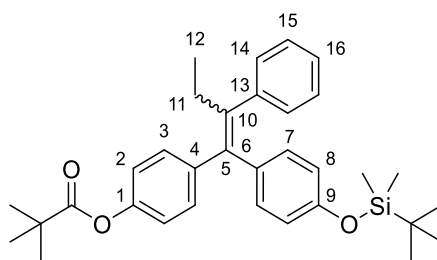
**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{max} = 277$ .

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 423.2$  [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> (400.20)

ber.: 401.2038 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 401.2068 [M+H]<sup>+</sup>.

**4-(1-(4-Hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat**

48

Zu einer Lösung von 4-(1-(4-Hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat **23** (401 mg, 1.00 mmol) in DCM (3.0 mL) wurde Triethylamin (280  $\mu$ L, 2.00 mmol) und 4-(Dimethylamino)pyridin (5.8 mg, 50  $\mu$ mol) gegeben und die Reaktionsmischung portionsweise mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (158 mg, 1.05 mmol) über einen Zeitraum von 5 min. versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion durch Zugabe von dest. Wasser (1.0 mL) beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester (10 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (5.0 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (18 x 3 cm, PE:EtOAc 9:1). Die Titelverbindung wurde als weißer Schaum erhalten (E/Z = >99:1).

**Ausbeute:** 424 mg (0.734 mmol, 83%).

**DC:**  $R_f = 0.64$  (PE:EtOAc 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

0.11 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.93 (m, 12H, H-12 +  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.38 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.48 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H, H-11), 6.48 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8), 6.71 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8), 7.05 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-2), 7.09-7.19 (m, 5H, H-14/15/16), 7.26 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-3).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

-4.50 ( $\text{Si}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ), 13.56 (C-12), 25.65 ( $\text{SiC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 27.14 ( $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 28.87 (C-11), 39.09 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 119.01 (C-7), 121.03 (C-2), 125.99 + 127.77 + 129.94 + 130.39 (C-3/14/15/16), 131.83 (C-8), 135.90 + 137.58 + 141.08 + 141.69 + 142.26 (C-4/5/6/10/13), 149.66 + 153.61 (C-1/9), 177.13 ( $\text{OC}(\underline{\text{C}}=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 140$  °C (Zersetzung).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3058, 3029, 2956, 2927, 2856, 1603, 1505, 1462, 1360, 1252.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  = 218, 242, 281.

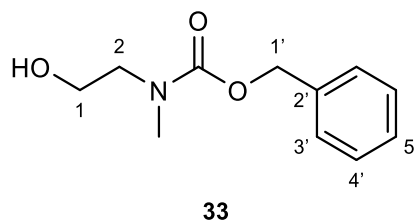
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 515.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>Si (514.29)

ber.: 515.2975 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 515.3053 [M+H]<sup>+</sup>.

### Benzyl-(2-Hydroxyethyl)-*N*-(methyl)-carbammat



Zu einer Lösung von Ethanolamin (2.52 g, 33.6 mmol) in DCM (100 mL) wurde Triethylamin (6.1 mL, 43.7 mmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung mit Chlorameisensäurebenzylester (5.2 mL, 37.0 mmol) tropfenweise unter Eisbadkühlung über einen Zeitraum von 10 min. versetzt. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Zitronensäure-Lösung (10%, 100 mL) beendet, die organische Phase mit Wasser (100 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (17 x 3 cm, PE:EtOAc 1:1 → 2:3). Die Titelverbindung wurde als klares, farbloses Öl erhalten.

**Ausbeute:** 6.76 g (32.3 mmol, 96%).

**DC:**  $R_f$  = 0.22 (PE:EtOAc 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

2.24 (s, 1H, OH), 3.01 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.46 (t,  $J$  = 4.7 Hz, 2H, H-2), 3.69-3.84 (m, 2H, H-1), 5.14 (s, 2H, H-1'), 7.29-7.39 (m, 5H, H-3'/4'/5').

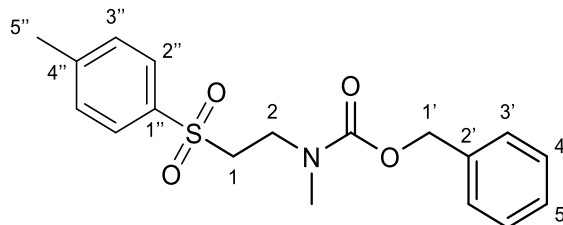
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

14.16 (NCH<sub>3</sub>), 21.00 (C-2), 60.37 (C-1'), 67.28 (C-1), 127.86 + 128.01 + 128.48 (C-3'/4'/5'), 136.60 (C-2'), 171.14 (NC(=O)O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3445, 3031, 2945, 2884, 1676, 1454, 1403, 1211, 1154, 1050.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  = 221, 258.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 210.1 [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> (209.10)ber.: 210.1124 [M+H]<sup>+</sup>gef.: 210.1119 [M+H]<sup>+</sup>.**Benzyl-(2-Tosylethyl)-N-(methyl)-carbamat****37**

Zu einer Lösung von Benzyl-(2-Hydroxyethyl)(methyl)-carbamate **33** (840 mg, 4.00 mmol) in DCM (12 mL) wurde Triethylamin (2.8 mL, 20.0 mmol) und 4-(Dimethylamino)pyridin (49.0 mg, 0.400 mmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung mit *para*-Toluolsulfonsäurechlorid (1.91 g, 10.0 mmol) portionsweise über einen Zeitraum von 10 min. versetzt. Die Reaktion wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Zitronensäure-Lösung (10%, 20 mL) beendet, die organische Phase mit dest. Wasser (10 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (29 x 2.5 cm, PE:EtOAc 1:1). Die Titelverbindung wurde als dunkelgelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 790 mg (2.40 mmol, 60%).**DC:** R<sub>f</sub> = 0.58 (PE:EtOAc 1:1).**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

2.43 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.45 (s, 3H, NCH<sub>3</sub><sup>i</sup>), 2.91 (s, 3H, 5''), 2.96 (s, 3H, 5''<sup>i</sup>), 3.50-3.56 (m, 4H, H-2/2<sup>i</sup>), 4.09-4.16 (m, 2H, H-1), 4.19 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, H-1<sup>i</sup>), 5.06 (s, 2H, 1'), 5.08 (s, 2H, 1'<sup>i</sup>), 7.24-7.41 (m, 14H, H-3'/4'/5'/3'<sup>i</sup>/4'<sup>i</sup>/5'<sup>i</sup>/2''/3''), 7.73 (d, *J* = 7.8 Hz, H-2''<sup>i</sup>), 7.78 (d, *J* = 8.2 Hz, H-3''<sup>i</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

21.59 (br) (5''/5''<sup>i</sup>), 35.90 (br) (NCH<sub>3</sub>/NCH<sub>3</sub><sup>i</sup>), 47.45 (C-2), 48.58 (C-2), 67.15 + 67.30 + 67.82 + 68.47 (C-1/1<sup>i</sup>/1''/1''<sup>i</sup>), 127.68 + 127.83 (br) + 127.90 + 127.99 + 128.05 + 128.47 (br) + 129.87 (br) (C- H-3'/4'/5'/3'<sup>i</sup>/4'<sup>i</sup>/5'<sup>i</sup>/2''/3''/2''<sup>i</sup>/3''<sup>i</sup>), 132.64 (C-4''), 132.73 (C-4''<sup>i</sup>),

136.37 (C-2'), 136.48 (C-2''i), 144.89 (1''), 144.96 (1''i), 155.62 (NC(=O)O), 156.10 (NC(=O)O<sup>i</sup>).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3021, 2890, 2335, 1721, 1599, 1497, 1448, 1211, 1122, 1028.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  = 225, 257, 262.

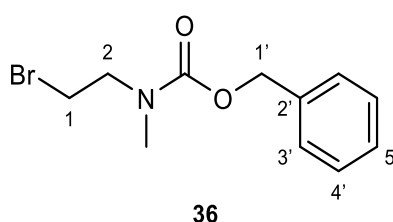
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 364.2 [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>S (363.11)

ber.: 364.1212 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 364.1203 [M+H]<sup>+</sup>.

### Benzyl-(2-Bromomethyl)-N-(methyl)-carbammat



Zu einer Lösung von Benzyl-(2-Hydroxyethyl)(methyl)-carbammat **33** (840 mg, 4.00 mmol) in DCM (26 mL) wurde Triphenylphosphin (1.15 g, 4.40 mmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung mit Tetrabromkohlenstoff (1.46 g, 4.40 mmol) portionsweise über einen Zeitraum von 10 min. versetzt. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von dest. Wasser (5.0 mL) beendet, die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (29 x 3 cm, PE:EtOAc 1:1). Die Titelverbindung wurde als klares, gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 1.07 g (3.93 mmol, 98%).

**DC:**  $R_f$  = 0.25 (PE:EtOAc 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

3.33 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 4.00 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H, H-2), 4.75 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H, H-1), 4.95 (s, 2H, H-1'), 7.69-7.88 (m, 5H, H-3'/4'/5').

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

31.08 (NCH<sub>3</sub>), 33.55 (C-2), 46.78 (C-1'), 61.43 (C-1), 128.37 + 128.74 + 128.98 (C-3'/4'/5'), 137.72 (C-2'), 158.76 (NC(=O)O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3449, 2890, 2731, 1729, 1497, 1440, 1403, 1268, 1122, 1042.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\max} = 225, 257, 262$ .

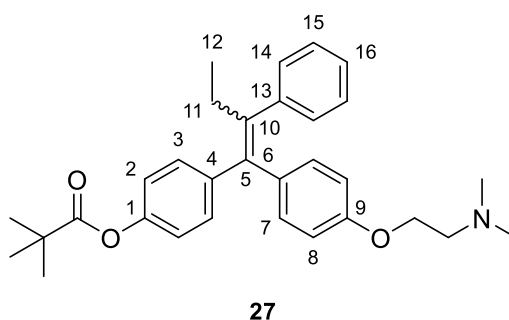
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 272.1$  [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>BrNO<sub>2</sub> (271.02)

ber.: 272.0280 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 272.0278 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 4-(1-(4-(2-(Dimethylamino)ethoxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat



#### *Synthese ausgehend von 4-(4-(2-(Dimethylamino)ethoxy)benzoyl)phenylpivalat 24*

Zink (4.71 g, 72 mmol) wurde in THF (130 mL) suspendiert, unter Eisbadkühlung zügig mit Titan(IV)-Chlorid (3.9 mL, 36.0 mmol) versetzt und die Reaktionslösung für 2 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur gebracht und eine Lösung von 4-(4-(2-(Dimethylamino)ethoxy)benzoyl)phenylpivalat **24** (3.35 g, 9.1 mmol) und Propiophenon (3.60 mL, 27 mmol) in THF (80 mL) zügig hinzu getropft. Die Reaktionsmischung wurde 3 h unter Lichtausschluss zum Rückfluss erhitzt und auf Raumtemperatur gebracht. Die Reaktionsmischung wurde in eine Kaliumcarbonat-Lösung gegossen (10%, 150 mL) und filtriert. Der Filterkuchen wurde in Essigsäureethyl-ester resuspendiert und erneut filtriert. Die Phasen der vereinigten Filtrate wurden getrennt, die Wässrige auf ca. ein Drittel des Gesamtvolumen im Vakuum eingeeengt und mit Essigester extrahiert (4 x 50 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen (100 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (32 x 2.5 cm, DCM:MeOH 12:1 + 1% NEt<sub>3</sub>) und die Titelverbindung als weißer Feststoff erhalten (E/Z = 4.3:1.0).

**Ausbeute:** 2.55 g (5.40 mmol, 60%).

*Synthese ausgehend von Synthese von 4-(1-(4-Hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat 22*



Zu einer Lösung von 4-(1-(4-Hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat (801 mg, 2.00 mmol) **22** in Dimethylformamid (7.0 mL) wurde Cäsiumcarbonat (2.28 g, 7.00 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung auf 50°C erhitzt. 2-Dimethylaminoethylchlorid Hydrochlorid (677 mg, 4.70 mmol) wurde portionsweise über einen Zeitraum von 15 min. hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 4 h auf 80 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur gebracht, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester (50 mL) aufgenommen, die organische Phase mit Natriumchlorid-Lösung (20 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (25 x 1.5 cm, DCM:MeOH 9:1). Die Titelverbindung wurde als weißer Feststoff erhalten (E/Z = 1.3:1.0).

**Ausbeute:** 140 mg (0.296 mmol, 15%).

**DC:**  $R_f = 0.29$  (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

0.92 (2 x t,  $J = 7.3$  Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 1.29 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>), 2.31 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.37 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>i</sup>), 2.49 (2 x q,  $J = 7.3$  Hz, 4H, H-11/11<sup>i</sup>), 2.67 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H, (CH)<sub>2</sub>N), 2.77 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.94 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H, (CH)<sub>2</sub>N<sup>i</sup>), 4.10 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 6.56 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7), 6.71 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 6.76 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8), 6.87 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.90 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 7.05 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 7.03-7.28 (m, 14H, H-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

13.52 (br, C-12/12<sup>i</sup>), 27.03 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.10 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>), 28.96 (C-11), 29.04 (C-11<sup>i</sup>), 38.93 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 39.05 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>), 45.86 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 45.89 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>i</sup>), 58.24 ((CH<sub>2</sub>)N), 58.29 ((CH<sub>2</sub>)N<sup>i</sup>), 65.62 (OCH<sub>2</sub>), 65.85 (OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 113.33 (C-8<sup>i</sup>), 114.06 (C-8), 120.17 (C-2), 121.01 (C-2<sup>i</sup>), 126.01 + 126.11 + 127.83 + 127.85 + 129.62 (br) + 130.37 + 130.58 + 131.68 + 131.85 (C-3/3<sup>i</sup>/7/7<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 135.25 + 135.79 + 137.34 + 137.45 (C-5/5<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>), 140.63 + 141.11 + 141.60 + 142.09 + 142.18 + 142.25 (C-4/4<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/13/13<sup>i</sup>), 148.78 + 149.63 + 156.78 + 157.59 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>), 176.89 (OC(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 177.08 (OC(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 115$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2976, 2874, 2772, 2425, 1746, 1605, 1503, 1279, 1240, 1197.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  = 237, 277.

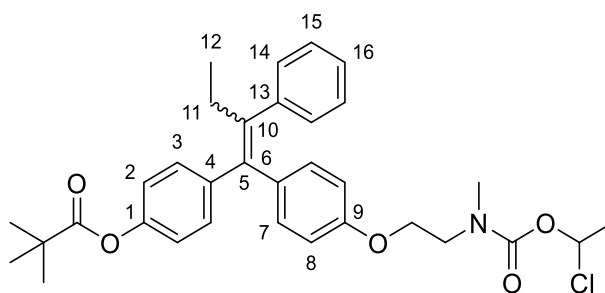
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 472.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>3</sub> (471.27)

ber.: 472.2845 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 472.2833 [M+H]<sup>+</sup>.

**4-(1-(4-(2-(((1-Chloroethoxy)carbonyl)(methyl)amino)ethoxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat**



**39**

Zu einer Lösung von 4-(1-(4-(2-(Dimethylamino)ethoxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat **27** (283 mg, 0.600 mmol) in 1,2-Dichlorethan (6.0 mL) wurde 1-Chloroethylchloroformiat (390  $\mu\text{L}$ , 3.60 mmol) tropfenweise über einen Zeitraum von 5 min. unter Eisbadkühlung zugegeben. Nach 10 min. wurde das Reaktionsgemisch zunächst auf Raumtemperatur erwärmt und für 20 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur gebracht und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (30 x 2.5 cm, EtOAc:PE 1:4) und die Titelverbindung als braunes, zähflüssiges Öl erhalten (E/Z = 2.7:1.0).

**Ausbeute:** 278 mg (0.492 mmol, 82%).

**DC:**  $R_f$  = 0.40 (EtOAc:PE 1:4).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

0.93 (2 x t,  $J$  = 7.5 Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 1.30 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>), 1.75-1.85 (m, 6H, O(Cl)CH(CH<sub>3</sub>)/O(Cl)CH(CH<sub>3</sub>)<sup>i</sup>), 2.53-2.45 (m, 4H, H-11/11<sup>i</sup>), 3.02 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.11 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 3H, NCH<sub>3</sub><sup>i</sup>), 3.74-3.50 (m, 4H, (CH)<sub>2</sub>N/(CH)<sub>2</sub>N<sup>i</sup>), 3.95-4.04 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.11-4.20 (m, 2H, OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 6.52 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H-7), 6.66-6.55 (m, 2H, O(Cl)CH(CH<sub>3</sub>)/O(Cl)CH(CH<sub>3</sub>)<sup>i</sup>), 6.73 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 6.78 (d,  $J$  =

8.8 Hz, 2H, H-8), 6.87 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3<sup>i</sup>), 6.85-6.90 (m, 4H, H-3<sup>i</sup>/7<sup>i</sup>), 7.06 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2), 7.05-7.21 (m, 10H, H-8<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 7.24 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

13.50 (C-12), 14.60 (C-12<sup>i</sup>), 25.41 (br, O(Cl)CH(CH<sub>3</sub>)/O(Cl)CH(CH<sub>3</sub>)<sup>i</sup>), 27.04 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.11 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>), 29.00 (C-11), 29.05 (C-11<sup>i</sup>), 35.59 (NCH<sub>3</sub>), 36.17 (NCH<sub>3</sub>), 38.94 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 39.06 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>), 48.11 ((CH<sub>2</sub>)N), 49.04 ((CH<sub>2</sub>)N<sup>i</sup>), 65.79 (OCH<sub>2</sub>), 66.09 (OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 83.05 (O(Cl)C(CH<sub>3</sub>)), 83.09 (O(Cl)C(CH<sub>3</sub>)<sup>i</sup>), 113.19 (C-7), 113.96 + 113.99 (C-3<sup>i</sup>/7<sup>i</sup>), 120.22 (C-2<sup>i</sup>), 121.07 (C-2), 130.35 (C-3), 126.09 + 126.17 + 127.89 + 129.59 + 130.69 + 130.71 + 131.65 (C-8<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 131.99 (C-8), 135.62 + 135.72 + 136.16 + 136.26 + 137.21 + 137.24 + 137.32 + 137.35 + 141.82 + 141.87 (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>/13/13<sup>i</sup>), 153.28 + 153.55 + 156.26 + 156.40 + 157.10 + 157.24 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>/CH<sub>3</sub>N(C=O)O/CH<sub>3</sub>N(C=O)O<sup>i</sup>), 176.87 (OC(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 177.06 (OC(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>).

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2976, 2874, 2772, 2425, 1746, 1605, 1503, 1279, 1240, 1197.

UV/VIS (MeOH):  $\lambda_{\max} = 238, 276$ .

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 564.3$  [M+H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>ClNO<sub>5</sub> (563.24)

ber.: 564.2511 [M+H]<sup>+</sup>,

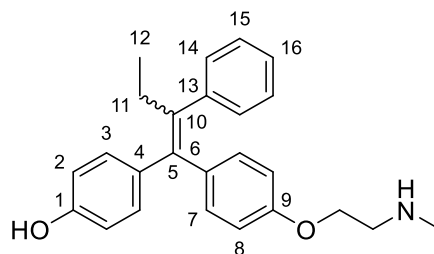
gef.: 564.2611 [M+H]<sup>+</sup>,

ber.: 458.2689 [-C(=O)O(ClCH(CH<sub>3</sub>))]<sup>+</sup>,

gef.: 458.2674 [-C(=O)O(ClCH(CH<sub>3</sub>))]<sup>+</sup>.

#### 4-(1-(4-(2-(Methylamino)ethoxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenol

(Endoxifen)



32

Zu einer auf -78 °C gekühlten Lösung von 4-(1-(4-(2-(((1-Chloroethoxy)carbonyl)(methylamino)ethoxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat **27** (800 mg, 1.42 mmol) in Tetrahydrofuran (50 mL) wurde Methyllithium (1.6 M in Diethylether,

12.0 mL, 19.2 mmol) tropfenweise über einen Zeitraum von 10 min. zugegeben und für 2 h bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (4.0 mL) beendet und die Reaktionsmischung auf ca. ein Drittel des Gesamtvolumens im Vakuum eingengt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Essigsäureethylester (4 x 20 mL) extrahiert und die vereinigte organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (31 x 1.5 cm, DCM:MeOH 9:1 + 1%  $\text{NEt}_3$ ). Die Titelverbindung wurde als weißer Feststoff erhalten (E/Z = 4.5:1.0).

**Ausbeute:** 344 mg (0.920 mmol, 65%).

**DC:**  $R_f = 0.24$  (DCM:MeOH 9:1 + 1%  $\text{NEt}_3$ ).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

0.93 (2 x t,  $J = 7.5$  Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 2.45-2.52 (m, 7H, H-11/11<sup>i</sup>/NCH<sub>3</sub>), 2.55 (s, 3H, NCH<sub>3</sub><sup>i</sup>), 2.93 (t,  $J = 5.0$  Hz, 3H, CH<sub>2</sub>N), 3.02 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N<sup>i</sup>), 3.96 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.11 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 6.42 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.50 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7), 6.67 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 6.75 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2), 6.76 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8), 6.85 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 7.03 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3), 7.07-7.18 (m, 12H, H-3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

13.61 (C-12), 13.64 (C-12<sup>i</sup>), 28.96 (C-11), 29.05 (C-11<sup>i</sup>), 35.92 (NCH<sub>3</sub>), 35.99 (NCH<sub>3</sub><sup>i</sup>), 50.60 ((CH<sub>2</sub>)N), 50.68 ((CH<sub>2</sub>)N<sup>i</sup>), 66.20 (OCH<sub>2</sub>), 66.49 (OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 113.19 (C-7), 113.95 (C-2<sup>i</sup>), 114.95 (7<sup>i</sup>), 115.19 (C-2), 125.82 (br) + 127.78 + 127.81 + 129.71 (br) + 130.58 + 130.69 (C-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 131.94 + 132.06 (C-8/8<sup>i</sup>), 134.98 + 135.29 + 136.22 + 136.70 + 137.93 (br) + 140.70 + 140.79 + 142.68 + 142.72 (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>/13/13<sup>i</sup>), 154.50 + 155.48 + 156.42 + 157.28 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 130\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Zersetzung).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3433, 3039, 2974, 2866, 2766, 1607, 1505, 1440, 1366, 1277.

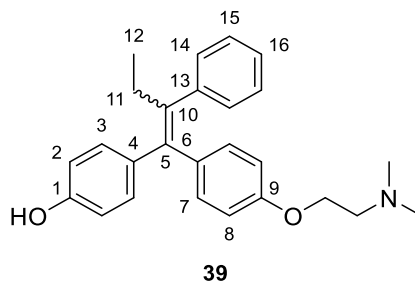
**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 210, 244, 285$ .

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 374.3$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{NO}_2$  (373.20)

ber.: 374.2114 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 374.2103 [M+H]<sup>+</sup>.

**4-(1-(4-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenol****(4-Hydroxytamoxifen)**

Zu einer Lösung von 4-(1-(4-(2-(Dimethylamino)ethoxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat **27** (132 mg, 280  $\mu\text{mol}$ ) in Tetrahydrofuran/Methanol (6.0 mL, 1:1) wurde Natronlauge (1 M, 1.0 mL, 560  $\mu\text{mol}$ ) gegeben und das Reaktionsgemisch 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Salzsäure (6 M, 500  $\mu\text{L}$ ) beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester (20 mL) aufgenommen, die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen (10 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (24 x 1.5 cm, DCM:MeOH 9:1 + 1%  $\text{NEt}_3$ ). Die Titelverbindung wurde als weißer Feststoff erhalten (E/Z = 2.7:1.0).

**Ausbeute:** 93.0 mg (240  $\mu\text{mol}$ , 86%).

**DC:**  $R_f = 0.29$  (DCM:MeOH 9:1 + 1%  $\text{NEt}_3$ ).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

0.92 (2 x t,  $J = 7.5$  Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 2.39 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.45 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2^i$ ), 2.47-2.53 (m, 4H, H-11/11<sup>i</sup>), 2.78 (t,  $J = 5.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.88 (t,  $J = 5.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{N}^i$ ), 3.92 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 4.10 (t,  $J = 5.3$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2^i$ ), 6.29 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.46 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-7), 6.64-6.71 (m, 6H, H-2<sup>i</sup>/8/8<sup>i</sup>), 6.80 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 7.04 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3), 7.07-7.18 (m, 12H, H-3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

13.61 (C-12), 13.66 (C-12<sup>i</sup>), 28.91 (C-11), 29.06 (C-11<sup>i</sup>), 44.95 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.10 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2^i$ ), 57.68 ( $(\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 57.93 ( $(\text{CH}_2)_2\text{N}^i$ ), 64.07 ( $\text{OCH}_2$ ), 64.53 ( $\text{OCH}_2^i$ ), 112.95 (C-7), 113.74 (C-2<sup>i</sup>), 114.69 (7<sup>i</sup>), 115.38 (C-2), 125.73 (br) + 127.75 + 127.79 + 129.69 + 129.72 + 130.50 + 130.62 (C-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 131.89 + 132.05 (C-8/8<sup>i</sup>), 134.84 + 135.06 +

136.11 + 136.67 + 138.01 + 138.03 + 140.43 + 140.54 + 142.76 + 142.78 (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>/13/13<sup>i</sup>), 154.67 + 155.72 + 156.26 + 157.07 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 156$  °C.

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3433, 3039, 2974, 2866, 2766, 1607, 1505, 1440, 1366, 1277.

**UV/VIS (MeOH):**  $\lambda_{\text{max}} = 244, 286$ .

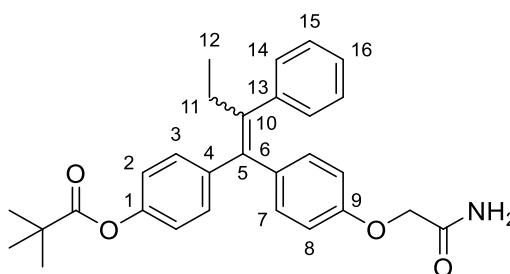
**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 388.3$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>2</sub> (387.21)

ber.: 388.2270 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 388.2258 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 4-(1-(4-(2-Amino-2-oxoethoxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat



29

Zu einer Lösung von 4-(1-(4-Hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat **23** (2.00 g, 5.00 mmol) in Aceton (26.0 mL) wurde Kaliumcarbonat (2.76 g, 20.0 mmol) gegeben und Iodacetamid (1.01 g, 5.50 mmol) portionsweise über einen Zeitraum von 15 min. hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur gebracht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester (100 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Natriumchlorid-Lösung gewaschen (25 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (27 x 3.0 cm, PE:EtOAc 1:3). Die Titelverbindung wurde als weißer Feststoff erhalten (E/Z = >99:1).

**Ausbeute:** 2.20 g (4.81 mmol, 96%).

**DC:**  $R_f = 0.40$  (PE:EtOAc 1:3).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

0.92 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, H-12), 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.48 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2H, H-11), 4.37 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 6.57 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7), 6.81 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8), 7.03-7.26 (m, 9H, H-2/3/14/15/16).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

13.49 (C-12), 27.13 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.04 (C-11), 39.09 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 66.93 (OCH<sub>2</sub>), 113.53 (C-7), 121.17 (C-2), 126.22 + 127.92 + 129.59 + 130.36 + 132.19 (C-3/8/14/15/16), 136.85 + 136.96 + 140.80 + 142.06 + 142.41 (C-4/5/6/10/13), 149.77 + 155.04 (C-1/9), 170.81 (C(=O)NH<sub>2</sub>), 177.13 (OC(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 148$  °C.

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3476, 3423, 3162, 2972, 1752, 1666, 1601, 1505, 1476, 1407.

**UV/VIS (MeOH):**  $\lambda_{max} = 235, 277$ .

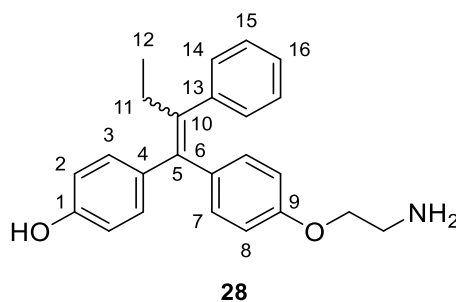
**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 458.2$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>4</sub> (457.22)

ber.: 458.2325 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 458.2326 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 4-(1-(4-(2-Aminoethoxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenol (Norendoxifen)



Zu einer Lösung von Lithiumaluminiumhydrid (2.88 g, 76.0 mmol) und Aluminiumtrichlorid (2.93 g, 22.0 mmol) in THF (60 mL) wurde eine Lösung von 4-(1-(4-(2-Aminoethoxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat **29** (2.29 g, 5.00 mmol) in THF (60 mL) unter Eisbadkühlung portionsweise über einen Zeitraum von 30 min. hinzuge-  
tropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und die Re-  
aktion durch Zugabe von Eiswasser (40 mL) beendet. Die Reaktionsmischung wurde fil-  
triert und das Lösungsmittel auf ca. ein Drittel des Gesamtvolumens im Vakuum einge-  
engt. Die Reaktionsmischung wurde mit Essigsäureethylester (3 x 50 mL) extrahiert, die  
vereinigte organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen

und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (27 x 3.0 cm, PE:EtOAc 1:3). Die Titelverbindung wurde als weißer Feststoff erhalten (E/Z = 1.6:1).

**Ausbeute:** 2.20 g (4.81 mmol, 96%).

**DC:**  $R_f = 0.13$  (DCM:MeOH 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$  in ppm):

2x 0.85 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 2.35-2.45 (m, 4H, H-11/11<sup>i</sup>), 2.78 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $(\text{CH}_2)\text{NH}_2$ ), 2.88 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2^i$ ), 3.76 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.93 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2^i$ ), 6.40 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7), 6.57 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.60 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8), 6.70 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 6.75 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2), 6.92 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 6.98 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3), 7.05-7.20 (m, 12H, H-3/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$  in ppm):

13.40 (C-12/12<sup>i</sup>), 28.52 (C-11), 29.18 (C-11<sup>i</sup>), 40.85 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 40.94 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2^i$ ), 69.77 ( $\text{OCH}_2$ ), 70.02 ( $\text{OCH}_2^i$ ), 113.28 (C-7), 114.06 (C-7<sup>i</sup>), 114.27 (C-2), 114.93 (C-2<sup>i</sup>), 125.88 + 125.92 + 127.81 + 127.86 + 129.37 (br) (C-14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 130.09 (br, C-3/3<sup>i</sup>), 131.36 (C-8), 131.38 (C-8<sup>i</sup>), 133.60 + 133.90 + 135.40 + 135.65 + 137.89 (br) + 139.68 + 139.87 (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>), 142.22 (C-13), 142.24 (C-13<sup>i</sup>), 155.22 (C-9), 156.08 (C-9<sup>i</sup>), 156.49 (C-1), 157.33 (C-1<sup>i</sup>).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 148$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3359, 3296, 3045, 2658, 1893, 1589, 1507, 1464, 1389, 1268.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 244, 285$ .

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 360.3$  [M+H]<sup>+</sup>.

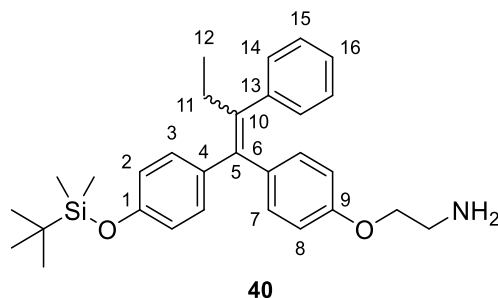
**C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>** (359.18)

ber.: 360.1957 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 360.1937 [M+H]<sup>+</sup>.



**2-(4-(1-(4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenoxy)ethan-1-amin**



Zu einer Lösung von (*E/Z*)-Norendoxifen (108 mg, 0.300 mmol) in THF (1.0 mL) wurde Natriumhydrid (60% in Mineralöl, 20.0 mg, 0.330 mmol) unter Eisbadkühlung hinzu gegeben und 30 min. unter Eisbadkühlung gerührt. Anschließend wurde *tert*-Butyldimethylchlorosilan (226 mg, 1.50 mmol) hinzugegeben und die Reaktion weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (1.0 mL) beendet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester (5.0 mL) aufgenommen, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (1.0 mL) gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (20 x 1.0 cm, DCM:MeOH 9:1). Die Titelverbindung wurde als weißer Schaum erhalten (*E/Z* = > 99:1).

**Ausbeute:** 120 mg (0.250 mmol, 84%).

**DC:**  $R_f = 0.36$  (DCM:MeOH 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

0.24 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.95 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, H-12), 1.01 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.35-2.45 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2H, H-11), 2.86 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 2.97-3.07 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.87 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H,  $\text{O}(\text{CH}_2)$ ), 6.54 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-7), 6.78 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-8), 6.81 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2), 7.06-7.20 (m, 7H, H-3/14/15/16).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

-4.39 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 13.57 (C-12), 25.66 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 29.03 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 30.91 (C-11), 40.68 ( $(\text{CH}_2)\text{NH}_2$ ), 67.28 ( $\text{O}(\text{CH}_2)$ ), 113.33 (C-7), 119.52 (C-2), 125.90 + 127.83 + 129.66 + 130.49 (C-3/14/15/16), 136.33 + 136.69 + 137.79 + 141.12 + 142.60 (C-4/5/6/10/13), 154.27 + 156.21 (C-1/9).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 112$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3031, 2956, 2929, 2858, 1603, 1505, 1460, 1244, 1168, 1101.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  = 210, 243, 283.

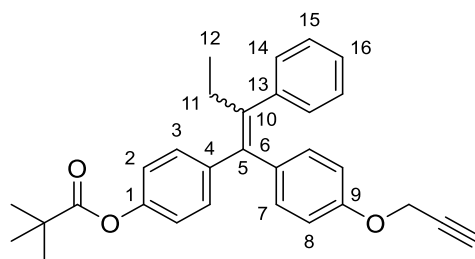
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 474.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>2</sub>Si (473.27)

ber.: 474.2822 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 474.2808 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 4-(2-Phenyl-1-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)but-1-en-1-yl)phenylpivalat



**30**

Zu einer Lösung von 4-(1-(4-Hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenylpivalat **29** (500 mg, 1.25 mmol) in Aceton (7.0 mL) wurde Kaliumcarbonat (690 g, 5.00 mmol) gegeben und Propargylbromid (80% in Toluol, 480  $\mu\text{L}$ , 5.00 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur gebracht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser (10 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester 3 x 10 mL) extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (29 x 3.0 cm, PE:EtOAc 9:1). Die Titelverbindung wurde als weißer Feststoff erhalten (E/Z = 2.0:1.0).

**Ausbeute:** 444 mg (1.01 mmol, 81%).

**DC:**  $R_f$  = 0.50 (PE:EtOAc 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

2x 0.97 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 1.30 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>), 2.44-2.57 (m, 6H, H-11/11<sup>i</sup>+ C $\equiv$ CH/C $\equiv$ CH<sup>i</sup>), 4.56 (t,  $J$  = 2.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.72 (t,  $J$  = 2.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 6.62 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-7), 6.72 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.80 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-8), 6.86 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 6.97 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-2), 7.07 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 7.10-7.22 (m, 12H, H-3/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 7.25 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-3<sup>i</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

13.21 (br, C-12/12<sup>i</sup>), 26.75 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.82 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>), 28.72 (C-11), 28.74 (C-11<sup>i</sup>), 38.66 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 38.77 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>), 55.35 (OCH<sub>2</sub>), 55.52 (OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 74.98 (C≡CH), 75.20 (C≡CH<sup>i</sup>), 78.27 (C≡CH), 78.31 (C≡CH<sup>i</sup>), 113.36 (C-7), 114.13 (C-7<sup>i</sup>), 114.93 (C-2), 120.78 (C-2<sup>i</sup>), 125.79 + 125.87 + 127.58 (br) + 129.31 + 130.10 (C-14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 130.10 (C-3), 130.34 (C-3<sup>i</sup>), 131.39 (C-8), 131.60 (C-8<sup>i</sup>), 135.80 + 136.34 + 136.89 + 137.01 + 140.22 + 140.69 + 141.66 + 141.80 + 141.86 + 142.03 (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>/13/13<sup>i</sup>), 148.56 + 149.40 + 155.29 + 156.07 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>), 176.61 (OC(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 176.80 (OC(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>i</sup>).

**Schmelzpunkt:** T<sub>m</sub> = 178 °C.

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3445, 3262, 3037, 2962, 2870, 1603, 1503, 1438, 1368, 1217.

**UV/VIS (MeOH):**  $\lambda_{\max}$  = 244, 285.

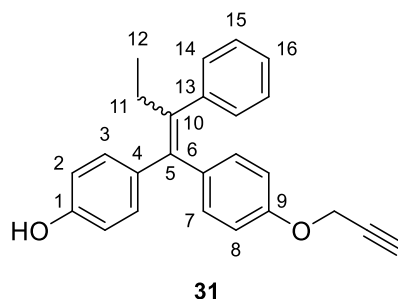
**MS (ESI<sup>+</sup>):** m/z = 439.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub> (438.21)

ber.: 439.2267 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 439.2245 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 4-(2-Phenyl-1-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)but-1-en-1-yl)phenol



Zu einer Lösung von 4-(2-Phenyl-1-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)but-1-en-1-yl)phenylpivalat **30** (228 mg, 0.520 mmol) in Tetrahydrofuran/Methanol (10.0 mL, 1:1) wurde Natronlauge (1 M, 1.0 mL, 1.00 mmol) gegeben das Reaktionsgemisch für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Salzsäure (1 M, 1.0 mL) beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester (20 mL) aufgenommen, die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen (10 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (20 x 3 cm, PE:EtOAc 9:1). Die Titelverbindung wurde als weißer Feststoff erhalten (E/Z = 1.0:1.0).

**Ausbeute:** 182 mg (0.513 mmol, 99%).

**DC:**  $R_f = 0.11$  (PE:EtOAc 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

2x 0.95 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 2.46-2.54 (m, 6H, H-11/11<sup>i</sup>+ C $\equiv$ CH), 2.56 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, C $\equiv$ CH<sup>i</sup>), 4.56 (t,  $J = 2.4$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.72 (t,  $J = 2.4$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 6.48 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-7), 6.63 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.75 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-8), 6.80 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 6.82 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2), 6.98 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 7.09-7.21 (m, 14H, H-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

13.21 (br, C-12/12<sup>i</sup>), 28.72 (C-11), 28.74 (C-11<sup>i</sup>), 55.35 (OCH<sub>2</sub>), 55.52 (OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 74.98 (C $\equiv$ CH), 75.20 (C $\equiv$ CH<sup>i</sup>), 78.27 (C $\equiv$ CH), 78.31 (C $\equiv$ CH<sup>i</sup>), 113.36 (C-7), 114.13 (C-7<sup>i</sup>), 114.39 (C-2), 114.94 (C-2<sup>i</sup>), 125.93 + 125.95 + 127.81 + 127.83 + 129.66 (br) + 130.57 + 130.77 (C-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 131.89 (C-8), 132.09 (C-8<sup>i</sup>), 135.88 + 136.29 + 136.64 + 137.09 + 137.52 + 137.55 + 141.18 + 141.36 + 142.46 + 142.50 (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>/13/13<sup>i</sup>), 153.35 + 154.19 + 155.49 + 156.27 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 101$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3402, 3290, 3039, 2962, 2925, 2854, 2123, 1706, 1606, 1508.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 237, 278$ .

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 355.2$  [M+H]<sup>+</sup>.

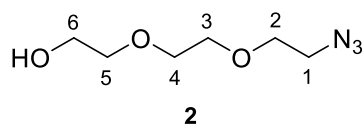
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub> (354.16)

ber.: 355.1692 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 355.1660 [M+H]<sup>+</sup>.

## 7.5.2 Synthese von Triethylenglycol-Derivaten

### 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol



2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethan-1-ol **1** (16.8 g, 100 mmol) wurde in DMF (100 mL) gelöst, die Lösung mit Natriumazid (13.0 g, 200 mmol) versetzt und die Reaktion für 24 h auf 90 °C unter starkem Rühren erhitzt. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur gebracht, überschüssiges Natriumazid abfiltriert und der ölige Rückstand nach Abzug des Lösemittels in dest. Wasser aufgenommen (100 mL). Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (4 x 50 mL) extrahiert, die vereinigte organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Titelverbindung als leicht viskoses, bräunliches Öl erhalten.

**Ausbeute:** 17.2 g (98 mmol, 98%).

**DC:**  $R_f = 0.26$  (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

2.43 (br s, 1H, OH), 3.35-3.41 (m, 2H, H-1), 3.58-3.63 (m, 2H, H-6), 3.64-3.75 (m, 8H, H-2/3/4/5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

50.60 (C-6), 61.76 (C-1), 70.07 + 70.31 + 70.61 + 72.48 (C-2/3/4/5).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2783437, 2869, 2095, 1668, 1440, 1350, 1284, 1118, 1062, 935.

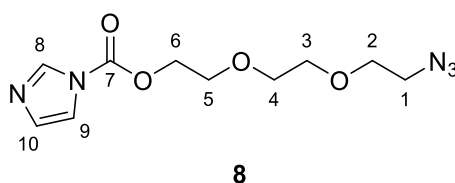
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 176.3$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (175.19)

ber.: 176.1029 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 176.1021 [M+H]<sup>+</sup>.

### 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-1*H*-imidazol-1-carboxylat



2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (**8**) (4.03, 23.0 mmol) wurde zu einer Suspension von Molekularsieb (4 Å, 5.00 g) in THF (40 mL) gegeben. 1,1'-Carbonyldiimidazol (4.10 g, 25.3 mmol) wurde hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester (100 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (25 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Titelverbindung als farbloses Öl erhalten.

**Ausbeute:** 5.02 g (19.0 mmol, 81%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

2.43 (br s, 1H, OH), 3.35-3.41 (m, 2H, H-6), 3.58-3.63 (m, 2H, H-1), 3.64-3.69 (m, 6H, H-2/3/4), 3.70-3.75 (m, 2H, 5-H), 7.24 (s, 1H, H-10), 7.64 (s, 1H, H-9), 8.34 (s, 1H, H-8).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

49.95 (C-1), 66.56 (C-6), 68.00 + 69.42 + 70.05 + 70.10 (C-2/3/4/5), 116.64 (C-9), 129.94 (C-10), 136.51 (C-8), 148.01 (C-7).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3125, 2868, 2099, 1760, 1603, 1472, 1395, 1283, 1240, 1179.

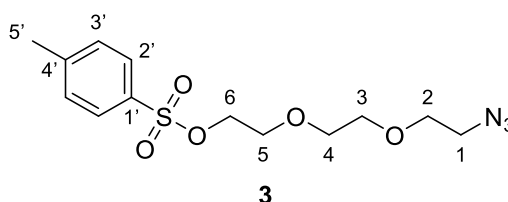
**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 270.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (269.11)

ber.: 270.1196 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 270.1187 [M+H]<sup>+</sup>.

### 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyltosylat



2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol **2** (9.63 g; 55.0 mmol) wurde in DCM (200 mL) gelöst und mit Triethylamin (38.0 mL, 275 mmol) und 4-(Dimethylamino)pyridin (670 mg, 5.50 mmol) versetzt. Zur Reaktionsmischung wurde anschließend eine Lösung von *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (26.2 g, 138 mmol) in DCM (200 mL) unter Eisbadkühlung über einen Zeitraum von 1 h getropft. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion durch Zugabe von Wasser (100 mL)

beendet. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert (3 x 40 mL) und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (200 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (5.5 x 23 cm, *n*-Hexan:EtOAc 2:1 → 1:1) und die Titelverbindung als bernsteinfarbenes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 16.0 g (49.0 mmol, 81%).

**DC:**  $R_f = 0.43$  (*n*-Hexan:EtOAc 2:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

2.43 (s, 3H, H-10), 3.35 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H, H-1), 3.52-3.59 (m, 4H, H-3/4), 3.62 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H, H-2), 3.68 (t,  $J = 4.7$  Hz, 2H, H-5), 4.15 (t,  $J = 4.7$  Hz, 2H, H-6), 7.34 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-2'), 7.78 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-3').

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

21.91 (C-5'), 50.31 (C-1), 68.42 (C-6), 69.00 (C-5), 69.71 (C-2), 70.25 + 70.43 (C-3/4), 127.66 (C-2'), 129.5 (C-3'), 132.8 (C-4'), 144.7 (C-1').

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2869, 2098, 1596, 1450, 1353, 1290, 1174, 1095, 1014, 919.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 222, 262, 273$ .

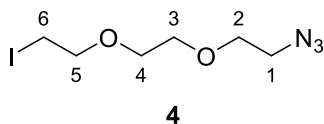
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 352.2$  [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$  (329.10)

ber.: 330.1117 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 330.1099 [M+H]<sup>+</sup>.

### Synthese von 1-Azido-2-(2-(2-Iodethoxy)ethoxy)ethan



2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyltosylat **3** (10.2 g, 31.0 mmol) wurde zu einer Suspension von Natriumiodid (13.9 g, 93 mmol) in DMF (150 mL) gegeben und 1 d bei 90°C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in Wasser (100 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (3 x 40 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Natriumthiosulfatlösung (40 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (40 mL) gewaschen. Die

organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (5.5 x 19 cm, *n*-Hexan:EtOAc 2:1 → 1:1) und die Titelverbindung als golden-farbiges Öl erhalten.

**Ausbeute:** 8.70 g (31.0 mmol, 81%).

**DC:**  $R_f = 0.43$  (*n*-Hexan:EtOAc 2:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

2.43 (br s, 1H, OH), 3.35-3.41 (m, 2H, H-1), 3.58-3.63 (m, 2H, H-6), 3.64-3.69 (m, 6H, H-2/3/4), 3.70-3.75 (m, 2H, H-5)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

50.64 (C-6), 61.71 (C-1), 69.91 + 70.31 + 70.64 + 72.49 (C-2/3/4/5).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2869, 2098, 1596, 1450, 1353, 1290, 1174, 1095, 1014, 919.

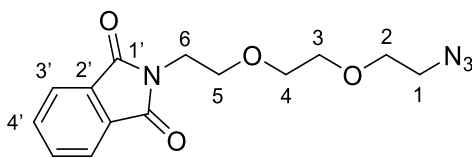
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 307.9$  [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$  (284.99)

ber.: 286.1092 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 286.1066 [M+H]<sup>+</sup>.

### 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl)isoindolin-1,3-dion



11

Zu einer Lösung von Triphenylphosphin (3.14 g, 12 mmol) in THF (50 mL) wurde Diethylazodicarboxylat (40% in Toluol, 4.7 mL, 12 mmol) unter Eisbadkühlung zügig zuge tropft und für 20 min. gerührt. Zu dieser Lösung wurde anschließend portionsweise Phthalimid (1.76 g, 12 mmol) gegeben und weitere 20 min. bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanol **2** (1.75 g, 10 mmol) hinzuge tropft und die Reaktionslösung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (10 mL) beendet und die Reaktionsmischung im Vakuum auf ca. ein Drittel eingengt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester (100 mL) aufgenommen, mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen (30 mL) und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Filtrat wurde im Vakuum



auf ca. ein Drittel eingengt, mit Kieselgel versetzt (30 g) und auf Selbiges durch Entfernen des Lösungsmittels aufgezogen. Die Titelverbindung wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (5.5 x 22 cm, PE:EtOAc 2:1 → 1:1) als weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 2.14 g (7.04 mmol, 70%).

**DC:**  $R_f = 0.27$  (PE:EtOAc 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

3.30 (d,  $J = 5.0$  Hz, 2H, H-1), 3.75 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H, H-5), 3.90 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H, H-6), 7.71 (dd,  $J = 5.3$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 2H, H-4'), 7.86 (dd,  $J = 5.3$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 2H, H-3').

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

37.23 (C-6), 50.59 (C-1), 67.97 + 69.98 + 70.13 + 70.59 + (C-2/3/4/6), 123.16 (C-4'), 132.08 (C-2'), 133.89 (C-3'), 166.23 (C-1').

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2867, 2102, 1772, 1704, 1392, 1261, 1108, 1022, 873, 717.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 218, 293$ .

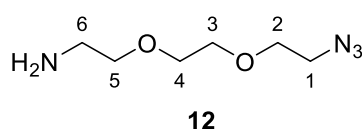
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 327.2$  [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4$  (304.11)

ber.: 305.1244 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 305.1225 [M+H]<sup>+</sup>.

## 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethanamin



Eine Lösung von 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl)isoindolin-1,3-dion **11** (6.69 g, 22.0 mmol) in Ethanol (70.0 mL) wurde mit Hydrazin-Monohydrat (64%, 3.30 mL, 66.0 mmol) versetzt und 3 h bei 60 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung in kaltes Chloroform (70 mL) gegossen und der ausgefallene Feststoff entfernt. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Titelverbindung als leicht viskoses, rötliches Öl erhalten.

**Ausbeute:** 3.75 g (21.5 mmol, quant.).

**DC:**  $R_f = 0.16$  (DCM:MeOH 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

2.06 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.88 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, H-1), 3.39 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, H-4), 3.52 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, H-2), 3.70-3.81 (m, 6H, H-3/5/6).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

41.62 (C-4), 50.63 (C-1), 70.01 + 70.26 + 70.62 (C-3 + C-5 + C-6), 73.21 (C-2).

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3294, 2979, 2912, 2869, 2105, 1720, 1517, 1228, 1062, 771.

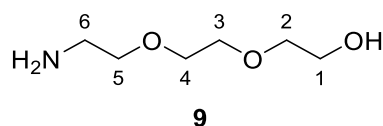
MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 175.3 [M+H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (174.11)

ber.: 175.1179 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 175.1189 [M+H]<sup>+</sup>.

### 2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol



Zu einer Lösung von Triphenylphosphin (1.73 g, 6.60 mmol) in THF (20.0 mL) wurde 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol **2** (1.05 g, 6.00 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser Lösung wurde Wasser (2.0 mL) gegeben und die Reaktionsmischung weitere 3 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Toluol (50 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser (3 x 20 mL) extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Titelverbindung wurde als klare, farblose Flüssigkeit erhalten.

**Ausbeute:** 804 mg (5.38 mmol, 90%).

**DC:** *R<sub>f</sub>* = 0.21 (DCM:MeOH:NEt<sub>3</sub> 80:18:2).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

2.19 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.88 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H-1), 3.55 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H-2), 3.59-3.70 + 3.71-3.75 (m, 6H, H-3/5/6).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

41.56 (C-6), 61.63 (C-1), 70.15 + 70.40 + 72.64 + 73.08 (C-2/3/4/5).

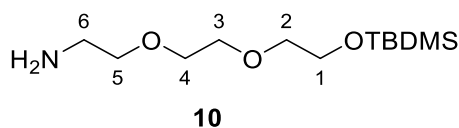
IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3364, 2872, 1654, 1595, 1452, 1350, 1299, 1242, 1107, 1068.

MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 150.1 [M+H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (149.10)

ber.: 150.1117 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 150.1224 [M+H]<sup>+</sup>.

**2,2,3,3-tetramethyl-4,7,10-trioxa-3-siladodecan-12-amin**

Eine Lösung von 2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol **9** (298 mg, 2.00 mmol) in Tetrahydrofuran (3.6 mL) wurde unter Eisbadkühlung mit Imidazol (270 mg, 4.00 mmol) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (360 mg, 2.4 mmol) versetzt und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2.4 mL) beendet und das Reaktionsvolumen im Vakuum auf ca. ein Drittel eingengt. Die Reaktionsmischung wurde mit Essigsäureethylester extrahiert (3 x 5 mL) und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (200 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (1.5 x 18 cm, DCM:MeOH:NEt<sub>3</sub> 80:18:2) und die Titelverbindung als klares, farbloses Öl erhalten.

**Ausbeute:** 413 mg (1.57 mmol, 79%).

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.58 (DCM:MeOH:NEt<sub>3</sub> 80:18:2).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

0.07 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.90 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.88 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, 1-H), 3.50-3.69 (m, 8H, H-2/3/4/5), 3.78 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, H-6).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

-3.58 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.83 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.43 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 61.63 (C-6), 62.99 (C-1), 71.95 + 72.50 + 72.62 + 72.93 (C-2/3/4/5).

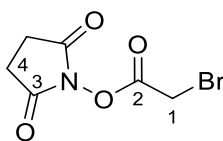
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3121, 3021, 2927, 2858, 1595, 1472, 1358, 1326, 1252, 1105.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 264.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>12</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>3</sub>Si (263.19)

ber.: 264.1989 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 264.1976 [M+H]<sup>+</sup>.

***N*-(Bromacetoxy)succinimid****13**

Zu einer Lösung von EDC-Hydrochlorid (1.92 g, 10.0 mmol) in DCM (50 mL) wurden Bromessigsäure (1.39 g, 10 mmol) und *N*-Hydroxysuccinimid (1.15 g, 10.0 mmol) gegeben und die Reaktionslösung 5 h bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen (2 x 50 mL) und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Titelverbindung als weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 2.35 g (10 mmol, quant.)

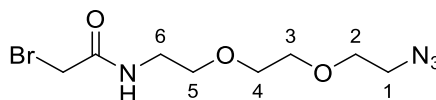
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

2.88 (br s, 4H, C-1), 4.38 (s, C-4).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

25.53 (C-1), 37.81 (C-4), 163.17 (C-3), 168.39 (C-2).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 112$  °C

***N*-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl)-2-bromacetamid****14**

Zu einer Lösung von 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethanamin **12** (172 mg, 0.990 mmol) in Chloroform (10.0 mL) wurde *N*-(Bromacetoxy)succinimid (233 mg, 0.990 mmol) hinzugegeben und die Reaktionslösung 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (2.0 mL) beendet und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (23 x 1.5 cm, DCM:MeOH 93:7). Die Titelverbindung wurde als farbloses, klares Öl erhalten.

**Ausbeute:** 208 mg (0.705 mmol, 71%).

**DC:**  $R_f = 0.37$  (DCM:MeOH 93:7).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

3.50-3.56 (m, 2H, 6-H), 3.58-3.69 + 3.73-3.76 (m, 10H, 1/2/3/4/5-H), 3.87 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 7.05 (br s, -NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

29.03 (CH<sub>2</sub>Br), 39.84 (C-6), 61.69 (C-1), 69.37 + 70.28 + 70.30 + 72.45 (C-2/3/4/5), 165.80 (CH<sub>2</sub>C(=O)N).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3323, 2927, 2849, 2101, 1742, 1658, 1623, 1536, 1436, 1309.

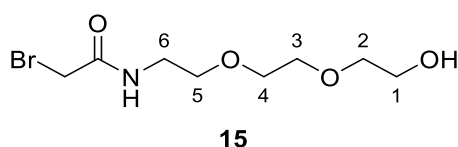
**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 317.2 [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (294.03)

ber.: 295.0400 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 295.0385 [M+H]<sup>+</sup>.

### 2-Brom-*N*-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl)acetamid



Zu einer Lösung von 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethanamin **12** (62.6 mg; 0.460 mmol) in Chloroform (4.2 mL) wurde *N*-(Bromacetoxysuccinimid) (99.1 mg, 0.460 mmol) hinzugegeben und die Reaktionslösung 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (1.0 mL) beendet und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (23 x 1.5 cm, DCM:MeOH 93:7). Die Titelverbindung wurde als farbloses, klares Öl erhalten.

**Ausbeute:** 78.5 mg (0.291 mmol, 69%).

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.30 (DCM:MeOH 95:5).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

2.57 (br s, 1H, OH), 3.50-3.56 (m, 2H, 6-H), 3.58-3.69 + 3.73-3.76 (m, 10H, 1/2/3/4/5-H), 3.87 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 7.05 (br s, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

29.10 (CH<sub>2</sub>Br), 39.86 (C-6), 50.64 (C-1), 69.39 + 70.11 + 70.35 + 70.54 (C-2/3/4/5), 165.53 (CH<sub>2</sub>C(=O)N).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3284, 3076, 2872, 1736, 1654, 1544, 1446, 1350, 1293, 1093.

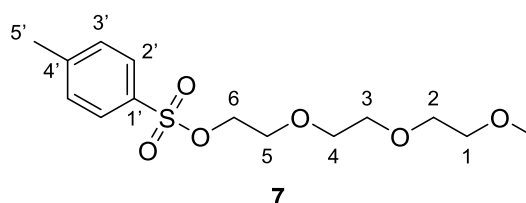
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 292.1 [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>BrNO<sub>4</sub> (270.02)

ber.: 271.0407 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 271.0385 [M+H]<sup>+</sup>.

### 2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)-*p*-toluolsulfonat



Triethylglycolmonomethylether **6** (2.46 g, 15.0 mmol) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (2.86 mL, 15.0 mmol) wurden in DCM (15.0 mL) gelöst und portionsweise mit Kaliumhydroxid (3.37 g, 60.0 mmol) über einen Zeitraum von 15 min. unter Eisbadkühlung versetzt. Das Gemisch wurde anschließend 1 h bei 0°C gerührt bevor die Reaktion durch Zugabe von Wasser (30 mL) beendet wurde. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert (2 x 15 mL) und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Titelverbindung als farblose, klare Flüssigkeit erhalten.

**Ausbeute:** 4.44 g (13.9 mmol, 93%).

**DC:**  $R_f$  = 0.31 (PE:EtOAc 1:3).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

2.43 (s, 3H, H-5'), 3.35 (s, 3H, OMe), 3.49-3.56 (m, 2H, H-1), 3.57-3.61 (m, 6H, H-4/3/2), 3.67 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 2H, H-5), 4.14 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 2H, H-6), 7.33 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-2'), 7.78 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-3').

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

21.53 (C-5'), 58.92 (OMe), 68.54 (C-5), 69.15 (C-6), 70.42 (C-2), 70.44 (C-3), 70.61 (C-1), 127.86 (C-2'), 129.72 (C-3'), 132.86 (C-4'), 144.71 (C-1').

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2878, 1597, 1452, 1354, 1175, 1097, 1015, 918, 663, 552.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  = 221, 262, 273.

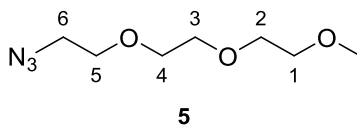
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 341.2 [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>S (318.11)

ber.: 319.1209 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 319.1192 [M+H]<sup>+</sup>.

### Synthese von 1-Azido-2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethan



2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)-*p*-toluolsulfonat **7** (2.23 g, 7.00 mmol) wurde in DMF (21 mL) gelöst, mit Natriumazid (3.15 g, 21.0 mmol) versetzt und das Reaktionsgemisch für 16 h bei 80 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, der Feststoff durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (50 mL) aufgenommen und mit Essigsäureethylester (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (25 x 2 cm, PE:EE 1:4) und die Titelverbindung als farblose, klare Flüssigkeit erhalten.

**Ausbeute:** 960 mg (5.10 mmol, 73%).

**DC:**  $R_f = 0.45$  (PE:EtOAc 1:4).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

3.33 (s, 3H, OMe), 3.34 (t,  $J = 5.0$  Hz 2H, H-6), 3.49-3.53 (m, 2H) + 3.65-3.60 (m, 8H) (H-1/2/3/4/5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ in ppm):

50.47 (OMe), 58.82 (C-6), 69.84 + 70.41 + 70.46 + 70.49 + 71.73 (C-1/2/3/4/5).

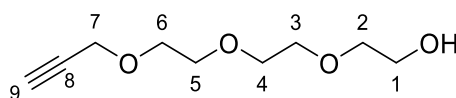
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2872, 2099, 1452, 1350, 1285, 1199, 1105, 1028, 936, 850.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 212.1$  [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (189.11)

ber.: 190.1185 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 190.1177 [M+H]<sup>+</sup>.

**2-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol****18**

Triethylenglycol **17** (4.51 g, 30.0 mmol) wurde in DMF (90 mL) gelöst und mit Natriumhydrid (60%, 960 mg, 24.0 mmol) unter Eisbadkühlung über einen Zeitraum von 15 min. versetzt. Nach 15 min. wurde Propargylbromid (80%; 3.57 mL, 20.0 mmol) über einen Zeitraum von 30 min. hinzugegeben und die Reaktion 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion durch Zugabe von Wasser (10 mL) beendet und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen (50 mL) und die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (20 x 4 cm, PE:EtOAc 3:2). Die Titelverbindung wurde als farbloses, klares Öl erhalten.

**Ausbeute:** 3.77 g (20.1 mmol, 67%).

**DC:**  $R_f = 0.16$  (DCM:MeOH 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

2.43 (t,  $J = 2.3$  Hz, 1H, H-9), 2.54 (br s, 1H, OH), 3.56-3.76 (m, 12H, H-1/2/3/4/5/6), 4.19 (d,  $J = 2.3$  Hz, 2H, H-7).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

58.33 (C-7), 61.67 (C-1), 69.01 + 70.29 + 70.32 + 70.57 + 72.41 (C-2-6), 74.52 (C-9), 79.52 (C-8).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3447, 3249, 2921, 2856, 1664, 1456, 1379, 1350, 1254, 1093.

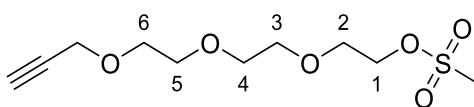
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 189.3$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$  (188.10)

ber.: 189.1113 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 189.1122 [M+H]<sup>+</sup>.



**2-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)ethylmethanesulfonat****19**

Triethylamin (1.1 mL, 8 mmol) wurde zu einer Lösung von 2-(2-(2-(prop-2-in-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol **18** (941 mg, 5.00 mmol) in DCM (20 mL) gegeben und mit einer Lösung von Methansulfonylchlorid (430  $\mu$ L, 5.50 mmol) in DCM (3.0 mL) portionsweise über einen Zeitraum von 20 min. unter Eisbadkühlung versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und durch Zugabe von Wasser (30 mL) beendet. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert (2 x 15 mL), die vereinigten organischen Phasen mit Natriumchlorid-Lösung (25 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Titelverbindung als gelbes, viskoses Öl erhalten.

**Ausbeute:** 1.21 g (4.81 mmol, 98%).

**DC:**  $R_f = 0.46$  (DCM:MeOH 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

2.44 (t,  $J = 2.2$  Hz, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.09 (s, 3H,  $\text{SCH}_3$ ), 3.65-3.71 (m, 8H, H-3/4/5/6), 3.77 (t,  $J = 4.4$  Hz, 2H, H-2), 4.19 (d,  $J = 2.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.39 (d,  $J = 4.41$  Hz, 2H, H-1).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

37.72 ( $\text{SCH}_3$ ), 58.36 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 68.99 + 69.04 + 69.27 + 70.36 + 70.51 + 70.57 (C-1-6), 74.60 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 79.51 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ).

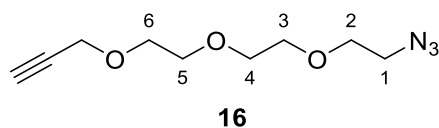
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3284, 2941, 2866, 2113, 1750, 1603, 1460, 1346, 1244, 1170.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 289.2$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{S}$  (266.08)

ber.: 267.0882 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>,

gef.: 267.0896 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>.

**3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-in**

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol **18** (1.75 g, 10.0 mmol) wurde in DMF (50 mL) gelöst und mit Natriumhydrid (60%, 480 mg, 12.0 mmol) unter Eisbadkühlung über einen Zeitraum von 15 min. versetzt. Nach 15 min. wurde Propargylbromid (80%; 2.97 mL, 20.0 mmol) über einen Zeitraum von 30 min. hinzugegeben und die Reaktion 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion durch Zugabe von Wasser (10 mL) beendet und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen (50 mL) und die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (25 x 4 cm, PE:EtOAc 7:3). Die Titelverbindung wurde als farbloses, klares Öl erhalten.

**Ausbeute:** 1.81 g (8.50 mmol, 66%).

**DC:**  $R_f = 0.28$  (PE:EtOAc 7:3).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

2.43 (t,  $J = 2.3$  Hz, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 3.38 (t,  $J = 3.3$  Hz, 1H, H-1), 3.56-3.76 (m, 10H, H-2/3/4/5/6), 4.19 (d,  $J = 2.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

50.57 (C-1), 58.31 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 69.01 (C-6), 69.96 (C-5), 70.40 + 70.57 + 70.59 (C-2/3/4), 74.46 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 79.54 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3139, 2868, 1736, 1460, 1352, 1303, 1228, 1087, 1048, 973.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 214.1$

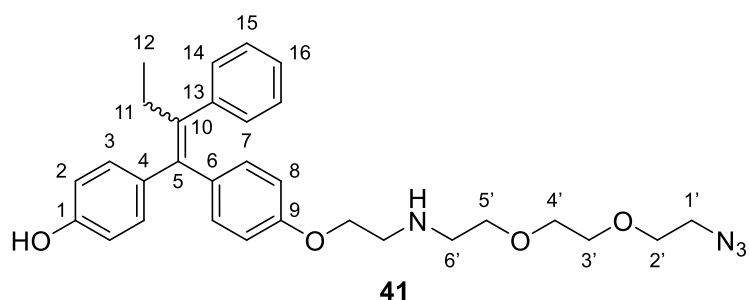
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$  (213.11)

ber.: 214.1184 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 214.1185 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.5.3 Synthese von Triphenylethylen-Triethylenglycol-Konjugaten

#### (*E/Z*)-*N*-(1-Azido-2-(2-ethoxyethoxy)ethyl)-norendoxifen



Zu einer Lösung von (*E/Z*)-Norendoxifen **28** (108 mg, 300  $\mu$ mol) in THF (1.0 mL) wurde DBU (98.0  $\mu$ L, 660  $\mu$ mol) und 1-Azido-2-(2-(2-iodoethoxy)ethoxy)ethan **4** (86.0 mg, 300  $\mu$ mol) gegeben und die Reaktionsmischung für 4 h bei 40 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (1.0 mL) beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen (5.0 mL) und die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (1.0 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (20 x 1.0 cm, DCM: MeOH 9:1). Die Titelverbindung wurde als farbloses, trübes Öl erhalten (*E/Z* = 3.0:1.0).

**Ausbeute:** 111 mg (210  $\mu$ mol, 72%).

**DC:**  $R_f$  = 0.44 (DCM:MeOH 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

2x 0.92 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 6H, H-12/12'), 2x 2.49 (q,  $J$  = 7.4 Hz, 4H, H-11/11'), 3.01 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H, H-6'), 3.07 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H, H-6<sup>i</sup>), 3.12 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2H, H-1'), 3.21 (t,  $J$  = 4.80 Hz, 2H, H-1'<sup>i</sup>), 3.33 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.37 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}^i$ ), 3.61-3.76 (m, 16H, H-2'-5'/2'<sup>i</sup>-5'<sup>i</sup>), 4.03 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 4.20 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2^i$ ), 6.45 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 6.50 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-2), 6.68 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 6.75 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-8), 6.79 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-7), 6.84 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-7'), 7.04 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-3), 7.08-7.20 (m, 12H, 3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

13.60 (br) (C-12/12'), 29.04 (br) (C-11/11'), 48.52 (C-1'), 48.62 (C-1'<sup>i</sup>), 48.93 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 49.00 ( $\text{CH}_2\text{NH}^i$ ), 50.61 (br) ( $\text{OCH}_2/\text{OCH}_2^i$ ), 66.47 (br) + 69.91 (br) + 70.02 + 70.04 + 70.41

+ 70.44 + 70.54 + 70.57 (C-1'-5'/C-1'-5'<sup>i</sup>), 113.23 (C-2), 113.99 (C-7<sup>i</sup>), 114.45 (C-2<sup>i</sup>), 115.15 (C-7), 123.86 + 125.84 + 127.77 + 127.82 + 129.70 (br) + 130.55 + 130.69 (C-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 131.91 (C-8), 132.06 (C-8<sup>i</sup>), 135.53 + 136.15 + 136.22 + 137.89 + 140.83 (br) + 142.68 (br) (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>), 149.56 (br) (C-13/13<sup>i</sup>), 154.23 + 155.20 + 156.45 + 157.31 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3053, 2968, 2874, 2101, 1664, 1605, 1507, 1440, 1368, 1236.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  = 221, 262, 273.

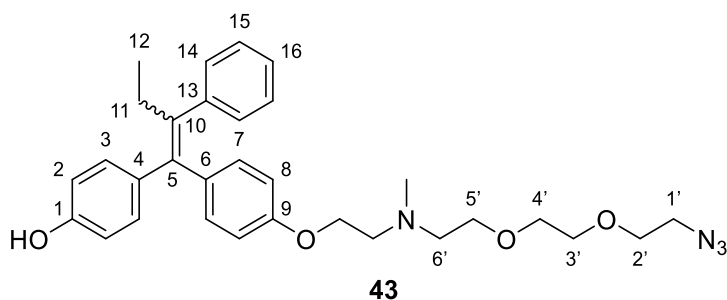
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 517.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (516.27)

ber.: 517.2809 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 517.2793 [M+H]<sup>+</sup>.

### (*E/Z*)-*N*-methyl-*N'*-(1-azido-2-(2-ethoxyethoxy)ethyl)-norendoxifen



Zu einer Lösung von (*E/Z*)-Endoxifen **32** (41.0 mg, 110  $\mu$ mol) in THF (400  $\mu$ L) wurde DBU (18.0  $\mu$ L, 120  $\mu$ mol) und 1-Azido-2-(2-(2-iodoethoxy)ethoxy)ethan **4** (31.0 mg, 110  $\mu$ mol) gegeben und die Reaktionsmischung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (500  $\mu$ L) beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen (5.0 mL) und die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (1.0 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (24 x 1.0 cm, DCM: MeOH 94:6). Die Titelverbindung wurde als farbloses, trübes Öl erhalten (*E/Z* = 1.0:1.0).

**Ausbeute:** 41.8 mg (79  $\mu$ mol, 71%).

**DC:**  $R_f$  = 0.10 (DCM:MeOH 94:6).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

2x 0.93 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H, H-12/12'), 2.41 (br s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.44-2.52 (m, 7H, 11/11<sup>i</sup>/NCH<sub>3</sub><sup>i</sup>), 2.72-2.78 (m, 2H, H-6'), 2.79-2.84 (m, 2H, H-6'<sup>i</sup>), 2.84-2.89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.93-2.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sup>i</sup>), 3.35 (t,  $J = 5.20$  Hz, 2H, H-1'<sup>i</sup>), 3.37 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, H-1'), 3.60-3.67 (m, 14H, H-2'-5'/2'<sup>i</sup>-4'<sup>i</sup>), 3.68-3.71 (m, 2H, 5'<sup>i</sup>-H), 3.96 (t,  $J = 5.60$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.20 (t,  $J = 5.60$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 6.45 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H, H-8), 6.47 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 6.71 (d,  $J = 8.80$  Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.73 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H, H-7), 6.80 (2x d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2/2<sup>i</sup>), 7.06-7.19 (m, 14H, 3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>-H).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

13.61 (C-12), 13.62 (C-12'), 28.98 (C-11), 29.03 (C-11'), 42.90 (NCH<sub>3</sub>), 43.03 (NCH<sub>3</sub><sup>i</sup>), 50.65 (C-1'), 50.66 (C-1'), 56.49 (CH<sub>2</sub>NH), 56.56 (CH<sub>2</sub>NH'), 56.93 (C-6), 56.99 (C-6'), 64.94 (OCH<sub>2</sub>), 65.34 (OCH<sub>2</sub>'), 68.80 + 68.89 + 69.99 + 70.01 + 70.43 + 70.46 + 70.59 + 70.63 + 70.54 + 70.57 (C-2'-5'/C-2'<sup>i</sup>-5'<sup>i</sup>), 113.18 (C-7), 113.94 (C-7<sup>i</sup>), 114.41 (C-2), 115.13 (C-2<sup>i</sup>), 125.83 (br) + 127.78 + 127.82 + 129.70 (br) + 130.53 + 130.69 (C-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 131.89 (C-8), 132.08 (C-8<sup>i</sup>), 135.54 + 135.85 + 135.97 + 136.45 + 137.83 + 137.85 + 140.85 (br) (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>), 142.66 (br) (C-13/13<sup>i</sup>), 153.85 + 154.81 + 156.45 + 157.28 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>).

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3051, 2970, 2870, 2107, 1666, 1605, 1507, 1440, 1372, 1236.

UV/VIS (MeOH):  $\lambda_{\max}$  = 221, 262, 273.

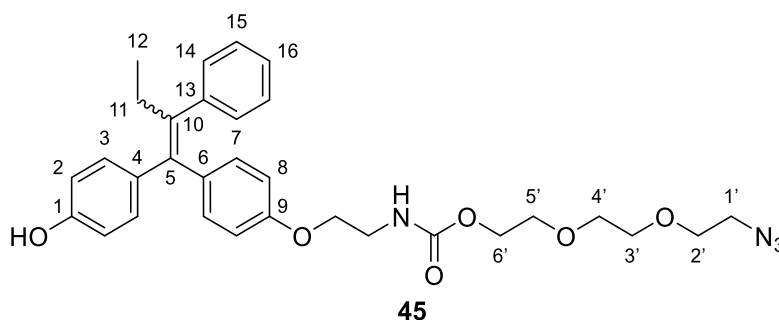
MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 531.3 [M+H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (530.28)

ber.: 531.2965 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 531.2951 [M+H]<sup>+</sup>.

### (*E/Z*)-*N*-Carbamoyl-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)-norendoxifen



Zu einer Lösung von (*E/Z*)-Norendoxifen **28** (539 mg, 1.50 mmol) in THF (5.0 mL) wurde Pyridin (480  $\mu$ L, 6.00 nmol) und 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-1*H*-imidazol-1-carboxylat **8** (404 mg, 1.50 nmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 6 h bei

Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (1 M, 2.5 mL) beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen (20 mL) und die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (25 x 2.5 cm, *n*-Hexan:EtOAc 1:1). Die Titelverbindung wurde als gelbes, klares Öl erhalten (E/Z = 2.6:1.0).

**Ausbeute:** 602 mg (1.07 mmol, 71%).

**DC:**  $R_f = 0.28$  (*n*-Hexan:EtOAc 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ),  $\delta$  in ppm):

2x 0.90 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 2x 2.49 (q,  $J = 7.4$  Hz, 4H, H-11/11<sup>i</sup>), 3.32-3.40 (m, 2H, H-1'/1'<sup>i</sup>), 3.40-3.47 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}(\text{C}=\text{O})$ ), 3.51-3.57 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}(\text{C}=\text{O})^i$ ), 3.58-3.69 (m, 16H, H-2'-5'/2'<sup>i</sup>-5'<sup>i</sup>), 3.92 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 4.06-4.19 (m, 2H,  $\text{OCH}_2^i/\text{H}-6'/6'^i$ ), 6.42 (br s, 1H, NH), 6.48 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.49 (br s, NH<sup>i</sup>), 6.59 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-7), 6.70 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 6.79 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-8), 6.84 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-2), 6.95 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>) 7.08-7.20 (m, 14H, H-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ),  $\delta$  in ppm):

13.57 (br) (C-12/12<sup>i</sup>), 28.99 (br) (C-11/11<sup>i</sup>), 40.46 ( $\text{CH}_2\text{NH}(\text{C}=\text{O})$ ), 40.55 ( $\text{CH}_2\text{NH}(\text{C}=\text{O})^i$ ), 50.59 (br) (C-1'/1'<sup>i</sup>), 64.07 (C-6'), 64.12 (C-6'<sup>i</sup>), 66.46 ( $\text{O}(\text{CH}_2)$ ), 66.72 ( $\text{O}(\text{CH}_2)^i$ ), 69.57 (br) + 70.04 (br) + 70.53 (br) + 70.68 (br) (C-2'-5'/C-2'<sup>i</sup>-5'<sup>i</sup>), 113.13 (C-7), 113.90 (C-7<sup>i</sup>), 114.28 (C-2<sup>i</sup>), 114.97 (C-2), 125.86 + 125.89 + 127.78 + 127.81 + 129.65 (br) + 130.62 + 130.67 (C-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 131.97 (C-8), 132.01 (C-8<sup>i</sup>), 135.42 + 135.82 + 136.34 + 136.77 + 137.55 + 137.69 + 140.97 + 141.07 (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>), 148.09 (br) (C-13/13<sup>i</sup>), 153.92 + 154.81 + 156.20 + 156.47 + 156.55 + 157.05 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>/ $\text{CH}_2\text{NH}(\text{C}=\text{O})/\text{CH}_2\text{NH}(\text{C}=\text{O})^i$ ).

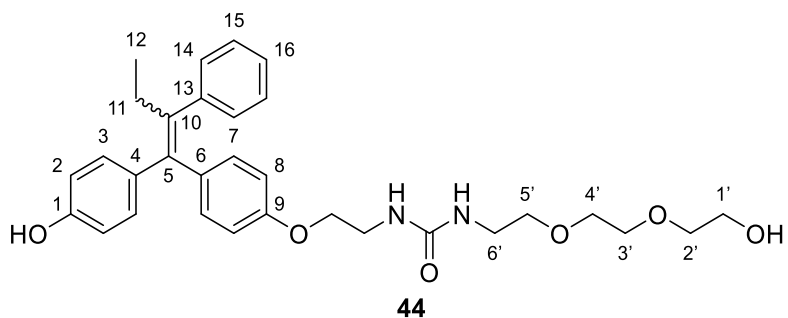
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3329, 2968, 2878, 2101, 1772, 1701, 1607, 1507, 1460, 1264.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 221, 262, 273$ .

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 561.4$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_6$  (560.26)

ber.: 561.2707 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 561.2698 [M+H]<sup>+</sup>.**(E/Z)-1-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl)-3-(norendoxifen)urea**

Zu einer Lösung von 1,1'-Carbonyldiimidazol (32.0 mg, 200  $\mu$ mol) in DCM (500  $\mu$ L) wurde 2,2,3,3-tetramethyl-4,7,10-trioxa-3-siladodecan-12-amin **10** (53.0 mg, 200  $\mu$ mol) gegeben und die Reaktion für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Eine Lösung von (E/Z)-O-TBDMS-Norendoxifen **40** (43.3 mg, 0.057 mmol) in DCM (200  $\mu$ L) wurde portionsweise über einen Zeitraum von 10 min. hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 16 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (1 M, 500  $\mu$ L) beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen (1.0 mL), die Phasen getrennt und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand (68.7 mg) ohne zusätzliche Aufreinigung weiter umgesetzt. Der Rückstand wurde in Tetrahydrofuran (1.0 mL) gelöst, mit Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (1 M, 360  $\mu$ L, 0.360 mmol) tropfenweise über einen Zeitraum von 5 min. versetzt und die Reaktionsmischung für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Natriumchlorid-Lösung (500  $\mu$ L) beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen (1.0 mL), die Phasen getrennt und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (21 x 1.5 cm, DCM:MeOH 9:1). Die Titelverbindung wurde als farbloses, klares Öl erhalten (E/Z = 1.8:1.0).

**Ausbeute:** 16.0 mg (30  $\mu$ mol, 15%).

**DC:**  $R_f = 0.31$  (DCM:MeOH 9:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

2x 0.92 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 2.43-2.53 (m, 4H, H-11/11<sup>i</sup>), 3.29-3.38 (m, 4H, 6/6<sup>i</sup>), 3.44-3.61 (m, 24H) + 3.66-3.70 (m, 2H) + 3.71-3.74 (m, 2H) ( $\underline{\text{CH}}_2\text{NH}(\text{C}=\text{O})/\underline{\text{CH}}_2\text{NH}(\text{C}=\text{O})^i/\text{H}-1'-5'/1'^i-5'^i$ ), 3.82 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.99 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 5.49-5.54 (m, 2H, ArO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH(C=O)/(CH<sub>2</sub>)NH(C=O)), 5.57 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H, (C=O)NH<sup>i</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O), 5.82 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H, ArO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH(C=O)<sup>i</sup>), 6.47 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.48 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7), 6.68 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 6.75 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8), 6.81 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2), 6.83 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 7.05 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3), 7.08-7.20 (m, 12H, H-3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

13.60 (br) (C-12/12<sup>i</sup>), 28.98 (C-11), 29.01 (C-11<sup>i</sup>), 40.06 (C-6'), 40.09 (C-6'<sup>i</sup>), 67.3 (OCH<sub>2</sub>), 67.6 (OCH<sub>2</sub><sup>i</sup>), 39.75 + 39.84 + 61.53 + 61.56 + 69.9 + 70.0 + 70.1 + 70.2 + 70.4 + 70.5 + 72.3 + 72.4 ( $\underline{\text{CH}}_2\text{NH}(\text{C}=\text{O})/\underline{\text{CH}}_2\text{NH}(\text{C}=\text{O})^i/\text{C}-1'-5'/\text{C}-1'^i-5'^i$ ), 113.18 (C-7), 113.95 (C-7<sup>i</sup>), 114.39 (C-2<sup>i</sup>), 115.08 (C-2), 123.89 + 125.85 + 127.79 (br) + 129.67 + 129.68 + 130.60 + 130.64 + 149.45 (br) (C-3/3<sup>i</sup>/13/13<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 131.9 (br) (C-8/8<sup>i</sup>), 136.31 + 136.32 + 137.80 + 137.83 + 140.77 + 140.93 + 142.58 + 142.66 (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>), 154.3 + 155.2 + 156.3 + 157.2 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>), 158.7 (NH(C=O)NH), 158.8 (NH(C=O)NH<sup>i</sup>).

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3351, 2970, 2872, 1646, 1566, 1507, 1460, 1440, 1268, 1230.

UV/VIS (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 211, 245, 285$ .

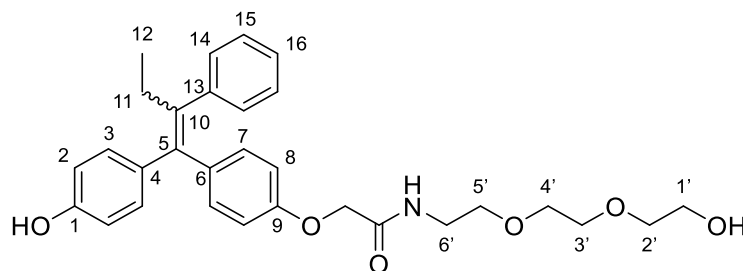
MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 535.3$  [M+H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (534.27)

ber.: 535.2802 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 535.2759 [M+H]<sup>+</sup>.

**(E/Z)-N-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl)-2-(4-(1-(4-hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenoxy)acetamid**



**47**

Zu einer Lösung von 4,4'-(2-Phenylbut-1-ene-1,1-diyl)diphenol **49** (95.0 mg, 300  $\mu\text{mol}$ ) in Tetrahydrofuran (3.0 mL) wurde Natriumhydrid (60% in Mineralöl, 13 mg, 330  $\mu\text{mol}$ )



unter Eisbadkühlung gegeben und die Reaktion für 30 min. unter Eisbadkühlung gerührt. Eine Lösung von 2-Brom-*N*-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl)acetamid **15** (81.0 mg, 300  $\mu$ mol) in THF (1.0 mL) wurde tropfenweise über einen Zeitraum von 15 min. hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (1.0 mL) beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen (5.0 mL), die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (5.0 mL) gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (25 x 2.0 cm, DCM:MeOH 93:7). Die Titelverbindung wurde als farbloses, klares Öl erhalten (E/Z = 1.2:1.0).

**Ausbeute:** 49.4 mg (97  $\mu$ mol, 32%).

**DC:**  $R_f$  = 0.17 (DCM:MeOH 93:7).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

2x 0.92 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 2x 2.49 (q,  $J$  = 7.4 Hz, 4H, H-11/11<sup>i</sup>), 2.62 (br s, 1H, OH), 3.47-3.64 (m, 20H) + 3.67-3.70 (m, 2H) + 3.71-3.74 (m, 2H) (H-1'-6'/1<sup>i</sup>-6<sup>i</sup>), 4.35 (s, 2H, ( $\text{CH}_2$ )(C=O)NH), 4.51 (s, 2H, ( $\text{CH}_2$ )(C=O)NH<sup>i</sup>), 6.48 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.54 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H-7), 6.68 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 6.79 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 6.80 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H-8), 6.88 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-2), 7.04-7.22 (m, 16H, NH/NH<sup>i</sup>/3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

13.55 (br) (C-12/12<sup>i</sup>), 28.92 (C-11), 28.99 (C-11<sup>i</sup>), 38.74 + 38.82 + 61.64 + 61.66 + 69.63 + 69.69 + 70.22 (br) + 70.28 (br) + 72.41 + 72.43 (C-1'-6'/C-1<sup>i</sup>-6<sup>i</sup>), 67.04 (( $\text{CH}_2$ )(C=O)NH), 67.30 (( $\text{CH}_2$ )(C=O)NH<sup>i</sup>), 113.49 (C-7), 114.27 (C-8), 114.37 (C-7<sup>i</sup>), 115.06 (C-8<sup>i</sup>), 125.91 + 125.94 + 127.79 + 127.81 + 129.60 + 129.62 + 130.58 + 130.76 (C-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 131.91 (C-2), 132.08 (C-2<sup>i</sup>), 135.01 + 135.38 + 137.41 + 137.46 + 137.50 + 137.83 + 141.14 + 141.46 + 142.36 + 142.43 (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>//6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>/13/13<sup>i</sup>), 154.17 + 154.90 + 155.06 + 155.78 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>), 168.85 (( $\text{CH}_2$ )(C=O)NH), 168.89 (( $\text{CH}_2$ )(C=O)NH<sup>i</sup>).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3290, 3058, 2966, 2874, 1660, 1607, 1546, 1505, 1440, 1370.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  = 213, 244, 285.

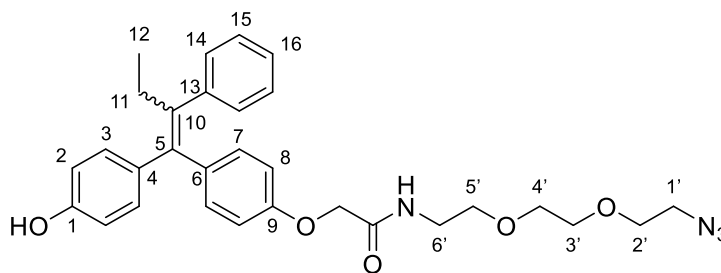
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 506.3$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>6</sub> (505.25)

ber.: 506.2696 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 506.2654 [M+H]<sup>+</sup>.

**(E/Z)-N-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)-2-(4-(1-(4-hydroxyphenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenoxy)acetamid**



**46**

Zu einer Lösung von 4,4'-(2-Phenylbut-1-ene-1,1-diyl)diphenol **49** (95.0 mg, 300  $\mu$ mol) in Tetrahydrofuran (3.0 mL) wurde Natriumhydrid (60% in Mineralöl, 13 mg, 330  $\mu$ mol) unter Eisbadkühlung gegeben und die Reaktion für 30 min. unter Eisbadkühlung gerührt. Eine Lösung von 2-Brom-N-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl)acetamid **14** (89.0 mg, 300  $\mu$ mol) in THF (1.0 mL) wurde tropfenweise über einen Zeitraum von 15 min. hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (1.0 mL) beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen (5.0 mL), die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (5.0 mL) gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (25 x 2.0 cm, DCM:MeOH 95:5). Die Titelverbindung wurde als farbloses, klares Öl erhalten (E/Z = 1.6:1.0).

**Ausbeute:** 67.9 mg (134  $\mu$ mol, 45%).

**DC:**  $R_f = 0.17$  (DCM:MeOH 95:5).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

2x 0.93 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 2x 2.49 (q,  $J = 7.4$  Hz, 4H, H-11/11<sup>i</sup>), 3.34 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H) + 3.38 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H) + 3.50-3.69 (m, 20H) (H-1'-6'/1'<sup>i</sup>-6'<sup>i</sup>), 4.37 (s, 2H, (CH<sub>2</sub>)(C=O)NH), 4.53 (s, 2H, (CH<sub>2</sub>)(C=O)NH<sup>i</sup>), 6.48 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.56 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7), 6.72 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 6.80 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 6.82 (d,  $J =$

8.8 Hz, 2H, H-8), 6.88 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2), 7.04-7.22 (m, 14H, NH/NH<sup>i</sup>/3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

13.33 (br) (C-12/12<sup>i</sup>), 28.72 (C-11), 28.79 (C-11<sup>i</sup>), 38.45 (br) + 50.36 + 50.38 + 69.52 (br) + 69.58 (br) + 69.81 + 69.82 + 70.10 + 70.12 + 70.30 + 70.33 (C-1'-6'/C-1'<sup>i</sup>-6'<sup>i</sup>), 66.94 ((CH<sub>2</sub>)(C=O)NH), 67.18 ((CH<sub>2</sub>)(C=O)NH<sup>i</sup>), 113.30 (C-7), 114.06 (br) (C-8/8<sup>i</sup>), 114.76 (C-7<sup>i</sup>), 125.76 + 125.78 + 127.60 + 127.61 + 129.39 (br) + 130.46 + 130.54 (C-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 131.78 (C-2), 131.87 (C-2<sup>i</sup>), 135.01 + 135.38 + 137.41 + 137.46 + 137.50 + 137.83 + 141.14 + 141.46 + 142.36 + 142.43 (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>//6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>/13/13<sup>i</sup>), 154.17 + 154.90 + 155.06 + 155.78 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>), 168.85 ((CH<sub>2</sub>)(C=O)NH), 168.89 ((CH<sub>2</sub>)(C=O)NH<sup>i</sup>).

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3290, 3058, 2966, 2874, 2105, 1660, 1607, 1546, 1505, 1440.

UV/VIS (MeOH):  $\lambda_{\max} = 203, 243, 285$ .

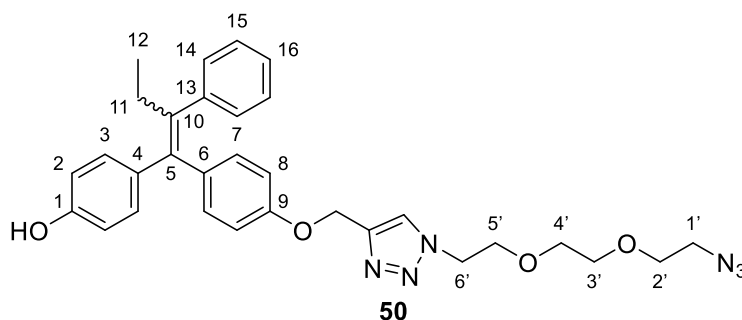
MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 530.3$  [M+H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (530.25)

ber.: 531.2601 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 531.2589 [M+H]<sup>+</sup>.

**(E/Z)-4-(1-(4-((1-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-2-phenylbut-1-en-1-yl)phenol-norendoxifen**



Zu einer Lösung von 4-(2-Phenyl-1-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)but-1-en-1-yl)phenol **31** (213 mg, 600  $\mu$ mol) in einem Gemisch bestehend aus *tert*-Butanol/Tetrahydrofuran/Wasser (6.0 mL, 1:1:1) gelöst und mit Natriumascorbat (12.0 mg, 60  $\mu$ mol) und Kupfersulfat-Pentahydrat (15.0 mg, 60  $\mu$ mol) versetzt. 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol **2** (105 mg, 600  $\mu$ mol) wurde portionsweise über einen Zeitraum von 5 min. hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit Essigsäureethylester (3 x 10 mL) extrahiert, die

organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen (10 mL) und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (24 x 2.5 cm, DCM:MeOH 95:5). Die Titelverbindung wurde als gelbe, klares Öl erhalten (E/Z = 1.0:1.0).

**Ausbeute:** 125 mg (240  $\mu$ mol, 39%).

**DC:**  $R_f = 0.10$  (DCM:MeOH 95:5).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

2x 0.92 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H, H-12/12<sup>i</sup>), 2.43-2.51 (m, 2H, H-11/11<sup>i</sup>), 3.51-3.60 (m, 12H, H-2'/2'<sup>i</sup>/4/4'<sup>i</sup>/1'/1'<sup>i</sup>), 3.67-3.71 (m, 2H, H-3'), 3.71-3.74 (m, 2H, H-3'<sup>i</sup>), 3.84 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, H-5'), 3.87 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, H-5'<sup>i</sup>), 4.49 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, H-6'), 4.53 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, H-6'<sup>i</sup>), 5.04 (s, 2H, ( $\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}$ )), 5.20 (s, 2H, ( $\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}^i$ )), 6.49 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7), 6.59 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-7<sup>i</sup>), 6.69 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8<sup>i</sup>), 6.77 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-8), 6.83 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-2), 6.94 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2<sup>i</sup>), 7.06 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3), 7.04-7.18 (m, 12H, H-3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 7.74 ( $\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}$ ), 7.83 ( $\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}^i$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

13.57 (C-12), 13.59 (C-12<sup>i</sup>), 28.95 (C-11), 28.98 (C-11<sup>i</sup>), 50.27 (C-1'), 50.32 (C-1'<sup>i</sup>), 61.60 (C-2'), 61.63 (C-2'<sup>i</sup>), 61.85 (br) ( $\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}/\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}^i$ ), 69.23 (C-6'), 69.26 (C-6'<sup>i</sup>), 70.11 + 70.13 + 70.46 + 70.48 + 72.31 + 72.34 (C-3'/3'<sup>i</sup>/4'/4'<sup>i</sup>/5'/5'<sup>i</sup>), 113.50 (C-7<sup>i</sup>), 114.28 (C-2<sup>i</sup>), 114.36 (C-7), 115.07 (C-2), 124.10 ( $\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}$ ), 124.20 ( $\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}^i$ ), 125.84 + 125.87 + 127.76 + 127.79 + 129.65 (br) + 130.58 + 130.62 (C-3/3<sup>i</sup>/14/14<sup>i</sup>/15/15<sup>i</sup>/16/16<sup>i</sup>), 131.92 (C-8), 131.98 (C-8<sup>i</sup>), 135.30 + 135.65 + 136.51 + 136.93 + 137.69 + 137.71 + 140.94 + 141.09 + 143.97 + 143.97 (C-4/4<sup>i</sup>/5/5<sup>i</sup>/6/6<sup>i</sup>/10/10<sup>i</sup>/13/13<sup>i</sup>), 142.54 (br) ( $\text{OCH}_2\text{C}=\text{CH} / \text{OCH}_2\text{C}=\text{CH}^i$ ), 154.03 + 154.94 + 155.98 + 156.80 (C-1/1<sup>i</sup>/9/9<sup>i</sup>).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3184, 2966, 2872, 2246, 1603, 1505, 1462, 1436, 1372, 1221.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 214, 245, 285$ .

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 555.3$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>.

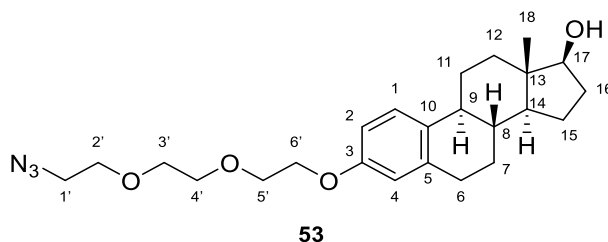
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_4$  (554.26)

ber.: 555.2696 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>,

gef.: 555.2645 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>.

### 7.5.4 Synthese von Estradiol-Triethylenglycol-Konjugaten

#### 3-O-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl)-17 $\beta$ -estradiol



Zu einer Lösung von 17 $\beta$ -Estradiol (136 mg, 500  $\mu$ mol) in Dimethylformamid (3.0 mL) wurde Kaliumcarbonat (207 mg, 1.50 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 15 min. bei Raumtemperatur gerührt. 1-Azido-2-(2-(2-iodethoxy)ethoxy)ethan **4** (428 mg, 1.50 mmol) wurde portionsweise über einen Zeitraum von 5 min. hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigsäureethylester (20 mL) aufgenommen, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (29 x 2.5 cm, DCM:MeOH 95:5). Die Titelverbindung wurde als farbloses, klares Öl erhalten.

**Ausbeute:** 144 mg (335  $\mu$ mol, 66%).

**DC:**  $R_f = 0.39$  (DCM:MeOH 95:5).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

0.78 (s, 3H, H-18), 1.15-1.55 (m, 7H) + 1.66-1.75 (m, 1H) + 1.85-1.91 (m, 1H) + 1.92-1.98 (m, 1H) + 2.08-2.23 (m, 2H) + 2.28-2.35 (m, 1H) + 2.78-2.91 (m, 2H) (H-6/7/8/9/11/12/14/15/16/OH), 3.40 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H) + 3.67-3.79 (m, 7H) (H-1'-4'/H-17), 3.86 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H, H-5'), 4.12 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H, H-6'), 6.65 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H-2), 6.72 (dd,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H-4), 7.20 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-1).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

11.03 (C-18), 23.10 + 26.27 + 27.20 + 29.75 + 30.56 + 36.66 + 38.79 + 43.22 + 43.91 + 49.98 (C-6/7/8/9/11/12/13/14/15/16), 67.33 (C-6'), 69.87 (C-5'), 50.65 + 70.06 + 70.72 + 70.83 (C-1'-4'), 81.8 (C-17), 112.08 + 114.58 + 126.27 + 132.81 + 137.93 + 156.57 (C-1/2/3/4/5/10).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3441, 2919, 2866, 2354, 2101, 1607, 1497, 1448, 1346, 1283.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  = 227, 277.

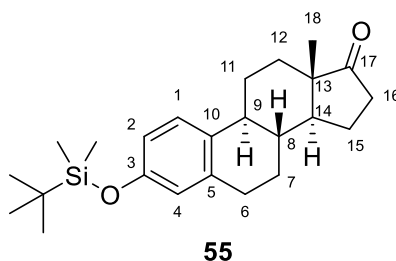
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 452.5 [M+Na]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (429.26)

ber.: 430.2700 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 430.2679 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3-O-TBDMS-17 $\beta$ -Estradiol



Zu einer Lösung von Estron **54** (2.16 g, 8.00 mmol) in Dimethylformamid (80 mL) wurde 1*H*-Imidazol (1.08 g, 16.0 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (1.33 g, 8.80 mmol) portionsweise über einen Zeitraum von 15 min. versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 6 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion durch Zugabe von Wasser (10 mL) beendet. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester (60 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (24 x 4.5 cm, PE:EtOAc 3:1). Die Titelverbindung wurde als weißes Pulver erhalten.

**Ausbeute:** 2.80 g (7.29 mmol, 91%).

**DC:**  $R_f$  = 0.61 (PE:EtOAc 3:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

0.20 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.92 (s, 3H, H-18), 0.99 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.37-1.68 (m, 7H) + 1.90-2.10 (m, 3H) + 2.11-2.20 (m, 1H) + 2.21-2.29 (m, 1H) + 2.35-2.44 (m, 1H) + 2.47-2.56 (m, 1H) + 2.80-2.92 (2H) (H-6/7/8/9/11/12/14/15/16), 6.58 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H, H-2), 6.64 (dd,  $J$  = 8.5 Hz,  $J$  = 2.5 Hz, 1H, H-4), 7.20 (d,  $J$  = 8.20 Hz, 1H, H-1).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

-4.41 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 13.84 (C-18), 13.84 + 21.56 + 26.53 + 29.45 + 31.55 + 35.87 + 38.26 + 43.98 + 48.00 + 50.54 (C-6/7/8/9/11/12/13/14/15/16), 25.67 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.81 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 117.29 + 119.97 + 126.1 + 132.40 + 137.58 + 153.44 (C-1/2/3/4/5/10), 221.08 (C-17).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2947, 2927, 2880, 2856, 1729, 1603, 1491, 1468, 1360, 1246.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  = 276.

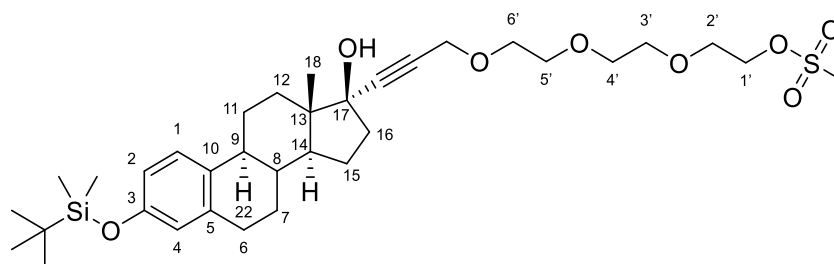
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 385.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>Si (384.24)

ber.: 385.2557 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 385.2570 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3-O-TBDMS-(2-(2-(2-Mesyloxy)ethoxy)ethyl)-17 $\beta$ -estradiol



56

Zu einer auf -78 °C gekühlten Lösung von 2-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)ethylmethanesulfonat **19** (266 mg, 1.00 mmol) in Tetrahydrofuran (5.0 mL) wurde *n*-Butyllithium (2.5 M in *n*-Hexan, 800  $\mu$ L, 2.00 mmol) tropfenweise über einen Zeitraum von 10 min. hinzugegeben und die Reaktionsmischung 20 min. bei -78 °C gerührt. Eine Lösung 3-O-TBDMS-17 $\beta$ -estradiol **55** (384 mg, 1.00 mmol) in Tetrahydrofuran (3.0 mL) wurde tropfenweise über einen Zeitraum von 15 min. der Reaktionsmischung hinzugegeben und diese für 30 min. bei -78 °C gerührt. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur gebracht und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (2.0 mL) beendet und die Reaktionsmischung mit Essigsäureethylester (3 x 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (28 x 4 cm, PE:EtOAc 1:2). Die Titelverbindung wurde als klares, leicht gelbliches Öl erhalten.

**Ausbeute:** 224 mg (0.344 mmol, 34%).

**DC:**  $R_f = 0.22$  (PE:EtOAc 1:2).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

0.19 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.98 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.29-1.56 (m, 4H) + 1.59-1.90 (m, 5H) + 1.95-2.07 (m, 1H) + 2.10-2.39 (m, 4H) + 2.74-2.86 (m, 2H) + (H-6/7/8/9/11/12/14/15/16/OH), 3.09 (s, 3H, S( $\text{CH}_3$ )), 3.62-3.72 (m, 8H, H-3'/4'/5'/6'), 3.72-3.79 (m, 2H, H-2'), 4.28 (s, 2H,  $\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{O}$ ), 4.34-4.43 (m, 2H, H-1'), 6.58 (d,  $J = 2.17$  Hz, 1H, H-2), 6.64 (dd,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 2.17$  Hz, 1H, H-4), 7.20 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-1).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

-4.47 ( $\text{Si}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_2$ ), 12.71 (C-18), 18.07 + 22.76 + 27.20 + 29.53 + 32.87 + 37.67 + 39.24 + 43.54 + 47.19 + 49.51 (C-6/7/8/9/11/12/13/14/15/16), 25.62 ( $\text{SiC}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_3$ ), 26.23 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 38.90 (SCH<sub>3</sub>), 58.71 (C=C $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$ ), 68.86 + 68.90 + 69.25 + 70.31 + 70.37 + 70.49 (C-1'-6'), 79.77 (C-17), 81.49 (C $\equiv\text{C}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$ ), 90.09 (C $\equiv\text{C}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$ ), 117.07 + 119.84 + 126.04 + 132.80 + 137.72 + 153.20 (C-1/2/3/4/5/10).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3521, 2929, 2858, 1607, 1572, 1495, 1348, 1287, 1248, 1170.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 219, 276$ .

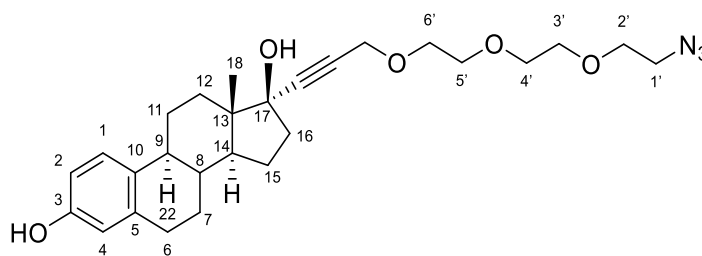
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 651.4$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_8\text{SSi}$  (650.33)

ber.: 668.3647 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>,

gef.: 668.3624 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

### 17 $\beta$ -(3-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-in)-estradiol



53

Zu einer Lösung von 3-*O*-TBDMS-(2-(2-(2-Mesyloxy)ethoxy)ethyl)-17 $\beta$ -estradiol **56** (98.0 mg, 150  $\mu\text{mol}$ ) in Dimethylpropylenharnstoff (400  $\mu\text{L}$ ) wurde Natriumazid (49.0 mg, 750  $\mu\text{mol}$ ) hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 3 d bei 50 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (2.0 mL) beendet und die Reaktionsmischung mit wer das hier liest, kriegt eine Kiste Bier Essigsäureethylester



(3 x 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (24 x 1.5 cm, PE:EtOAc 1:2). Die Titelverbindung wurde als klares, farbloses Öl erhalten.

**Ausbeute:** 64.2 mg (0.134 mmol, 89%).

**DC:**  $R_f = 0.63$  (PE:EtOAc 1:2).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

0.87 (s, 3H, H-18), 1.27-1.49 (m, 4H) + 1.61-1.88 (m, 5H) + 1.97-2.05 (m, 1H) + 2.08-2.15 (m, 1H) + 2.26-2.34 (m, 2H) 2.74-2.84 (m, 2H) (H-6/7/8/9/11/12/14/15/16/OH), 3.37 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H, H-1'), 3.63-3.76 (m, 10H, H-2'/3'/4'/5'/6'), 4.30 (s, 2H,  $\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{O}$ ), 6.57 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H-2), 6.64 (dd,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1H, H-4), 7.13 (d,  $J = 8.20$  Hz, 1H, H-1).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

12.73 (C-18), 22.76 + 26.30 + 27.14 + 29.58 + 32.84 + 38.84 + 39.29 + 43.39 + 47.19 + 49.46 (C-6/7/8/9/11/12/13/14/15/16), 50.54 (C-1'), 58.72 ( $\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{O}$ ), 69.00 + 69.96 + 70.42 + 70.54 + 70.57 (C-2'-6'), 79.92 (C-17), 81.61 ( $\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{O}$ ), 90.03 ( $\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{O}$ ), 112.67 + 115.19 + 126.42 + 132.15 + 138.04 + 153.59 (C-1/2/3/4/5/10).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3378, 2927, 2870, 2354, 2101, 1738, 1607, 1585, 1499, 1446.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 219, 279, 286$ .

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 506.3$  [M+Na]<sup>+</sup>.

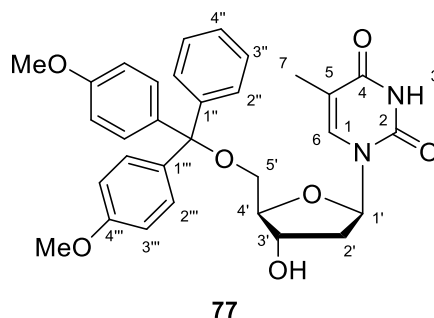
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_5$  (483.27)

ber.: 484.2805 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 484.2787 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.5.5 Synthese von Phosphoramidat-Modellschubstanzen

#### 5'-*O*-Dimethoxytritylthymidin



Zu einer Lösung von Thymidin **72** (4.94 g, 20.4 mmol) in Pyridin (100 mL) wurde *N,N*-Dimethylaminopyridin (120 mg, 1.02 mmol), Triethylamin (3.90 mL, 28.6 mmol) und 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (8.99 g, 26.5 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (200 mL) beendet und das Reaktionsgemisch wurde mit Diethylether (3 x 100 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumhydrogenkarbonatlösung (100 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (25 x 5.5 cm, PE:EtOAc 1:1 + 1% Pyridin). Die gesammelten Fraktionen wurden auf ca. 300 mL eingengt und die Lösung des gereinigten Produktes zunächst mit einer Kupfersulfatlösung (10%, 50 mL), dann mit einer EDTA-Lösung (10%, 50 mL) und zuletzt mit Wasser (50 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mehrmals mit Toluol coevaporiert, bis das Produkt als schneeweißer Schaum erhalten wurde.

**Ausbeute:** 9.20 g (16.9 mmol, 83%).

**DC:**  $R_f = 0.1$  (PE:EtOAc 1:1 + 0.5% Pyridin).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

8.46 (s, 1H, NH), 7.50 (d,  $J = 1.10$  Hz, 1H, H-6), 7.25-7.16 (m, 9H, H-2''-H-4'' + H-2'''), 6.76 (d,  $J = 8.80$  Hz, 4H, H-3'''), 6.34 (dd,  $J = 7.58$ ,  $J = 6.1$  Hz, 1H, H-1'), 4.53-4.47 (m, 1H, H-3'), 3.98 (dd,  $J = 5.9$  Hz,  $J = 2.9$  Hz, 1H, H-4'), 3.72 (s, 6H, OMe), 3.41 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 2.9$  Hz, 1H, H-5'b), 3.77 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 2.9$  Hz, 1H, H-5'a), 2.34 (ddd,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 6.1$  Hz,  $J = 3.0$  Hz, 1H, H-2'b), 2.02 (ddd,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 5.9$  Hz, 1H, H-2'a), 1.41 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H-7).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

163.54 (C-4), 158.73 + 158.71 (4'''), 150.26 (C-2), 135.61 (C-6), 144.27 + 135.61 + 135.34 + 135.30 + 130.06 + 128.21 (C-1''-4'' + 1'''-2'''), 113.28 (3'''), 111.23 (C-5), 86.96 (C-Trityl), 86.07 (C-4'), 84.66 (C-1'), 72.51 (C-3'), 63.50 (C-5'), 55.25 (OMe), 40.93 (C-2'), 11.82 (C-7).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 118\text{ }^\circ\text{C}$ .

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3512, 3155, 3008, 2833, 2364, 2019, 1670, 1506, 1249, 1174, 825.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 232, 269$ .

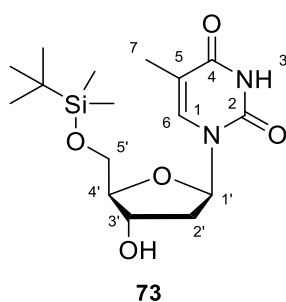
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 545.4$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_5$  (544.22)

ber.: 545.2282 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 545.2263 [M+H]<sup>+</sup>.

### 5'-*O-tert*-Butyldimethylsilylthymidin



Zu einer Lösung von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (4.97 g, 33.0 mmol) und Imidazol (4.08 g, 60.0 mmol) in Dimethylformamid (54 mL) wurde unter Eisbadkühlung Thymidin **72** (7.27 g, 30.0 mmol) gegeben und die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50 mL) beendet und das Reaktionsgemisch mit Essigsäureethylester (3 x 100 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (22 x 3.5 cm, DCM:MeOH 95:5). Das Produkt als weißer Schaum erhalten wurde.

**Ausbeute:** 9.73 g (27.3 mmol, 91%).

**DC:**  $R_f = 0.3$  (DCM:MeOH 95:5).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

8.59 (s, 1H, NH), 7.52 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H-6), 6.37 (dd,  $J = 5.7$  Hz,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-1'), 4.45-4.50 (m, 1H, H-3'), 4.04 (dd,  $J = 5.0$  Hz,  $J = 2.57$  Hz, 1H, H-4'), 3.88 (dd,  $J = 11.2$  Hz,  $J = 2.57$  Hz, 1H, H-5'b), 3.77 (dd,  $J = 11.2$  Hz,  $J = 2.57$  Hz, 1H, H-5'a), 2.37 (ddd,  $J = 13.4$  Hz,  $J = 5.7$  Hz,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H-2'b), 2.02 (ddd,  $J = 13.4$  Hz,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 5.9$  Hz, 1H, H-2'a), 1.92 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H-7), 0.93 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm):

163.59 (C-4), 150.25 (C-2), 135.41 (C-6), 110.92 (C-5), 87.08 (C-4'), 84.91 (C-1'), 72.61 (C-3'), 63.55 (C-5'), 41.11 (C-2'), 25.90 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.34 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 12.52 (C-7), -5.38 (SiCH<sub>3</sub>), -5.48 (SiCH<sub>3</sub>).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 107$  °C.

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3542, 3161, 3029, 2950, 1672, 1469, 1257, 1116, 939, 829.

**UV/VIS (MeOH):**  $\lambda_{max} = 267$ .

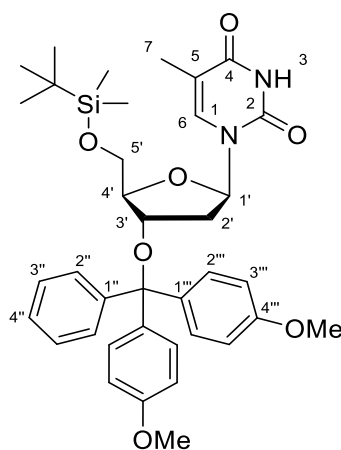
**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 357.4$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (356.17)

ber.: 357.1839 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 357.1828 [M+H]<sup>+</sup>.

### 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-*O*-Dimethoxytritylthymidin



74

Zu einer Lösung von 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilylthymidin **77** (3.56 g, 10.0 mmol) in Pyridin (40 mL) wurde *N,N*-Dimethylaminopyridin (240 mg, 2.00 mmol) und 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (4.07 g, 12.0 mmol) gegeben und die Reaktionslösung für 16 h bei 55 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (10 mL) beendet und das Reaktionsgemisch mit Essigsäureethylester (3 x 100 mL) extrahiert. Die organische

Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (20 x 5.5 cm, EtOAc:nHex 4:1). Das Produkt wurde als weiße-gelblicher Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 5.60 g (8.50 mmol, 85%).

**DC:**  $R_f = 0.39$  (EtOAc:nHex 4:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

8.49 (s, 1H, NH), 7.41 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H, H-6), 7.35-7.10 (m, 9H, H-2''-H-4'' + H-2'''), 6.84 (d,  $J = 8.80$  Hz, 4H, H-3'''), 6.37 (dd,  $J = 5.2$  Hz,  $J = 9.4$  Hz, 1H, H-1'), 4.29-4.23 (m, 1H, H-3'), 4.01-4.04 (m, H-4'), 3.80 (s, 6H, 2 x OMe) 3.68 (dd,  $J = 11.2$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, 1H, H-5'b), 3.29 (dd,  $J = 11.2$  Hz,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H-5'a), 1.92 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H, H-7), 1.72 (dd,  $J = 13.3$  Hz,  $J = 5.$  Hz, 1H, H-2'b), 1.58 (ddd,  $J = 13.57$  Hz,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 5.9$  Hz, 1H, H-2'a), 0.81 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.04 (s, 3H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.09 (s, 3H,  $\text{SiCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

164.39 (C-4), 158-73 + 158.69 (2 x 4'''), 150,09 (C-2), 139.46 (C-6), 145.10 + 136.53 + 136.26 + 135.50 + 130.16 + 128.29 (C-1''-4'' + 1'''-2'''), 113.29 (3'''), 110.81 (C-5), 87.27 (C-Triyl), 86.66 (C-4'), 84.95 (C-1'), 74.99 (C-3'), 63.08 (C-5'), 55.24 (OMe), 39.95 (C-2'), 25.78 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.21 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 12.39 (C-7), -5.41 ( $\text{SiCH}_3$ ), -5.74 ( $\text{SiCH}_3$ ).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 135$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3180, 2951, 2929, 2858, 2837, 1685, 1607, 1507, 1462, 1246.

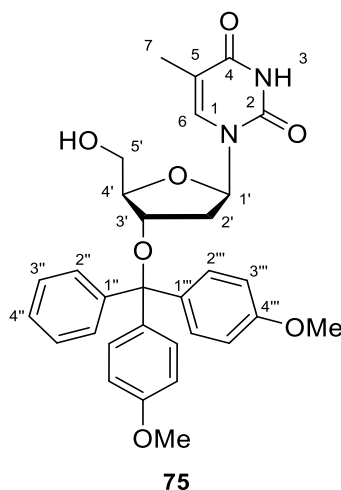
**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 212, 231, 269$ .

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 659.3$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_5$  (658.30)

ber.: 659.3146 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 659.3117 [M+H]<sup>+</sup>.

**3'-O-Dimethoxytritylthymidin**

Zu einer Lösung von 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-*O*-Dimethoxytritylthymidin **78** (5.10 g, 7.74 mmol) in Tetrahydrofuran (46 mL) wurde unter Eisbadkühlung Tetrabutylammoniumfluoridlösung (1 M in THF, 10.8 mL, 10.8 mmol) hinzu gegeben und die Reaktionslösung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (10 mL) beendet und das Reaktionsgemisch auf im Vakuum ca. ein Drittel des Gesamtvolumens eingengt. Die Reaktionsmischung wurde mit Essigsäureethylester (3 x 50 mL) extrahiert, die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (32 x 5.5 cm, DCM:MeOH 96:4). Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 3.74 g (6.87 mmol, 89%).

**DC:**  $R_f = 0.22$  (DCM:MeOH 96:4).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

8.28 (s, 1H, NH), 7.36 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H, H-6), 7.26-7.10 (m, 9H, H-2''-H-4'' + H-2'''), 6.74 (d,  $J = 8.9$  Hz, 4H, H-3'''), 6.03 (dd,  $J = 8.80$ ,  $J = 5.7$  Hz, 1H, H-1'), 4.27-4.23 (m, 1H, H-3'), 3.90-3.85 (m, 1H, H-4'), 3.69 (s, 6H, OMe), 3.59-3.51 (m, 1H, H-5'b), 3.27-3.16 (m, 1H, H-5'a), 2.27 (br s, 1H, OH), 1.83 (ddd,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 6.3$  Hz,  $J = 2.57$  Hz, 1H, H-2'b), 1.75 (d,  $J = 0.9$  Hz, 3H, H-7), 1.61 (ddd,  $J = 13.57$  Hz,  $J = 5.7$  Hz,  $J = 1.47$  Hz, 1H, H-2'a).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

163.37 (C-4), 158.74 + 158.71 (2 x 4'''), 150.19 (C-2), 137.14 (C-6), 145.06 + 136.26 + 136.20 + 130.23 + 130.19 + 128.25 (C-1''-4'' + 1'''-2'''), 113.32 (3'''), 110.96 (C-5), 87.60 (C-Trityl), 87.22 (C-4'), 85.54 (C-1'), 74.23 (C-3'), 62.63 (C-5'), 55.25 (OMe), 38.60 (C-2'), 12.45 (C-7).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 112\text{ }^\circ\text{C}$ .

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3402, 3180, 3058, 2948, 2931, 2854, 2837, 2360, 2343, 1681.

**UV/VIS (MeOH):**  $\lambda_{\text{max}} = 234, 267$ .

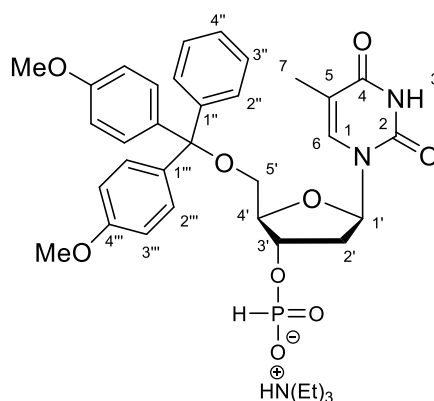
**MS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z = 545.4$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_5$  (544.22)

ber.: 545.2260 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 545.2282 [M+H]<sup>+</sup>.

### Triethylammoniumsalz von 5'-O-Dimethoxytritylthymidin-3'-H-phosphonat.



76

Zu einer Lösung von *N*-Methylmorpholin (11.0 mL, 100 mmol) in DCM (80 mL) wurde Phosphortrichlorid (875  $\mu\text{L}$ , 10.0 mmol) tropfenweise über 10 min. hinzugegeben und bis zum Abklingen der exothermen Reaktion gerührt. Frisch getrocknetes 1,2,4-Triazol (2.30 g, 33.2 mmol) wurde hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 30 min. bei Raumtemperatur gerührt, bevor mit einem Eisbad für 15 min. gekühlt wurde. Eine Lösung von 5'-O-Dimethoxytritylthymidin **77** (1.09 g, 2.00 mmol) in DCM (30.0 mL) wurde unter Eisbadkühlung über einen Zeitraum von 30 min. zugetropft und die Reaktionslösung für 10 min. bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in Triethylammoniumbikarbonat-Puffer (80 mL, 1 M, pH 8.5) gegossen und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in

Methanol (20 mL) gelöst und über Celite filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum bis zur Trockne eingengt und das Produkt als weißer Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 1.50 g (1.98 mmol, quant.).

**DC:**  $R_f = 0.60$  (DCM:MeOH 4:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

8.79 (s, 1H, NH), 7.70 (s, 0.5H, P-H). 7.61 (d,  $J = 1.10$  Hz, 1H, H-6), 7.25-7.16 (m, 9H, H-2''-H-4'' + H-2'''), 6.82 (d,  $J = 8.80$  Hz, 4H, H-3'''), 6.34 (dd,  $J = 8.31$ ,  $J = 5.6$  Hz, 1H, H-1'), 6.13 (s, 0.5H, P-H)., 5.07-4.97 (m, 1H, H-3'), 4.25-4.29 (m, 1H, H-4'), 3.79 (s, 6H, OMe), 3.49 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H-5'b), 3.38 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H-5'a), 2.77 (q,  $J = 7.2$  Hz, 6H, 3 x  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.62 (ddd,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 5.50$  Hz,  $J = 2.80$  Hz, 1H, H-2'b), 2.02 (ddd,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 5.9$  Hz, 1H, H-2'a), 1.23 (d,  $J = 1.10$  Hz, 1H, H-7), 1.14 (t,  $J = 7.2$  Hz, 9H, 3 x  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

163.91 (C-4), 158.67 + 158.65 (2 x 4'''), 150.64 (C-2), 144.29 (C-6), 146.73 + 135.77 + 135.37 + 135.30 + 130.19 + 130.15 (C-1''-4'' + 1'''-2'''), 113.22 (3'''), 111.16 (C-5), 86.96 (C-Triptyl), 85.42 (C-4'), 84.53 (C-1'), 74.13 (C-3'), 63.57 (C-5'), 55.23 (OMe), 45.88 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 39.79 (C-2'), 11.56 (C-7), 9.86 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  in ppm):

3.48

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2978, 2945, 2835, 2621, 2605, 2529, 2497, 2331, 1685, 1605.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 234, 26$ .

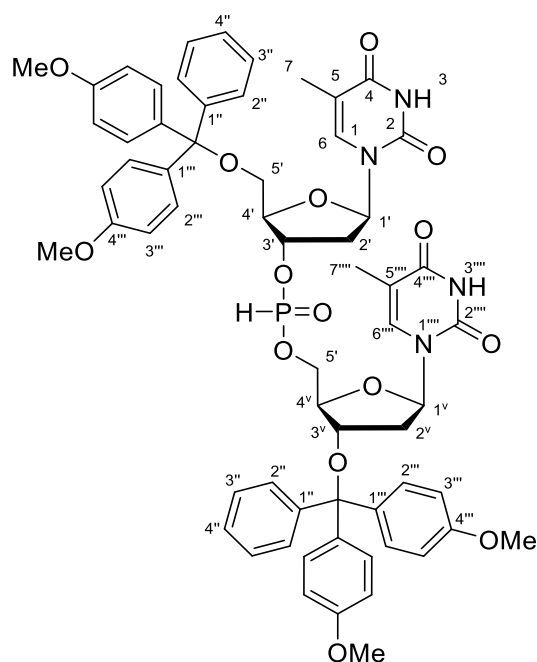
**MS** (ESI<sup>-</sup>):  $m/z = 606.2$  [ $\text{M-HN}(\text{Et})_3^+$ ]<sup>-</sup>,

**HRMS** (ESI<sup>-</sup>):  $\text{C}_{37}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}$  (710.32)

ber.: 606.1778 [ $\text{M-HN}(\text{Et})_3^+$ ]<sup>-</sup>,

gef.: 606.1756 [ $\text{M-HN}(\text{Et})_3^+$ ]<sup>-</sup>.



**5'-Dimethoxytritylthymidin-(3,5)-*H*-Phosphonyl-3'-Dimethoxytritylthymidin****78**

Zu einer Lösung von 5'-Dimethoxytritylthymidin-3'-*H*-Phosphonat **76** (350 mg, 0.500 mmol) und 3'-Dimethoxytritylthymidin **75** (270 mg, 0.500 mmol) in Pyridin (5.0 mL) wurde unter Eisbadkühlung Pivaloylchlorid (246 µg, 2.00 mmol), gegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Triethylammoniumbikarbonatlösung (40 mL, 1 M, pH 8.5) (200 mL) beendet und das Reaktionsgemisch mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (24 x 2.5 cm, DCM:MeOH 9:1). Das Produkt als weiß-gelblicher Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 449 mg (0.395 mmol, 79%).

**DC:**  $R_f = 0.25$  (DCM:MeOH 9:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ ,  $\delta$  in ppm):

10.12 (s, 2H, 2 x NH), 10.02 (s, 2H, 2 x NH<sup>i</sup>), 7.79 (s, 0.5H, P-H), 7.43 (s, 0.5H, P-H), 7.58-7.29 (m, 40H, 2 x (H-2''-H-4'' + H-2''') + 2 x (H-2''<sup>i</sup>-H-4''<sup>i</sup> + H-2''<sup>iii</sup>) + H-6<sup>i</sup>/6<sup>j</sup>/6<sup>iiii</sup>/6<sup>iiii</sup>), 6.95-6.85 (m, 16H, 2 x H-3''' + 2 x H-3''<sup>iii</sup>), 6.40-6.30 (m, 4H, H-1'/1<sup>v</sup> + 1<sup>i</sup>/1<sup>vi</sup>), 6.00 (s, 0.5H, P-H<sup>i</sup>), 5.95 (s, 0.5H, P-H<sup>i</sup>), 5.35-5.24 (m, 2H, H-3'/3<sup>v</sup>), 4.43-4.32 (m, 2H, H-3<sup>ij</sup>/3<sup>vi</sup>), 4.24-4.14 (m, 2H, H-4'/4<sup>v</sup>), 4.07-3.82 (m, 6H, H-4<sup>ii</sup>/4<sup>vi</sup> + H-5'/5<sup>v</sup>), 3.74 (s, 24H, OMe/OMe<sup>i</sup>), 3.49-3.41 (m, 4H, H-5<sup>ii</sup>/5<sup>vi</sup>), 2.61-2.41 (m, 4H, H-2'/2<sup>v</sup>), 1.91-1.80 (m, 4H,

H-2<sup>i</sup>/2<sup>vi</sup>), 1.75 (2 x d,  $J = 0.9$  Hz, 6H, 2x H-7/7<sup>iiii</sup>), 1.45 (2 x d,  $J = 0.9$  Hz, 6H, 2 x H-7<sup>i</sup>/7<sup>iiii</sup>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  $\delta$  in ppm):

163.29 (br, C-4/4<sup>iiii</sup>/4<sup>i</sup>/4<sup>iiii</sup>), 159.96 (br) + 159.87 (br) (2 x C-4<sup>iii</sup>/C-4<sup>iiii</sup>), 151.39 (br, C-2/2<sup>iiii</sup>/2<sup>i</sup>/2<sup>iiii</sup>), 146.45 + 146.39 + 145.77 + 145.71 (C-6/6<sup>iiii</sup>/6<sup>i</sup>/6<sup>iiii</sup>), 137.09 (br) + 137.02 (br) + 136.46 (br) + 136.36 (br) + 136.27 (br) + 131.23 + 131.21 + 131.09 (br) + 129.17 (br) + 129.14 + 129.09 (br) + 128.91 (br) + 128.86 + 127.92 (br) (2 x (C-1<sup>ii</sup>-4<sup>ii</sup> + 1<sup>iii</sup>-2<sup>iii</sup>)) + 2 x (C-1<sup>ii</sup>-4<sup>ii</sup> + 1<sup>iii</sup>-2<sup>iii</sup>), 114.30 + 114.28 + 114.15 (br) (2 x C-3<sup>iii</sup> + 2 x C-3<sup>iiii</sup>), 111.48 + 111.45 + 111.40 + 111.34 (C-5/5<sup>iiii</sup>/5<sup>i</sup>/5<sup>iiii</sup>), 88.35 + 88.32 + 87.85 + 87.83 (C-Trityl), 85.94 (br) + 85.84 (br) (C-4<sup>i</sup>/4<sup>v</sup>/4<sup>i</sup>/4<sup>vi</sup>), 85.15 (br) + 85.15 (br) (C-1<sup>i</sup>/1<sup>v</sup>/1<sup>i</sup>/1<sup>vi</sup>), 77.55 + 77.38 + 75.15 + 77.03 (C-3<sup>i</sup>/3<sup>v</sup>/3<sup>i</sup>/3<sup>vi</sup>), 66.50 + 66.25 + 64.26 + 66.13 (C-5<sup>i</sup>/5<sup>v</sup>/5<sup>i</sup>/5<sup>vi</sup>), 55.65 (br, 2 x OMe + 2 x OMe<sup>i</sup>), 39.51 + 39.48 + 39.36 + 39.23 (C-2<sup>i</sup>/2<sup>v</sup>/2<sup>i</sup>/2<sup>vi</sup>), 12.57 (br) + 12.22 (br) (C-7<sup>i</sup>/7<sup>v</sup>/7<sup>i</sup>/7<sup>vi</sup>).

**<sup>31</sup>P-NMR** (121 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  $\delta$  in ppm):

8.88, 7.58.

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 95$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3182, 3051, 2947, 2931, 2837, 1683, 1605, 1507, 1460, 1244.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{max} = 234, 266$ .

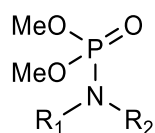
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 1335.5$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI)<sup>+</sup>: C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (1334.40)

ber.: 531.1486 [M-2xDMTr+H]<sup>+</sup>,

gef.: 531.1475 [M-2xDMTr+H]<sup>+</sup>.

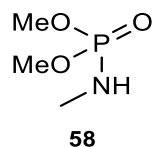
### Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung von Dimethylphosphoramidaten mit aliphatischen Alkylketten



Zu einer Lösung von Dimethylphosphit (330 mg, 3.00 mmol, 1.0 Äq.) in Tetrachlorkohlenstoff (3.33 mL/mmol<sub>DMP</sub>) wurde das jeweilige aliphatische Amin (7.50 mmol, 2.5 Äq.) unter Eisbadkühlung gegeben und die Reaktionsmischung für 0.5 h-12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton

(10.0 mL) aufgenommen und erneut filtriert. Nach Abzug des Lösungsmittels wurden Derivate von Dimethylphosphoramidat (DMP) als klare, farblose Öle erhalten.

### Synthese von Dimethylmethylphosphoramidat



**Ausbeute:** 412 mg (2.96 mmol, 99%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

2.55 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.56 (br s, 1H, NH), 3.68 (s, 3H, OMe), 3.71 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

26.18 (NHMe), 53.44 (OMe), 53.50 (OMe).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

15.76.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3247, 2956, 2852, 1652, 1461, 1224, 1182, 1116, 1026, 975.

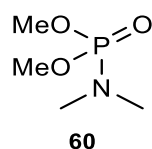
**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 140.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub>P (139.03)

ber.: 140.0470 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 140.0467 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Synthese von Dimethyldimethylphosphoramidat



**Ausbeute:** 499 mg (3.00 mmol, quant.).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

2.65 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.67 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.66 (s, 3H, OMe), 3.69 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

53.45 + 53.39 (2 x OMe), 35.59 (2 x NMe).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

15.39.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3409, 3265, 2958, 2854, 2530, 2445, 1654, 1448, 1222, 1116.

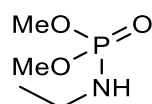
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 154.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): **C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>P** (153.05)

ber.: 154.0627 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 154.0623 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Dimethylethylphosphoramidat



59

**Ausbeute:** 330 mg (1.97 mmol, 66%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  in ppm):

1.10 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.90 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.67 (s, 3H, OMe), 3.70 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  in ppm):

12.45 (CH<sub>3</sub>), 39.69 (CH<sub>2</sub>), 53.19 (OMe), 53.24 (OMe).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  in ppm):

14.63.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3386, 3264, 2953, 2919, 2854, 1638, 1536, 1460, 1191, 1038.

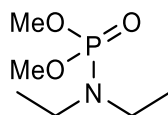
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 154.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): **C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>P** (153.05)

ber.: 154.0627 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 154.0622 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Synthese von Dimethyldiethylphosphoramidat



61

**Ausbeute:** 363 mg (2.01 mmol, 67%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  in ppm):

1.08 (2 x t,  $J$  = 7.0 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 3.04 (2 x q,  $J$  = 7.0 Hz, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3H, OMe), 3.68 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  in ppm):

12.42 (CH<sub>3</sub>), 12.45 (CH<sub>3</sub>), 39.64 (CH<sub>2</sub>), 39.69 (CH<sub>2</sub>), 53.19 (OMe), 53.25 (OMe).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

14.68.

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3425, 2977, 2852, 2729, 2516, 1712, 1465, 1402, 1255, 1186.

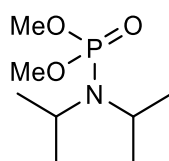
MS (ESI<sup>+</sup>): m/z = 182.2 [M+H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>P (181.08)

ber.: 182.0940 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 182.0935 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Dimethyldiisopropylphosphoramidat



**Ausbeute:** 412 mg (1.97 mmol, 65%).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

1.21 (2 x d, *J* = 6.60 Hz, 12H, 4 x CH<sub>3</sub>), 3.53 (2 x q, *J* = 6.60 Hz, 2H, 2 x CH), 3.64 (s, 3H, OMe), 3.66 (s, 3H, OMe).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

23.00 (br, 2 x CH<sub>3</sub>), 49.12 (2 x CH), 53.30 (OMe), 53.35 (OMe).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

13.04.

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3426, 2968, 2850, 2738, 2515, 1714, 1467, 1402, 1255, 1188.

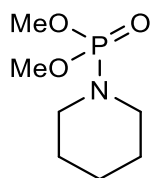
MS (ESI<sup>+</sup>): m/z = 210.1 [M+H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub>P (209.11)

ber.: 210.1253 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 210.1246 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Dimethylpiperidylphosphoramidat



63

**Ausbeute:** 495 mg (2.56 mmol, 86%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

1.45-1.61 (m, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.02-3.10 (m, 4H, 2 x NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.66 (s, 3H, OMe), 3.69 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

23.62 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.51 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.55 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 44.98 + 45.01 (2 x NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 53.19 (OMe), 53.25 (OMe).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

13.04.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2937, 2848, 1714, 1452, 1382, 1340, 1251, 1166, 1120, 1060.

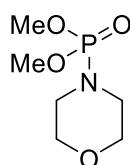
**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = 194.4 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>P (193.08)

ber.: 194.0940 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 194.0934 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Dimethylmorpholinylphosphoramidat



64

**Ausbeute:** 560 mg (2.90 mmol, 96%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

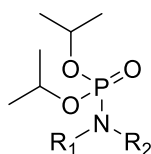
3.11-3.18 (m, 4H, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 3.66-3.71 (m, 7H, OMe + CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 3H, OMe).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

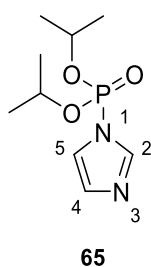
43.88 (CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 43.99 (CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 53.69 (OMe), 53.75 (OMe), 66.57 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 66.63 (CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

15.76.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3488, 2954, 2906, 2852, 1714, 1452, 1371, 1299, 1249, 1184.**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 196.2 [M+H]<sup>+</sup>.**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): **C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>P** (195.06)ber.: 196.0732 [M+H]<sup>+</sup>,gef.: 196.0726 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).**Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung von Diisopropyl(1*H*-Imidazolyl)phosphoramidaten mit aliphatischen Alkylketten**

Zu einer Lösung des jeweiligen Imidazols (7.50 mmol, 2.5 Äq.) und Triethylamin (3.3 mmol, 153  $\mu\text{L}/\text{mmol}_{\text{DIP}}$ , 1.1 Äq.) in Tetrachlorkohlenstoff (3.33 mL/ $\text{mmol}_{\text{DIP}}$ ) wurde Diisopropylphosphit (504  $\mu\text{L}$ , 3.00 mmol, 1.0 Äq.) zu getropft und die Reaktionsmischung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton (10.0 mL) aufgenommen und erneut filtriert. Nach Abzug des Lösungsmittels wurden Derivate von Diisopropylphosphoramidat als klare, farblose Öle erhalten.

**Synthese von Diisopropyl-(1*H*-imidazol-1-yl)-phosphonat****Ausbeute:** 508 mg (2.20 mmol, 73%).**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  in ppm):1.22 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 1.40 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 4.66-4.75 (m, 2H, 2 x CH), 7.13-7.18 (m, 2H, H-Im-4 + H-Im-5), 7.78 (s, 1H, H-2).**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  in ppm):

23.22 + 23.27 + 23.69 + 23.74 (4 x CH<sub>3</sub>), 74.32 + 74.38 (2 x CH), 119.05 (C-5), 131.17 (C-4), 139.60 (C-2).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

-8.10.

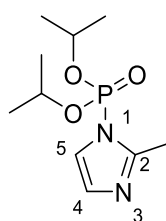
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3118, 2983, 2933, 2360, 2337, 1739, 1467, 1377, 1284, 1176.

**HRMS** (ESI)<sup>+</sup>: C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>P (232.09)

ber.: 233.1049 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 233.0906 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Diisopropyl-(2-methyl-1H-imidazol-1-yl)-phosphonat



66

**Ausbeute:** 338 mg (1.37 mmol, 46%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

1.25 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 1.40 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 3H, C-CH<sub>3</sub>), 4.72 (sext, *J* = 6.2 Hz 2H, 2 x CH), 6.90-6.93 (m, 1H, H-4), 7.17-7.22 (m, 1H, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

21.95 (C-CH<sub>3</sub>), 23.24 + 23.29 + 23.68 + 23.73 (4 x CH<sub>3</sub>), 74.03 + 74.08 (2 x CH), 120.83 (C-5), 128.35 (C-4), 153.08 (C-2).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

-7.42.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2980, 2953, 1536, 1456, 1387, 1297, 1199, 1103, 1052, 981.

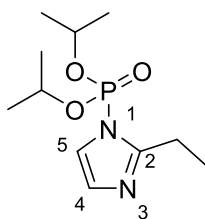
**HRMS** (ESI)<sup>+</sup>: C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>P (246.11)

ber.: 247.1205 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 247.1197 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Diisopropyl-(2-ethyl-1H-imidazol-1-yl)-phosphonat





67

**Ausbeute:** 448 mg (1.72 mmol, 58%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

1.23 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 1.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, C-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.39 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 3H, C-CH<sub>3</sub>), 2.90 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, C-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.72 (sept, *J* = 6.2 Hz, 2H, 2 x CH), 6.93-6.96 (m, 1H, H-4), 7.16-7.19 (m, 1H, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

11.92 (C-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21.95 (C-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23.24 + 23.29 + 23.68 + 23.73 (4 x CH<sub>3</sub>), 74.03 + 74.08 (2 x CH), 120.83 (C-5), 128.35 (C-4), 153.08 (C-2).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

-7.30.

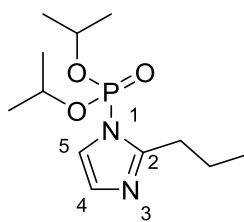
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3398, 3143, 2972, 2937, 2525, 1946, 1627, 1466, 1383, 1193.

**HRMS** (ESI)<sup>+</sup>: C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>P (260.12)

ber.: 261.1326 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 261.1355 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Diisopropyl-(2-isopropyl-1H-imidazol-1-yl)-phosphonat



68

**Ausbeute:** 736 mg (2.68 mmol, 90%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

1.01 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H, H-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.25 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 1.40 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 1.79-1.90 (m, 2H, H-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.86 (t, *J* = 7.70 Hz, 2H, H-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.73 (sept, *J* = 6.2 Hz, 2H, 2 x CH), 6.94-6.98 (m, 1H, H-4), 7.15-7.20 (m, 1H, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

13.77 (C-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CCH3), 21.19 (C-CH<sub>2</sub>CCH2CH3), 23.26 + 23.31 + 23.70 + 23.75 (4 x CH<sub>3</sub>), 30.51 (C-CCH2CH2CH3), 74.04 + 74.09 (2 x CH), 120.68 (C-5), 128.40 (C-4), 152.08 (C-2).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

-7.24.

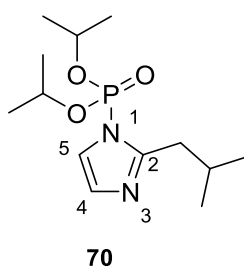
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2978, 2931, 2874, 2609, 2501, 1466, 1383, 1283, 1195, 1107.

**HRMS** (ESI)<sup>+</sup>: C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>P (274.14)

ber.: 275.1518 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 275.1508 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Diisopropyl-(2-isobutyl-1H-imidazol-1-yl)-phosphonat



**Ausbeute:** 450 mg (1.73 mmol, 57%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

0.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H, C-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.25 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 1.40 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 2.78 (sept, *J* = 6.8 Hz 2H, C-CH<sub>2</sub>CCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.79 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, C-CH<sub>2</sub>CCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.69-4.78 (m, 2H, 2 x CH), 6.94-7.00 (m, 1H, H-4), 7.15-7.19 (m, 1H, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

14.36 (br, C-CH<sub>2</sub>CH(CCH3)<sub>2</sub>), 23.26 + 23.31 + 23.70 + 23.75 (4 x CH<sub>3</sub>), 28.66 (CH<sub>2</sub>CCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 31.75 (C-CCH2CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 74.04 + 74.09 (2 x CH), 121.48 (C-5), 128.36 (C-4), 152.16 (C-2).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

-7.13.

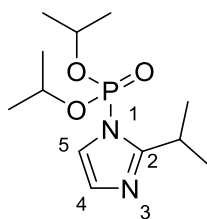
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2981, 2960, 2869, 1533, 1494, 1467, 1380, 1282, 1195, 991.

**HRMS** (ESI)<sup>+</sup>: C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>P (288.16)

ber.: 289.1675 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 289.1664 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Diisopropyl-(2-isopropyl-1H-imidazol-1-yl)-phosphonat



69

**Ausbeute:** 576 mg (2.64 mmol, 80%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

1.26 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 1.34 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, C-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.40 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 3.46 (sept, *J* = 6.8 Hz 2H, C-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.75 (sept, *J* = 6.2 Hz, 2H, 2 x CH), 6.93-6.99 (m, 1H, H-4), 7.15-7.15 (m, 1H, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

22.16 (C-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.32 + 23.37 + 23.69 + 23.74 (4 x CH<sub>3</sub>), 27.53 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 74.08 + 74.14 (2 x CH), 120.15 (C-5), 128.41 (C-4), 157.39 (C-2).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O, δ in ppm):

-7.13.

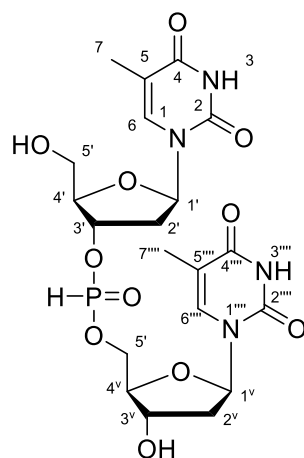
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2981, 2933, 2873, 1535, 1492, 1458, 1386, 1280, 1195, 1143.

**HRMS** (ESI)<sup>+</sup>: C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>P (274.14)

ber.: 275.1446, [M+H]<sup>+</sup>,

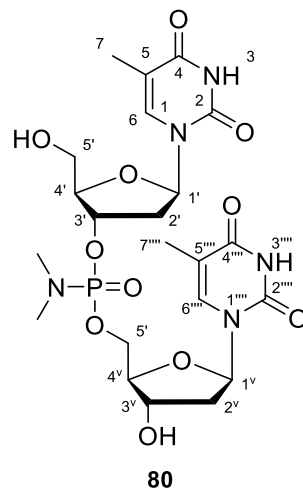
gef.: 275.1508 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

### Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung von Thymidyl-3',5'-Thymidin-*N*-Alkyl-Phosphoramidaten mit aliphatischen Alkylketten



5'-Dimethoxytritylthymidin-(3,5)-H-Phosphonyl-3'-dimethoxytritylthymidin **78**

(68.2 mg, 60  $\mu$ mol, 1 Äq.) wurde in THF (5.0 mL/mmol) vorgelegt und mit dem jeweiligen Amin (600  $\mu$ mol, 10 Äq.) versetzt. Unter Eisbadkühlung wurde Tetrachlorkohlenstoff (5.0 mL/mmol) hinzu gegeben und die resultierende Suspension für 4 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (20 x 1.5 cm, DCM:MeOH 92:8). Das Produkt wurde jeweils als weißer, schaumiger Feststoff erhalten und ohne Charakterisierung zur Entschützung weiter umgesetzt. 5'-*O*-DMTr-Thymidyl-(3',5')-3'-*O*-DMTr-thymidin-*N*-alkylphosphoramidate (0.030 mmol, 1 Äq.) wurden in Wasser/Eisessig (13 mL/mmol, 1:4) gelöst und bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Die Lösung wurde lyophilisiert, der rötlich schaumige Rückstand in Diethylether (5.0 mL) aufgenommen und mit dest. Wasser extrahiert (4 x 5.0 mL). Die wässrige Phase wurde erneut lyophilisiert und das Produkt jeweils als weißer, schaumiger Feststoff erhalten.

**Thymidyl-3',5'-thymidin-*N,N*-dimethylphosphoramidat**

**Ausbeute:** 17.6 mg (30  $\mu\text{mol}$ , quant.).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  in ppm):

7.58-7.41 (m, 4H, H-6/6<sup>i</sup>/6<sup>'''</sup>/6<sup>''''</sup>), 6.20-6.06 (m, 4H, H-1<sup>i</sup>/1<sup>v</sup> + 1<sup>''</sup>/1<sup>''''</sup>), 4.86-4.77 (m, 2H, H-3<sup>i</sup>/3<sup>v</sup>), 4.46-4.39 (m, 2H, H-3<sup>''</sup>/3<sup>''''</sup>), 4.29-4.04 (m, 8H, H-4<sup>i</sup>/4<sup>v</sup>/4<sup>''</sup>/4<sup>''''</sup> + H-5<sup>i</sup>/5<sup>v</sup>), 3.74-3.59 (m, 4H, H-5<sup>''</sup>/5<sup>''''</sup>), 2.62-2.55 (m, 12H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2/\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.50-2.40 + 2.37-2.20 (2 x m, 8H, H-2<sup>i</sup>/2<sup>v</sup>/H-2<sup>''</sup>/2<sup>''''</sup>), 1.81-1.70 (m, 12H, H-7/7<sup>'''</sup>/7<sup>''''</sup>/7<sup>''''''</sup>).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  in ppm):

11.30, 11.27.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3209, 3066, 2896, 2823, 1676, 1474, 1421, 1275, 1230, 1003.

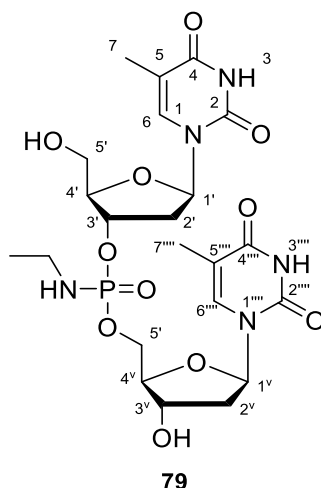
**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  = 266.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 574.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$  (573.18)

ber.: 574.1908, [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 574.1890 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

**Thymidyl-3',5'-thymidin-*N*-ethylphosphoramidat**

**Ausbeute:** 6.9 mg (12  $\mu$ mol, 40%).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  in ppm):

7.61 (d,  $J = 1.10$  Hz, 1H, H-6), 7.59 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H, 6'''), 7.55 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H, 6<sup>i</sup>), 7.53 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H, H-6''''<sup>i</sup>), 6.28-6.18 (m, 4H, H-1'/1<sup>v</sup> + 1<sup>ii</sup>/1<sup>vi</sup>), 4.99-4.90 (m, 2H, H-3'/3<sup>v</sup>), 4.56-4.48 (m, 2H, H-3<sup>ii</sup>/3<sup>vi</sup>), 4.31-4.09 (m, 8H, H-4'/4<sup>v</sup>/4<sup>ii</sup>/4<sup>vi</sup> + H-5'/5<sup>v</sup>), 3.82-3.67 (m, 4H, H-5<sup>ii</sup>/5<sup>vi</sup>), 2.92 (2 x q,  $J = 7.0$  Hz, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3/\text{NCH}_2\text{CH}_3^i$ ), 2.58-2.49 + 2.45-2.28 (2 x m, 8H, H-2'/2<sup>v</sup>/H-2<sup>ii</sup>/2<sup>vi</sup>), 1.90-1.83 (m, 12H, H-7/7''''/7<sup>i</sup>/7''''<sup>i</sup>), 1.09 (2 x t,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3/\text{NCH}_2\text{CH}_3^i$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  in ppm):

10.72 (br).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3198, 3070, 2945, 2825, 1687, 1472, 1428, 1275, 1232, 1003.

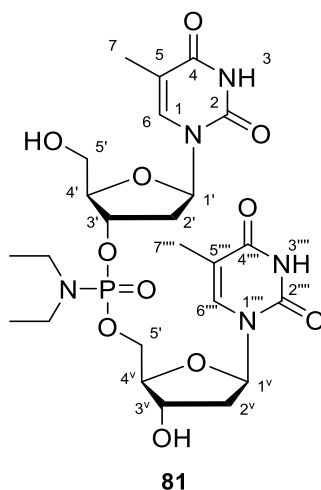
**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 266$ .

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 574.2$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$  (573.18)

ber.: 574.1908, [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 574.1888 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

**Thymidyl-3',5'-thymidin-*N*-ethylphosphoramidat**

**Ausbeute:** 8.8 mg (14  $\mu$ mol, 49%).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  in ppm):

7.63-7.58 (m, 2H, H-6/6'''), 7.56-7.51 (m, 2H, 6<sup>i</sup>/H-6''''<sup>i</sup>), 6.28-6.18 (m, 4H, H-1'/1<sup>v</sup> + 1<sup>i</sup>/1<sup>vi</sup>), 4.94-4.83 (m, 2H, H-3'/3<sup>v</sup>), 4.55-4.48 (m, 2H, H-3<sup>i</sup>/3<sup>vi</sup>), 4.28-4.07 (m, 8H, H-4'/4<sup>v</sup>/4<sup>i</sup>/4<sup>vi</sup> + H-5'/5<sup>v</sup>), 3.83-3.69 (m, 4H, H-5<sup>i</sup>/5<sup>vi</sup>), 3.12-2.99 (m, 8H, 2 x  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ /2 x  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ <sup>i</sup>), 2.60-2.48 + 2.47-2.29 (2 x m, 8H, H-2'/2<sup>v</sup>/H-2<sup>i</sup>/2<sup>vi</sup>), 1.89-1.81 (m, 12H, H-7/7''''/7<sup>i</sup>/7''''<sup>i</sup>), 1.13-1.06 (m, 12H, 2 x  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ /2 x  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ <sup>i</sup>).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  in ppm):

10.70 (br).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3185, 3045, 2972, 2931, 2888, 1685, 1472, 1383, 1272, 1232.

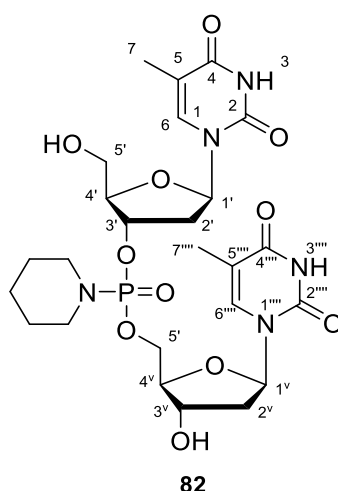
**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  = 265.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = 602.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$  (601.21)

ber.: 602.2221, [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 602.2202 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

**Thymidyl-3',5'-thymidin-*N*-piperidylphosphoramidat**

**Ausbeute:** 13.2 mg (21  $\mu$ mol, 72%).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  in ppm):

7.56 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H-6), 7.54 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 6'''), 7.51 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 6<sup>i</sup>), 7.49 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H-6''''<sup>i</sup>), 6.22-6.15 (m, 4H, H-1'/1<sup>v</sup> + 1<sup>i</sup>/1<sup>vi</sup>), 4.89-4.83 (m, 2H, H-3'/3<sup>v</sup>), 4.51-4.44 (m, 2H, H-3<sup>ii</sup>/3<sup>vi</sup>), 4.25-4.08 (m, 8H, H-4'/4<sup>v</sup>/4<sup>ii</sup>/4<sup>vi</sup> + H-5'/5<sup>v</sup>), 3.77-3.65 (m, 4H, H-5<sup>ii</sup>/5<sup>vi</sup>), 3.05-2.93 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{NCH}_2/\text{CH}_2\text{NCH}_2^i$ ), 2.53-2.45 + 2.43-2.25 (2 x m, 8H, H-2'/2<sup>v</sup>/H-2<sup>ii</sup>/2<sup>vi</sup>), 1.83-1.78 (m, 12H, H-7/7''''/7<sup>i</sup>/7<sup>iii</sup>), 1.55-1.47 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2/\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^i$ ), 1.46-1.39 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2/\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^i$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  in ppm):

9.07, 9.11.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3200, 3064, 2935, 2858, 1685, 1466, 1370, 1272, 1232.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 265$ .

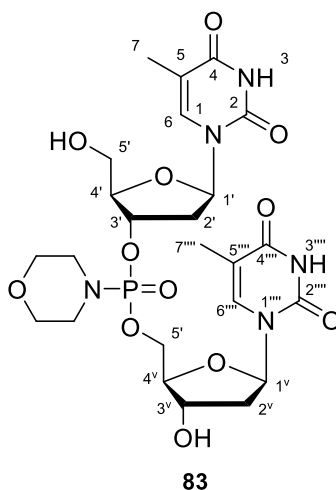
**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 614.2$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$  (613.21)

ber.: 614.2221, [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 614.2202 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).



**Thymidyl-3',5'-thymidin-*N*-morpholinylphosphoramidat**

**Ausbeute:** 9.6 mg (15  $\mu$ mol, 52%).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  in ppm):

7.60 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H-6), 7.58 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 6'''), 7.53 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 6<sup>i</sup>), 7.52 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H-6''''<sup>i</sup>), 6.22-6.15 (m, 4H, H-1'/1<sup>v</sup> + 1<sup>i</sup>/1<sup>vi</sup>), 5.00-4.93 (m, 2H, H-3'/3<sup>v</sup>), 4.53-4.47 (m, 2H, H-3<sup>i</sup>/3<sup>vi</sup>), 4.35-4.15 (m, 8H, H-4'/4<sup>v</sup>/4<sup>i</sup>/4<sup>vi</sup> + H-5'/5<sup>v</sup>), 3.79-3.73 (m, 4H, H-5<sup>i</sup>/5<sup>vi</sup>), 3.71-2.65 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{OCH}_2/\text{CH}_2\text{OCH}_2^i$ ), 3.20-3.12 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{NCH}_2/\text{CH}_2\text{NCH}_2^i$ ), 2.60-2.52 + 2.47-2.29 (2 x m, 8H, H-2'/2<sup>v</sup>/H-2<sup>i</sup>/2<sup>vi</sup>), 1.91-1.82 (m, 12H, H-7/7''''/7<sup>i</sup>/7''''<sup>i</sup>).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  in ppm):

7.72, 7.62.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3196, 3058, 2960, 2929, 2858, 1683, 1472, 1368, 1272, 1232.

**UV/VIS** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 265$ .

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 616.2$  [M+H]<sup>+</sup>.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{P}$  (615.19)

ber.: 614.2014, [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 616.1995 (ESI<sup>+</sup>-HRMS).

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] M. Hawner, C. Ducho; Cellular Targeting of Oligonucleotides by Conjugation with Small Molecules; *Molecules* **2020**, *25*, 5963–6010.
- [2] L. J. Scott; Givosiran: First Approval; *Drugs* **2020**, *80*, 335–339.
- [3] L. J. Scott, S. J. Keam; Lumasiran: First Approval; *Drugs* **2021**, *81*, 277–282.
- [4] A. D. Springer, S. F. Dowdy; GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics; *Nucleic Acid Ther.* **2018**, *28*, 109–118.
- [5] Y. Feng, Z. Zhu, W. Chen, P. Prabakaran, K. Lin, D. Dimitrov; Conjugates of Small Molecule Drugs with Antibodies and Other Proteins; *Biomedicines* **2014**, *2*, 1–13.
- [6] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson; Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 280–284.
- [7] N. Delihias, S. E. Rokita, P. Zheng; Natural antisense RNA/target RNA interactions: Possible models for antisense oligonucleotide drug design; *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 751–753.
- [8] M. L. Sokolosky, M. J. Wargovich; Homeostatic imbalance and colon cancer: the dynamic epigenetic interplay of inflammation, environmental toxins, and chemopreventive plant compounds; *Front. Oncol.* **2012**, *2*, 57.
- [9] M. B. Ramocki, H. Y. Zoghbi; Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes; *Nature* **2008**, *455*, 912–918.
- [10] M. E. Kotas, R. Medzhitov; Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility; *Cell* **2015**, *160*, 816–827.
- [11] T. K. Chaudhuri, S. Paul; Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches; *FEBS J.* **2006**, *273*, 1331–1349.
- [12] C. I. E. Smith, R. Zain; Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *59*, 605–630.
- [13] M. L. Jain, P. Y. Bruice, I. E. Szabó, T. C. Bruice; Incorporation of Positively Charged Linkages into DNA and RNA Backbones: A Novel Strategy for Antigene and Antisense Agents; *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1284–1309.
- [14] R. I. Mahato, K. Cheng, R. V. Guntaka; Modulation of gene expression by antisense and antigene oligodeoxynucleotides and small interfering RNA; *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 3–28.
- [15] C. Hélène, J.-J. Toulmé; Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids; *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* **1990**, *1049*, 99–125.
- [16] A. Aartsma-Rus, L. van Vliet, M. Hirschi, A. A. M. Janson, H. Heemskerk, C. L. de Winter, S. de Kimpe, J. C. T. van Deutekom, P. A. C. 't Hoen, G.-J. B. van Ommen; Guidelines for Antisense Oligonucleotide Design and Insight Into Splice-modulating Mechanisms; *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 548–553.
- [17] S. T. Crooke; Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides; *Nucleic Acid Ther.* **2017**, *27*, 70–77.

- [18] X. H. Liang, H. Sun, J. G. Nichols, S. T. Crooke; RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus; *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 2075–2092.
- [19] S. T. Crooke, B. F. Baker, R. M. Crooke, X. Liang; Antisense technology: an overview and prospectus; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 427–453.
- [20] S. T. Crooke, X. Liang, R. M. Crooke, B. F. Baker, R. S. Geary; Antisense drug discovery and development technology considered in a pharmacological context; *Biochem. Pharmacol.* **2021**, *189*, 1–28.
- [21] J. Kurreck; Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids; *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1911–1918.
- [22] M. Frieden; Expanding the design horizon of antisense oligonucleotides with alpha-L-LNA; *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6365–6372.
- [23] A. Grünweller, E. Wyszko, B. Bieber, R. Jahnel, V. A. Erdmann, J. Kurreck; Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA; *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3185–3193.
- [24] M. Egli, G. Minasov, V. Tereshko, P. S. Pallan, M. Teplova, G. B. Inamati, E. A. Lesnik, S. R. Owens, B. S. Ross, T. P. Prakash, et al.; Probing the Influence of Stereoelectronic Effects on the Biophysical Properties of Oligonucleotides: Comprehensive Analysis of the RNA Affinity, Nuclease Resistance, and Crystal Structure of Ten 2'-O-Ribonucleic Acid Modifications ; *Biochemistry* **2005**, *44*, 9045–9057.
- [25] B. Baker; Oligonucleotide-europium complex conjugate designed to cleave the 5' cap structure of the ICAM-1 transcript potentiates antisense activity in cells; *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1547–1551.
- [26] T. A. Vickers; Fully modified 2' MOE oligonucleotides redirect polyadenylation; *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1293–1299.
- [27] S. T. Crooke, T. A. Vickers, X. H. Liang; Phosphorothioate modified oligonucleotide-protein interactions; *Nucleic Acids Res.* **2021**, *48*, 5235–5253.
- [28] F. Eckstein; Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides; *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *24*, 374–387.
- [29] M. E. Østergaard, C. L. De Hoyos, W. B. Wan, W. Shen, A. Low, A. Berdeja, G. Vasquez, S. Murray, M. T. Migawa, X. Liang, et al.; Understanding the effect of controlling phosphorothioate chirality in the DNA gap on the potency and safety of gapmer antisense oligonucleotides; *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 1691–1700.
- [30] J. Temsamani, J.-Y. Tang, A. Padmapriya, M. Kubert, S. Agrawal; Pharmacokinetics, Biodistribution, and Stability of Capped Oligodeoxynucleotide Phosphorothioates in Mice; *Antisense Res. Dev.* **1993**, *3*, 277–284.
- [31] C. M. Miller, A. J. Donner, E. E. Blank, A. W. Egger, B. M. Kellar, M. E. Østergaard, P. P. Seth, E. N. Harris; Stabilin-1 and Stabilin-2 are specific receptors for the cellular internalization of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides (ASOs) in the liver; *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 2782–2794.
- [32] C. M. Perry, J. A. Barman Balfour; Fomivirsen; *Drugs* **1999**, *57*, 375–380.
- [33] L. Gales; Tegsedi (Inotersen): An Antisense Oligonucleotide Approved for the Treatment of Adult Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis; *Pharmaceuticals* **2019**, *12*, 78–84.

- [34] E. E. Neil, E. K. Bisaccia; Nusinersen: A Novel Antisense Oligonucleotide for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy; *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* **2019**, *24*, 194–203.
- [35] G. Kolovou, V. Kolovou, N. Katsiki; Volanesorsen: A New Era in the Treatment of Severe Hypertriglyceridemia; *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 982–991.
- [36] J. Hang, R. Wan, C. Yan, Y. Shi; Structural basis of pre-mRNA splicing; *Science* **2015**, *349*, 1191–1198.
- [37] M. Chorev, L. Carmel; The Function of Introns; *Front. Genet.* **2012**, *3*, 55.
- [38] M. C. Wahl, C. L. Will, R. Lührmann; The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine; *Cell* **2009**, *136*, 701–718.
- [39] D. L. Black; Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing; *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 291–336.
- [40] B. J. Blencowe; Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases; *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 106–110.
- [41] Z. Dominski, R. Kole; Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8673–8677.
- [42] M. A. Havens, M. L. Hastings; Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs; *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 6549–6563.
- [43] E. W. Ottesen; ISS-N1 makes the first FDA-approved drug for spinal muscular atrophy; *Transl. Neurosci.* **2017**, *8*, 1–6.
- [44] K. R. Q. Lim, R. Maruyama, T. Yokota; Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy; *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, *11*, 533–545.
- [45] F. Muntoni, D. E. Frank, J. Morgan, J. Domingos, F. J. Schnell, G. Dickson, L. Poppellwell, M. Guglieri, A. Seferian, M. Monforte, et al.; Golodirsen induces exon skipping leading to sarcolemmal dystrophin expression in patients with genetic mutations amenable to exon 53 skipping; *Neuromuscul. Disord.* **2018**, *28*, 5–43.
- [46] P. R. Clemens, V. K. Rao, A. M. Connolly, A. D. Harper, J. K. Mah, E. C. Smith, C. M. McDonald, C. M. Zaidman, L. P. Morgenroth, H. Osaki, et al.; Safety, Tolerability, and Efficacy of Viltolarsen in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 53 Skipping; *JAMA Neurol.* **2020**, *77*, 982.
- [47] K. R. Wagner, N. L. Kuntz, E. Koenig, L. East, S. Upadhyay, B. Han, P. B. Shieh; Safety, tolerability, and pharmacokinetics of casimersen in patients with Duchenne muscular dystrophy amenable to exon 45 skipping: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-titration trial; *Muscle Nerve* **2021**, *64*, 285–292.
- [48] J. Kim, C. Hu, C. Moufawad El Achkar, L. E. Black, J. Douville, A. Larson, M. K. Pendergast, S. F. Goldkind, E. A. Lee, A. Kuniholm, et al.; Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease; *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1644–1652.
- [49] C. C. Mello, D. Conte; Revealing the world of RNA interference; *Nature* **2004**, *431*, 338–342.
- [50] J. Kurreck; RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications; *Angew. Chem Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378–1398.
- [51] J. Haasnoot, E. M. Westerhout, B. Berkhout; RNA interference against viruses: strike and counterstrike; *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1435–1443.

- [52] L. He, G. J. Hannon; MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation; *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 522–531.
- [53] A. Reynolds; Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent; *RNA* **2006**, *12*, 988–993.
- [54] A. J. Pratt, I. J. MacRae; The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine; *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17897–17901.
- [55] T. A. Rand, K. Ginalski, N. V Grishin, X. Wang; Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14385–14389.
- [56] H. Addepalli, Meena, C. G. Peng, G. Wang, Y. Fan, K. Charisse, K. N. Jayaprakash, K. G. Rajeev, R. K. Pandey, G. Lavine, et al.; Modulation of thermal stability can enhance the potency of siRNA; *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 7320–7331.
- [57] A. R. Hernández, L. W. Peterson, E. T. Kool; Steric restrictions of RISC in RNA interference identified with size-expanded RNA nucleobases; *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1454–1461.
- [58] T. A. Rand, S. Petersen, F. Du, X. Wang; Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation; *Cell* **2005**, *123*, 621–629.
- [59] J. Kurreck; siRNA Efficiency: Structure or Sequence—That Is the Question; *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, *2006*, 1–7.
- [60] A. L. Jackson; Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “off-target” transcript silencing; *RNA* **2006**, *12*, 1197–1205.
- [61] L. Salim, G. Islam, J.-P. Desaulniers; Targeted delivery and enhanced gene-silencing activity of centrally modified folic acid–siRNA conjugates; *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 75–85.
- [62] T. C. Efthymiou, B. Peel, V. Huynh, J.-P. Desaulniers; Evaluation of siRNAs that contain internal variable-length spacer linkages; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5590–5594.
- [63] J.-P. Desaulniers, G. Hagen, J. Anderson, C. McKim, B. Roberts; Effective gene-silencing of siRNAs that contain functionalized spacer linkages within the central region; *RSC Adv.* **2017**, *7*, 3450–3454.
- [64] P. Kumar, R. Degaonkar, D. C. Guenther, M. Abramov, G. Schepers, M. Capobianco, Y. Jiang, J. Harp, C. Kaitanis, M. M. Janas, et al.; Chimeric siRNAs with chemically modified pentofuranose and hexopyranose nucleotides: altritol-nucleotide (ANA) containing GalNAc–siRNA conjugates: in vitro and in vivo RNAi activity and resistance to 5'-exonuclease; *Nucleic Acids Res.* **2020**, 1–13.
- [65] M. Nakajima, T. Kasuya, S. Yokota, R. Onishi, T. Ikehara, A. Kugimiya, A. Watanabe; Gene Silencing Activity and Hepatic Accumulation of Antisense Oligonucleotides Bearing Cholesterol-Conjugated Thiono Triester at the Gap Region; *Nucleic Acid Ther.* **2017**, *27*, 232–237.
- [66] J. Yang; Patisiran for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis; *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2019**, *12*, 95–99.
- [67] Y. N. Lamb; Inclisiran: First Approval; *Drugs* **2021**, *81*, 389–395.
- [68] R. L. Juliano, X. Ming, O. Nakagawa; Cellular uptake and intracellular trafficking of antisense and siRNA oligonucleotides; *Bioconjugate Chem* **2012**, *23*, 147–157.

- [69] R. G. Parton, A. A. Richards; Lipid Rafts and Caveolae as Portals for Endocytosis: New Insights and Common Mechanisms; *Traffic* **2003**, *4*, 724–738.
- [70] G. J. Doherty, H. T. McMahon; Mechanisms of Endocytosis; *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 857–902.
- [71] R. L. Juliano; Intracellular Trafficking and Endosomal Release of Oligonucleotides: What We Know and What We Don't; *Nucleic Acid Ther.* **2018**, *18*, 166–177.
- [72] R. L. Juliano, K. Carver, C. Cao, X. Ming; Receptors, endocytosis, and trafficking: the biological basis of targeted delivery of antisense and siRNA oligonucleotides; *J. Drug Target.* **2013**, *21*, 27–43.
- [73] R. L. Juliano, X. Ming, O. Nakagawa, R. Xu, H. Yoo; Integrin Targeted Delivery of Gene Therapeutics; *Theranostics* **2011**, *1*, 211–219.
- [74] S. Wang, N. Allen, T. A. Vickers, A. S. Revenko, H. Sun, X. Liang, S. T. Crooke; Cellular uptake mediated by epidermal growth factor receptor facilitates the intracellular activity of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides; *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 3579–3594.
- [75] C. C. Scott, F. Vacca, J. Gruenberg; Endosome maturation, transport and functions; *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *31*, 2–10.
- [76] L. Johannes, C. Wunder; Retrograde Transport: Two (or More) Roads Diverged in an Endosomal Tree?; *Traffic* **2011**, *12*, 956–962.
- [77] P. I. Hanson, A. Cashikar; Multivesicular Body Morphogenesis; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2012**, *28*, 337–362.
- [78] M. R. G. Russell, D. P. Nickerson, G. Odorizzi; Molecular mechanisms of late endosome morphology, identity and sorting; *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 422–428.
- [79] B. D. Grant, J. G. Donaldson; Pathways and mechanisms of endocytic recycling; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 597–608.
- [80] M. S. Brown, R. G. W. Anderson, J. L. Goldstein; Recycling receptors: The round-trip itinerary of migrant membrane proteins; *Cell* **1983**, *32*, 663–667.
- [81] A. Dautry-Varsat; Receptor-mediated endocytosis: The intracellular journey of transferrin and its receptor; *Biochimie* **1986**, *68*, 375–381.
- [82] T. Onizuka, H. Shimizu, Y. Moriwaki, T. Nakano, S. Kanai, I. Shimada, H. Takahashi; NMR study of ligand release from asialoglycoprotein receptor under solution conditions in early endosomes; *FEBS J.* **2012**, *279*, 2645–2656.
- [83] J. P. Luzio, P. R. Pryor, N. A. Bright; Lysosomes: fusion and function; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 622–632.
- [84] M. R. Alam, X. Ming, V. Dixit, M. Fisher, X. Chen, R. L. Juliano; The Biological Effect of an Antisense Oligonucleotide Depends on Its Route of Endocytosis and Trafficking; *Oligonucleotides* **2010**, *20*, 103–109.
- [85] J. Gilleron, W. Querbes, A. Zeigerer, A. Borodovsky, G. Marsico, U. Schubert, K. Manygoats, S. Seifert, C. Andree, M. Stöter, et al.; Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape; *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 638–646.
- [86] G. Sahay, W. Querbes, C. Alabi, A. Eltoukhy, S. Sarkar, C. Zurenko, E. Karagiannis, K. Love, D. Chen, R. Zoncu, et al.; Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling; *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 653–658.

- [87] S. Lindberg, J. Regberg, J. Eriksson, H. Helmfors, A. Muñoz-Alarcón, A. Srimanee, R. A. Figueroa, E. Hallberg, K. Ezzat, Ü. Langel; A convergent uptake route for peptide- and polymer-based nucleotide delivery systems; *J Control. Release* **2015**, *206*, 58–66.
- [88] F. Said Hassane, R. Abes, S. EL Andaloussi, T. Lehto, R. Sillard, Ü. Langel, B. Lebleu; Insights into the cellular trafficking of splice redirecting oligonucleotides complexed with chemically modified cell-penetrating peptides; *J. Controlled Release* **2011**, *153*, 163–172.
- [89] Z. U. Rehman, D. Hoekstra, I. S. Zuhorn; Mechanism of Polyplex- and Lipoplex-Mediated Delivery of Nucleic Acids: Real-Time Visualization of Transient Membrane Destabilization without Endosomal Lysis; *ACS Nano* **2013**, *7*, 3767–3777.
- [90] I. M. S. Degors, C. Wang, Z. U. Rehman, I. S. Zuhorn; Carriers Break Barriers in Drug Delivery: Endocytosis and Endosomal Escape of Gene Delivery Vectors; *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 1750–1760.
- [91] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan; Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery; *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 100–109.
- [92] A. Buntz, T. Killian, D. Schmid, H. Seul, U. Brinkmann, J. Ravn, M. Lindholm, H. Knoetgen, V. Haucke, O. Mundigl; Quantitative fluorescence imaging determines the absolute number of locked nucleic acid oligonucleotides needed for suppression of target gene expression; *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 953–969.
- [93] V. Bitsikas, I. R. Corrêa, B. J. Nichols; Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux; *E Life* **2014**, *3*, 1–26.
- [94] M. Kaksonen, A. Roux; Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 313–326.
- [95] J. E. Hinshaw; Dynamin and Its Role in Membrane Fission; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**, *16*, 483–519.
- [96] A. Roux, K. Uyhazi, A. Frost, P. De Camilli; GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission; *Nature* **2006**, *441*, 528–531.
- [97] A. H. Hutagalung, P. J. Novick; Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology; *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 119–149.
- [98] H. Stenmark; Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 513–525.
- [99] T. M. Witkos, M. Lowe; Recognition and tethering of transport vesicles at the Golgi apparatus; *Curr. Opin. Cell Biol.* **2017**, *47*, 16–23.
- [100] D. Kümmel, C. Ungermann; Principles of membrane tethering and fusion in endosome and lysosome biogenesis; *Curr. Opin. Cell Biol.* **2014**, *29*, 61–66.
- [101] Z. U. Rehman, D. Hoekstra, I. S. Zuhorn; Protein kinase A inhibition modulates the intracellular routing of gene delivery vehicles in HeLa cells, leading to productive transfection; *J. Controlled Release* **2011**, *156*, 76–84.
- [102] X. Liang, H. Sun, C.-W. Hsu, J. G. Nichols, T. A. Vickers, C. L. De Hoyos, S. T. Crooke; Golgi-endosome transport mediated by M6PR facilitates release of antisense oligonucleotides from endosomes; *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 1372–1391.
- [103] L. Johannes, V. Popoff; Tracing the Retrograde Route in Protein Trafficking; *Cell* **2008**, *135*, 1175–1187.

- [104] T. Wang, E. A. Smith, E. R. Chapman, J. C. Weisshaar; Lipid Mixing and Content Release in Single-Vesicle, SNARE-Driven Fusion Assay with 1–5 ms Resolution; *Biophys. J.* **2009**, *96*, 4122–4131.
- [105] O. Schmidt, D. Teis; The ESCRT machinery; *Curr. Biol.* **2012**, *22*, 116–120.
- [106] W. M. Henne, H. Stenmark, S. D. Emr; Molecular Mechanisms of the Membrane Sculpting ESCRT Pathway; *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, 1–13.
- [107] C. Bissig, J. Gruenberg; ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland; *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 19–25.
- [108] B. D. Cullis, P.R and Kruijff; Lipid polymorphism and the functional Roles of Lipids in; *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *40*, 127–144.
- [109] M. R. Alam, V. Dixit, H. Kang, Z.-B. Li, X. Chen, J. Trejo, M. Fisher, R. L. Juliano; Intracellular delivery of an anionic antisense oligonucleotide via receptor-mediated endocytosis; *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 2764–2776.
- [110] S. Ly, D. M. Navaroli, M.-C. Didiot, J. Cardia, L. Pandarinathan, J. F. Alterman, K. Fogarty, C. Standley, L. M. Lifshitz, K. D. Bellve, et al.; Visualization of self-delivering hydrophobically modified siRNA cellular internalization; *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 15–25.
- [111] V. K. Sharma, P. Rungta, A. K. Prasad; Nucleic acid therapeutics: basic concepts and recent developments; *RSC Adv.* **2014**, *4*, 16618–16631.
- [112] K. Dhuri, C. Bechtold, E. Quijano, H. Pham, A. Gupta, A. Vikram, R. Bahal; Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development; *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2004.
- [113] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney; Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
- [114] R. Juliano, J. Bauman, H. Kang, X. Ming; Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA Oligonucleotides; *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 686–695.
- [115] R. S. Geary, D. Norris, R. Yu, C. F. Bennett; Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *87*, 46–51.
- [116] C. Godfrey, L. R. Desviat, B. Smedsrød, F. Piétri-Rouxel, M. A. Denti, P. Disterer, S. Lorain, G. Nogales-Gadea, V. Sardone, R. Anwar, et al.; Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies; *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 545–557.
- [117] R. L. Juliano; The delivery of therapeutic oligonucleotides; *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 6518–6548.
- [118] T. P. Prakash; An Overview of Sugar-Modified Oligonucleotides for Antisense Therapeutics; *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 1616–1641.
- [119] J. H. P. Chan, S. Lim, W. S. F. Wong; Antisense oligonucleotides: From design to therapeutic application; *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *33*, 533–540.
- [120] S. Venna, F. Eckstein; Modified oligonucleotides: Synthesis and strategy for users; *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 99–134.
- [121] W. B. Wan, P. P. Seth; The Medicinal Chemistry of Therapeutic Oligonucleotides; *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9645–9667.



- [122] K. W. Knouse, J. N. DeGruyter, M. A. Schmidt, B. Zheng, J. C. Vantourout, C. Kingston, S. E. Mercer, I. M. McDonald, R. E. Olson, Y. Zhu, et al.; Unlocking P(V): Reagents for chiral phosphorothioate synthesis; *Science* **2018**, *361*, 1234–1238.
- [123] W. B. Wan, M. T. Migawa, G. Vasquez, H. M. Murray, J. G. Nichols, H. Gaus, A. Berdeja, S. Lee, C. E. Hart, W. F. Lima, et al.; Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages; *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 13456–13468.
- [124] S. K. Srinivasan, H. K. Tewary, P. L. Iversen; Characterization of Binding Sites, Extent of Binding, and Drug Interactions of Oligonucleotides with Albumin; *Antisense Res. Dev.* **1995**, *5*, 131–139.
- [125] X.-H. Liang, W. Shen, H. Sun, G. A. Kinberger, T. P. Prakash, J. G. Nichols, S. T. Crooke; Hsp90 protein interacts with phosphorothioate oligonucleotides containing hydrophobic 2'-modifications and enhances antisense activity; *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 3892–3907.
- [126] S. Agrawal, J. Tamsamani, J. Y. Tang; Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7595–7599.
- [127] T. Iannitti, J. Morales-Medina, B. Palmieri; Phosphorothioate Oligonucleotides: Effectiveness and Toxicity; *Curr. Drug Targets* **2014**, *15*, 663–673.
- [128] H. S. Soifer, T. Koch, J. Lai, B. Hansen, A. Hoeg, H. Oerum, C. A. Stein; in *Methods Mol. Biol.*, **2012**, pp. 333–346.
- [129] H. Sands, L. J. Gorey-Feret, A. J. Cocuzza, F. W. Hobbs, D. Chidester, G. L. Trainor; Biodistribution and metabolism of internally 3H-labeled oligonucleotides. I. Comparison of a phosphodiester and a phosphorothioate.; *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 932–943.
- [130] L. Wang, S. Chen, T. Xu, K. Taghizadeh, J. S. Wishnok, X. Zhou, D. You, Z. Deng, P. C. Dedon; Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes; *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 709–710.
- [131] A. M. Krieg, A. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, D. M. Klinman; CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation; *Nature* **1995**, *374*, 546–549.
- [132] A. M. Krieg; CpG Still Rocks! Update on an Accidental Drug; *Nucleic Acid Ther.* **2012**, *22*, 77–89.
- [133] B. J. Chiasson, J. N. Armstrong, M. L. Hooper, P. R. Murphy, H. A. Robertson; The application of antisense oligonucleotide technology to the brain: Some pitfalls; *Cell. Mol. Neurobiol.* **1994**, *14*, 507–521.
- [134] B. P. Monia, E. A. Lesnik, C. Gonzalez, W. F. Lima, D. McGee, C. J. Guinasso, A. M. Kawasaki, P. D. Cook, S. M. Freier; Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression; *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 14514–14522.
- [135] P. Martin; Ein neuer Zugang zu 2'-O-Alkylribonucleosiden und Eigenschaften deren Oligonucleotide; *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 486–504.
- [136] M. Egli, G. Minasov, V. Tereshko, P. S. Pallan, M. Teplova, G. B. Inamati, E. A. Lesnik, S. R. Owens, B. S. Ross, T. P. Prakash, et al.; Probing the influence of stereoelectronic effects on the biophysical properties of oligonucleotides;

- Comprehensive analysis of the RNA affinity, nuclease resistance, and crystal structure of ten 2'-O-ribonucleic acid modifications; *Biochemistry* **2005**, *44*, 9045–9057.
- [137] M. Teplova, G. Minasov, V. Tereshko, G. B. Inamati, P. D. Cook, M. Manoharan, M. Egli; Crystal structure and improved antisense properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-RNA; *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 535–539.
- [138] V. Tereshko, S. Portmann, E. C. Tay, P. Martin, F. Natt, K.-H. Altmann, M. Egli; Correlating Structure and Stability of DNA Duplexes with Incorporated 2'-O-Modified RNA Analogues; *Biochemistry* **1998**, *37*, 10626–10634.
- [139] S. Freier; The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes; *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4429–4443.
- [140] P. S. Pallan, C. R. Allerson, A. Berdeja, P. P. Seth, E. E. Swayze, T. P. Prakash, M. Egli; Structure and nuclease resistance of 2',4'-constrained 2'-O-methoxyethyl (cMOE) and 2'-O-ethyl (cEt) modified DNAs; *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8195–8197.
- [141] K.-H. Altmann, D. Fabbro, N. M. Dean, T. Geiger, B. P. Monia, M. Müllert, P. Nicklin; Second-generation antisense oligonucleotides: structure—activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors; *Biochem. Soc. Trans.* **1996**, *24*, 630–637.
- [142] S. Agrawal, J. Tamsamani, W. Galbraith, J. Tang; Pharmacokinetics of Antisense Oligonucleotides; *Clin. Pharmacokinet.* **1995**, *28*, 7–16.
- [143] S. T. Crooke; *Antisense Drug Technology : Principles, Strategies, and Applications*, CRC Press, Boca Raton, **2008**.
- [144] D. V Morrissey, J. A. Lockridge, L. Shaw, K. Blanchard, K. Jensen, W. Breen, K. Hartsough, L. Machemer, S. Radka, V. Jadhav, et al.; Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs; *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1002–1007.
- [145] N. Martin-Pintado, G. F. Deleavey, G. Portella, R. Campos-Olivas, M. Orozco, M. J. Damha, C. González; Backbone FC-H···O Hydrogen Bonds in 2'-F-Substituted Nucleic Acids; *Angew. Chem Int. Ed.* **2013**, *52*, 12065–12068.
- [146] P. S. Pallan, E. M. Greene, P. A. Jicman, R. K. Pandey, M. Manoharan, E. Rozners, M. Egli; Unexpected origins of the enhanced pairing affinity of 2'-fluoro-modified RNA; *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 3482–3495.
- [147] A. M. Kawasaki, M. D. Casper, S. M. Freier, E. A. Lesnik, M. C. Zounes, L. L. Cummins, C. Gonzalez, P. D. Cook; Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro-phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets; *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 831–841.
- [148] M. Manoharan, A. Akinc, R. K. Pandey, J. Qin, P. Hadwiger, M. John, K. Mills, K. Charisse, M. A. Maier, L. Nechev, et al.; Unique Gene-Silencing and Structural Properties of 2'-Fluoro-Modified siRNAs; *Angew. Chem Int. Ed.* **2011**, *50*, 2284–2288.
- [149] W. Shen, C. L. De Hoyos, H. Sun, T. A. Vickers, X. Liang, S. T. Crooke; Acute hepatotoxicity of 2' fluoro-modified 5–10–5 gapmer phosphorothioate oligonucleotides in mice correlates with intracellular protein binding and the loss of DBHS proteins; *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 2204–2217.

- [150] W. Shen, X. Liang, H. Sun, S. T. Crooke; 2'-Fluoro-modified phosphorothioate oligonucleotide can cause rapid degradation of P54nrb and PSF; *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 4569–4578.
- [151] C. R. Allerson, N. Sioufi, R. Jarres, T. P. Prakash, N. Naik, A. Berdeja, L. Wanders, R. H. Griffey, E. E. Swayze, B. Bhat; Fully 2'-Modified Oligonucleotide Duplexes with Improved in Vitro Potency and Stability Compared to Unmodified Small Interfering RNA; *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 901–904.
- [152] J. Summerton, D. Weller; Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 187–195.
- [153] X.-L. Zhao, B.-C. Chen, J.-C. Han, L. Wei, X.-B. Pan; Delivery of cell-penetrating peptide-peptide nucleic acid conjugates by assembly on an oligonucleotide scaffold; *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17640.
- [154] A. Gupta, A. Mishra, N. Puri; Peptide nucleic acids: Advanced tools for biomedical applications; *J. Biotechnol.* **2017**, *259*, 148–159.
- [155] B. Froehler, P. Ng, M. Matteucci; Phosphoramidate analogues of DNA: Synthesis and thermal stability of heteroduplexes; *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4831–4839.
- [156] J. Summerton; Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type; *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 141–158.
- [157] J. D. Moulton; Guide for Morpholino Users: Toward Therapeutics; *J. Drug Discov. Dev. Deliv.* **2016**, *3*, 1023–1035.
- [158] J. Moulton, S. Jiang; Gene Knockdowns in Adult Animals: PPMOs and Vivo-Morpholinos; *Molecules* **2009**, *14*, 1304–1323.
- [159] R. M. Hudziak, E. Barofsky, D. F. Barofsky, D. L. Weller, S. Ben Huang, D. D. Weller; Resistance of Morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1996**, *6*, 267–272.
- [160] P. R. Clemens, V. K. Rao, A. M. Connolly, A. D. Harper, J. K. Mah, E. C. Smith, C. M. McDonald, C. M. Zaidman, L. P. Morgenroth, H. Osaki, et al.; Safety, Tolerability, and Efficacy of Viltolarsen in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 53 Skipping; *JAMA Neurol.* **2020**, *77*, 982.
- [161] H. M. Viola, V. P. A. Johnstone, A. M. Adams, S. Fletcher, L. C. Hool; A Morpholino Oligomer Therapy Regime That Restores Mitochondrial Function and Prevents mdx Cardiomyopathy; *JACC Basic Transl. Sci.* **2018**, *3*, 391–402.
- [162] A. Amantana, H. M. Moulton, M. L. Cate, M. T. Reddy, T. Whitehead, J. N. Hassinger, D. S. Youngblood, P. L. Iversen; Pharmacokinetics, Biodistribution, Stability and Toxicity of a Cell-Penetrating Peptide–Morpholino Oligomer Conjugate; *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1325–1331.
- [163] Y. Nan, Y.-J. Zhang; Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers as Novel Antiviral Compounds; *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–15.
- [164] T. S. Deas, C. J. Bennett, S. A. Jones, M. Tilgner, P. Ren, M. J. Behr, D. A. Stein, P. L. Iversen, L. D. Kramer, K. A. Bernard, et al.; In Vitro Resistance Selection and In Vivo Efficacy of Morpholino Oligomers against West Nile Virus; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 2470–2482.
- [165] M. A. Campbell, J. Wengel; Locked vs. unlocked nucleic acids (LNA vs. UNA): contrasting structures work towards common therapeutic goals; *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5680.

- [166] J. Plavec, C. Thibaudeau, J. Chattopadhyaya; How Does the 2'-Hydroxy Group Drive the Pseudorotational Equilibrium in Nucleoside and Nucleotide by the Tuning of the 3'-Gauche Effect?; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6558–6560.
- [167] S. K. Singh, A. A. Koshkin, J. Wengel, P. Nielsen; LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition; *Chem. Commun.* **1998**, 455–456.
- [168] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel; LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition; *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607–3630.
- [169] M. Frieden, H. F. Hansen, T. Koch; Nuclease Stability of LNA Oligonucleotides and LNA-DNA Chimeras; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1041–1043.
- [170] C. A. Stein, J. B. Hansen, J. Lai, S. Wu, A. Voskresenskiy, A. Høg, J. Worm, M. Hedtjärn, N. Souleimanian, P. Miller, et al.; Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents; *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e3–e3.
- [171] J. P. Bost, H. Barriga, M. N. Holme, A. Gallud, M. Maugeri, D. Gupta, T. Lehto, H. Valadi, E. K. Esbjörner, M. M. Stevens, et al.; Delivery of Oligonucleotide Therapeutics: Chemical Modifications, Lipid Nanoparticles, and Extracellular Vesicles; *ACS Nano* **2021**, *15*, 13993–14021.
- [172] A. Goodchild, N. Nopper, A. King, T. Doan, M. Tanudji, G. M. Arndt, M. Poidinger, L. P. Rivory, T. Passioura; Sequence determinants of innate immune activation by short interfering RNAs; *BMC Immunol.* **2009**, *10*, 40–53.
- [173] M. E. G. Cantafio, B. S. Nielsen, C. Mignogna, M. Arbitrio, C. Botta, N. M. Frandsen, C. Rolfo, P. Tagliaferri, P. Tassone, M. T. Di Martino; Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a 13-mer LNA-inhibitor-miR-221 in mice and non-human primates; *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2016**, *5*, e326.
- [174] P. H. Hagedorn, V. Yakimov, S. Ottosen, S. Kammler, N. F. Nielsen, A. M. Høg, M. Hedtjärn, M. Meldgaard, M. R. Møller, H. Ørum, et al.; Hepatotoxic Potential of Therapeutic Oligonucleotides Can Be Predicted from Their Sequence and Modification Pattern; *Nucleic Acid Ther.* **2013**, *23*, 302–310.
- [175] K. Sipa, E. Sochacka, J. Kazmierczak-Baranska, M. Maszewska, M. Janicka, G. Nowak, B. Nawrot; Effect of base modifications on structure, thermodynamic stability, and gene silencing activity of short interfering RNA; *RNA* **2007**, *13*, 1301–1316.
- [176] J. B. Bramsen, M. B. Laursen, A. F. Nielsen, T. B. Hansen, C. Bus, N. Langkjær, B. R. Babu, T. Højland, M. Abramov, A. Van Aerschot, et al.; A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity; *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 2867–2881.
- [177] P. Herdewijn; Heterocyclic Modifications of Oligonucleotides and Antisense Technology; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, *10*, 297–310.
- [178] H. Peacock, A. Kannan, P. A. Beal, C. J. Burrows; Chemical Modification of siRNA Bases To Probe and Enhance RNA Interference; *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7295–7300.

- [179] J. A. Theruvathu, Y. W. Yin, B. M. Pettitt, L. C. Sowers; Comparison of the Structural and Dynamic Effects of 5-Methylcytosine and 5-Chlorocytosine in a CpG Dinucleotide Sequence; *Biochemistry* **2013**, *52*, 8590–8598.
- [180] M. Terrazas, E. T. Kool; RNA major groove modifications improve siRNA stability and biological activity; *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 346–353.
- [181] K. J. Fryxell, E. Zuckerkandl; Cytosine Deamination Plays a Primary Role in the Evolution of Mammalian Isochores; *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17*, 1371–1383.
- [182] J. Goodchild; Conjugates of oligonucleotides and modified oligonucleotides: a review of their synthesis and properties; *Bioconjug. Chem.* **1990**, *1*, 165–187.
- [183] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers; Synthesis of Deoxyoligonucleotides on a Polymer Support; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3185–3191.
- [184] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers; Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis; *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862.
- [185] N. D. Sinha, J. Biernat, H. Köster;  $\beta$ -Cyanoethyl N,N-dialkylamino/N-morpholinomonochloro phosphoramidites, new phosphitylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides; *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5843–5846.
- [186] T. Tanaka, S. Tamatsukuri, M. Ikehara; Synthesis and properties of phosphoramidite derivatives of modified nucleosides.; *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1986**, *34*, 2044–2048.
- [187] A. F. Sandahl, T. J. D. Nguyen, R. A. Hansen, M. B. Johansen, T. Skrydstrup, K. V. Gothelf; On-demand synthesis of phosphoramidites; *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1–15.
- [188] C. Schwechheimer, L. Doll, H. Wagenknecht; Synthesis of Dye-Modified Oligonucleotides via Copper(I)-Catalyzed Alkyne Azide Cycloaddition Using On- and Off-Bead Approaches; *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2018**, *72*, 4.80.1-4.80.13.
- [189] U. Asseline, E. Bonfils, D. Dupret, N. T. Thuong; Synthesis and Binding Properties of Oligonucleotides Covalently Linked to an Acridine Derivative: New Study of the Influence of the Dye Attachment Site; *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7*, 369–379.
- [190] N. T. Thuong, U. Asseline; Modification of the 5' Terminus of Oligonucleotides for Attachment of Reporter and Conjugate Groups; *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2000**, 4.2.1-4.2.33.
- [191] I. Singh, C. Freeman, F. Heaney; Efficient synthesis of DNA conjugates by strain-promoted azide-cyclooctyne cycloaddition in the solid phase; *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 6739–6746.
- [192] I. Singh, F. Heaney; Solid phase strain promoted “click” modification of DNA via [3+2]-nitrile oxide–cyclooctyne cycloadditions; *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2706–2708.
- [193] K. Brunner, J. Harder, T. Halbach, J. Willibald, F. Spada, F. Gnerlich, K. Sparrer, A. Beil, L. Möckl, C. Bräuchle, et al.; Cell-Penetrating and Neurotargeting Dendritic siRNA Nanostructures; *Angew. Chem Int. Ed.* **2015**, *54*, 1946–1949.
- [194] F. Isis, R. F. Azad, K. P. Anderson, G. B. Mulamba; Human Cytomegalovirus Mutant with Sequence-Dependent Resistance to the Phosphorothioate Oligonucleotide; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 971–973.

- [195] G. S. Hayward; The Major Immediate-Early Proteins IE1 and IE2 of Human Cytomegalovirus Colocalize with and Disrupt PML-Associated Nuclear Bodies at Very Early Times in Infected Permissive Cells; *1997*, *71*, 4599–4613.
- [196] Bundesministerium für Gesundheit; “Seltene Erkrankungen”; <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/seltene-erkrankungen.html>; Stand: 06.10.2022.
- [197] Deutsches Krebsforschungszentrum; “Krebsstatistiken: So häufig ist Krebs in Deutschland”; <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/grundlagen/krebsstatistiken.php>; Stand: 06.10.2022.
- [198] D. Hanahan, R. A. Weinberg; Hallmarks of cancer: The next generation; *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- [199] J. C. Reed; Warner-Lambert/Parke Davis award lecture: Mechanisms of apoptosis; *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 1415–1430.
- [200] H. J. Chae, J. S. Kang, J. O. Byun, K. S. Han, D. U. Kim, S. M. Oh, H. M. Kim, S. W. Chae, H. R. Kim; Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts; *Pharmacol. Res.* **2000**, *42*, 373–381.
- [201] S. J. Korsmeyer; BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death; *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1693–1700.
- [202] H. Xiang, E. J. Noonan, J. Wang, H. Duan, L. Ma, S. Michie, L. M. Boxer; The immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancers induce Bcl2 deregulation and lymphomagenesis in murine B cells; *Leukemia* **2011**, *25*, 1484–1493.
- [203] M. Adachi, J. Cossman, D. Longo, C. M. Croce, Y. Tsujimoto; Variant translocation of the bcl-2 gene to immunoglobulin lambda light chain gene in chronic lymphocytic leukemia.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86*, 2771–2774.
- [204] J. C. Reed; Dysregulation of apoptosis in cancer; *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 2941–2953.
- [205] Q. Li, L. Cheng, K. Shen, H. Jin, H. Li, Y. Cheng, X. Ma; Efficacy and Safety of Bcl-2 Inhibitor Venetoclax in Hematological Malignancy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials; *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1–12.
- [206] T. Büchele; Proapoptotische Therapie mit Oblimersen (bcl-2-Antisense-Oligonucleotid) – Übersicht über präklinische und klinische Daten; *Oncol. Res. Treat.* **2003**, *26*, 60–69.
- [207] C. V. Dang, E. P. Reddy, K. M. Shokat, L. Soucek; Drugging the “undruggable” cancer targets; *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 502–508.
- [208] J. C. Reed, S. Yum, C. Stein, C. Subasinghe, J. Cohen, S. Haldar, C. M. Croce; Antisense-mediated Inhibition of BCL2 Protooncogene Expression and Leukemic Cell Growth and Survival: Comparisons of Phosphodiester and Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides; *Cancer Res.* **1990**, *50*, 6565–6570.
- [209] A. Ziegler, G. H. Luedke, R. A. Stahel, U. Zangemeister-Wittke, D. Fabbro, K.-H. Altmann; Induction of Apoptosis in Small-Cell Lung Cancer Cells by an Antisense Oligodeoxynucleotide Targeting the Bcl-2 Coding Sequence; *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, *89*, 1027–1036.
- [210] U. Zangemeister-Wittke, T. Schenker, G. Luedke, R. Stahel; Synergistic cytotoxicity of bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides and etoposide, doxorubicin and cisplatin on small-cell lung cancer cell lines; *Br. J. Cancer* **1998**, *78*, 1035–1042.

- [211] U. Zangemeister-Wittke, S. H. Leech, R. A. Olie, A. P. Simões-Wüst, O. Gautschi, G. H. Luedke, F. Natt, R. Häner, P. Martin, J. Hall, et al.; A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells.; *Am. Assoc. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2547–2555.
- [212] O. Gautschi, S. Tschopp, R. A. Olie, S. H. Leech, A. P. Simoes-Wust, A. Ziegler, B. Baumann, B. Odermatt, J. Hall, R. A. Stahel, et al.; Activity of a Novel bcl-2/bcl-xL-Bispecific Antisense Oligonucleotide Against Tumors of Diverse Histologic Origins; *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 463–471.
- [213] A. P. Simões-Wüst, S. Hopkins-Donaldson, B. Sigrist, L. Belyanskaya, R. A. Stahel, U. Zangemeister-Wittke; A Functionally Improved Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotide Inhibits Bcl-2 and Bcl-xL Expression and Facilitates Tumor Cell Apoptosis; *Oligonucleotides* **2004**, *14*, 199–209.
- [214] R. J. Klasa, A. M. Gillum, R. E. Klem, S. R. Frankel; Oblimersen Bcl-2 antisense: Facilitating apoptosis in anticancer treatment; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12*, 193–213.
- [215] Adis; Oblimersen; *Drugs R. D.* **2007**, *8*, 321–334.
- [216] S. Kitada, T. Miyashita, S. Tanaka, J. C. Reed; Investigations of Antisense Oligonucleotides Targeted Against bcl-2 RNAs; *Antisense Res. Dev.* **1993**, *3*, 157–169.
- [217] “ClinicalTrials.gov”; <https://clinicaltrials.gov>; Stand: 06.10.2022
- [218] N. Dias, C. A. Stein; Potential roles of antisense oligonucleotides in cancer therapy. The example of Bcl-2 antisense oligonucleotides; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *54*, 263–269.
- [219] A. R. Walker, G. Marcucci, J. Yin, W. Blum, W. Stock, J. Kohlschmidt, K. Mrózek, A. J. Carroll, A.-K. Eifeld, E. S. Wang, et al.; Phase 3 randomized trial of chemotherapy with or without oblimersen in older AML patients: CALGB 10201 (Alliance); *Blood Adv.* **2021**, *5*, 2775–2787.
- [220] S. Frantz; Lessons learnt from Genasense’s failure; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 542–542.
- [221] M. Gagliardi, A. T. Ashizawa; Making Sense of Antisense Oligonucleotide Therapeutics Targeting Bcl-2; *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1–18.
- [222] C. A. Stein, J. B. Hansen, J. Lai, S. Wu, A. Voskresenskiy, A. Høg, J. Worm, M. Hedtjärn, N. Souleimanian, P. Miller, et al.; Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents; *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 1–8.
- [223] J. Dürig, U. Dührsen, L. Klein-Hitpass, J. Worm, J. B. R. Hansen, H. Ørum, M. Wisenbach; The novel antisense Bcl-2 inhibitor SPC2996 causes rapid leukemic cell clearance and immune activation in chronic lymphocytic leukemia; *Leukemia* **2011**, *25*, 638–647.
- [224] M. Dampmann, A. Görgens, M. Möllmann, F. Murke, U. Dührsen, B. Giebel, J. Dürig; CpG stimulation of chronic lymphocytic leukemia cells induces a polarized cell shape and promotes migration in vitro and in vivo; *PLOS ONE* **2020**, *15*, 1–13.
- [225] A. S. Ebrahim, M. Kandouz, A. Liddane, H. Sabbagh, Y. Hou, C. Li, A. Al-Katib; PNT2258, a novel deoxyribonucleic acid inhibitor, induces cell cycle arrest and apoptosis via a distinct mechanism of action: a new class of drug for non-Hodgkin’s lymphoma; *Oncotarget* **2106**, *7*, 42374–42384.

- [226] W. V. Rodriguez, M. J. Woolliscroft, A.-S. Ebrahim, R. Forgey, P. J. McGovern, G. Endert, A. Wagner, D. Holewa, A. Aboukameel, R. D. Gill, et al.; Development and antitumor activity of a BCL-2 targeted single-stranded DNA oligonucleotide; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2014**, *74*, 151–166.
- [227] A. W. Tolcher, W. V. Rodriguez, D. W. Rasco, A. Patnaik, K. P. Papadopoulos, A. Amaya, T. D. Moore, S. K. Gaylor, C. L. Bisgaier, M. P. Sooch, et al.; A phase 1 study of the BCL2-targeted deoxyribonucleic acid inhibitor (DNAi) PNT2258 in patients with advanced solid tumors; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2014**, *73*, 363–371.
- [228] W. Harb, N. J. Lakhani, R. Messmann, B. Klencke, A. M. Al-Katib; A Phase 2 Study of PNT2258 for Treatment of Relapsed or Refractory B-Cell Malignancies; *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2021**, *21*, 823–830.
- [229] M. Konopleva, A. M. Tari, Z. Estrov, D. Harris, Z. Xie, S. Zhao, G. López-Berestein, M. Andreeff; Liposomal Bcl-2 antisense oligonucleotides enhance proliferation, sensitize acute myeloid leukemia to cytosine-arabioside, and induce apoptosis independent of other antiapoptotic proteins; *Blood* **2000**, *95*, 3929–3938.
- [230] A. Roca-Portoles, G. Rodriguez-Blanco, D. Sumpton, C. Cloix, M. Mullin, G. M. Mackay, K. O'Neill, L. Lemgruber, X. Luo, S. W. G. Tait; Venetoclax causes metabolic reprogramming independent of BCL-2 inhibition; *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 616.
- [231] R. Nahta, F. J. Esteva; Bcl-2 Antisense Oligonucleotides: A Potential Novel Strategy for the Treatment of Breast Cancer; *Semin. Oncol.* **2003**, *30*, 143–149.
- [232] A. H. Taylor, J. H. Pringle, S. C. Bell, F. Al-Azzawi; Specific inhibition of estrogen receptor alpha function by antisense oligodeoxyribonucleotides; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2001**, *11*, 219–231.
- [233] K. N. Chi, A. E. Wallis, C. H. Lee, D. L. De Menezes, J. Sartor, W. H. Dragowska, L. D. Mayer; Effects of Bcl-2 modulation with G3139 antisense oligonucleotide on human breast cancer cells are independent of inherent Bcl-2 protein expression; *Breast Cancer Res. Treat.* **2000**, *63*, 199–212.
- [234] Stiftung Deutsche Krebshilfe; *Die Blauen Ratgeber - Brustkrebs*, Bonn, **2019**.
- [235] J. Neumaier; Nach dem Brustkrebs leidet das Herz; *InFo Hämatol. Onkol.* **2021**, *24*, 42–42.
- [236] R. Koch-Institut; “Krebs - Kurzbeiträge - Altersstandardisierte Krebssterblichkeit ging auch 2020 weiter zurück”; [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Kurzbeitraege/Archiv2021/2021\\_6\\_Todesursachenstatistik\\_krebssterblichkeit.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Kurzbeitraege/Archiv2021/2021_6_Todesursachenstatistik_krebssterblichkeit.html); Stand: 06.10.2022.
- [237] C. M. Perou, T. Sørlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, et al.; Molecular portraits of human breast tumours; *Nature* **2000**, *406*, 747–752.
- [238] V. C. Jordan, A. M. H. Brodie; Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer; *Steroids* **2007**, *72*, 7–25.
- [239] A. U. Buzdar, J. F. R. Robertson, W. Eiermann, J. M. Nabholz; An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane; *Cancer* **2002**, *95*, 2006–2016.



- [240] A. U. Buzdar, J. F. R. Robertson; Fulvestrant: Pharmacologic Profile Versus Existing Endocrine Agents for the Treatment of Breast Cancer; *Ann. Pharmacother.* **2006**, *40*, 1572–1583.
- [241] C. K. Osborne, H. (Holly) Zhao, S. A. W. Fuqua; Selective Estrogen Receptor Modulators: Structure, Function, and Clinical Use; *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 3172–3186.
- [242] V. Sini, S. Cinieri, P. Conte, M. De Laurentiis, A. Di Leo, C. Tondini, P. Marchetti; Endocrine therapy in post-menopausal women with metastatic breast cancer: From literature and guidelines to clinical practice; *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *100*, 57–68.
- [243] K. Enomoto, K. Kikuchi, H. Koyama; Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials; *The Lancet* **2011**, *378*, 771–784.
- [244] K. Morito, T. Hirose, J. Kinjo, T. Hirakawa, M. Okawa, T. Nohara, S. Ogawa, S. Inoue, M. Muramatsu, Y. Masamune; Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ ; *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24*, 351–356.
- [245] Z.-Y. Wang, L. Yin; Estrogen receptor alpha-36 (ER- $\alpha$ 36): A new player in human breast cancer; *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *418*, 193–206.
- [246] E. R. Prossnitz, J. B. Arterburn, L. A. Sklar; GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen; *Mol. Cell. Endocrinol.* **2007**, *265–266*, 138–142.
- [247] C. S. Weißenborn; Dissertation "Der G - Protein Gekoppelte Östrogenrezeptor Als Tumorsuppressor Im Mammakarzinom", Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, **2017**.
- [248] L. Li, Q. Wang, X. Lv, L. Sha, H. Qin, L. Wang, L. Li; Expression and Localization of Estrogen Receptor in Human Breast Cancer and Its Clinical Significance; *Cell Biochem. Biophys.* **2015**, *71*, 63–68.
- [249] N. Heldring, A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Ström, E. Treuter, M. Warner, et al.; Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets; *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 905–931.
- [250] P. J. Burke, T. H. Koch; Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Doxorubicin-Formaldehyde Conjugates Targeted to Breast Cancer Cells; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1193–1206.
- [251] S. Catalano, C. Giordano, S. Panza, F. Chemi, D. Bonofiglio, M. Lanzino, P. Rizza, F. Romeo, S. A. W. Fuqua, M. Maggiolini, et al.; Tamoxifen through GPER upregulates aromatase expression: a novel mechanism sustaining tamoxifen-resistant breast cancer cell growth; *Breast Cancer Res. Treat.* **2014**, *146*, 273–285.
- [252] E. R. Prossnitz, J. B. Arterburn; International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVII. G Protein-Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators; *Pharmacol. Rev.* **2015**, *67*, 505–540.
- [253] N. Heldring, T. Pawson, D. McDonnell, E. Treuter, J.-Å. Gustafsson, A. C. W. Pike; Structural Insights into Corepressor Recognition by Antagonist-bound Estrogen Receptors; *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 10449–10455.
- [254] G. J. Parker, T. L. Law, F. J. Lench, R. E. Bolger; Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: Nuclear receptor-ligand-binding and kinase/phosphatase assays; *J. Biomol. Screen.* **2000**, *5*, 77–88.

- [255] M. D. Johnson, H. Zuo, K. H. Lee, J. P. Trebley, J. M. Rae, R. V. Weatherman, Z. Desta, D. A. Flockhart, T. C. Skaar; Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen; *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *85*, 151–159.
- [256] M. Nichols; Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists; *EMBO J.* **1998**, *17*, 765–773.
- [257] I. Marczell, P. Balogh, G. Nyiro, A. L. Kiss, B. Kovacs, G. Bekesi, K. Racz, A. Patocs; Membrane-bound estrogen receptor alpha initiated signaling is dynamin dependent in breast cancer cells; *Eur. J. Med. Res.* **2018**, *23*, 1–10.
- [258] G. Bondar, J. Kuo, N. Hamid, P. Micevych; Estradiol-Induced Estrogen Receptor- Trafficking; *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 15323–15330.
- [259] E. C. Dreaden, S. C. Mwakwari, Q. H. Sodji, A. K. Oyelere, M. A. El-Sayed; Tamoxifen-Poly(ethylene glycol)-Thiol Gold Nanoparticle Conjugates: Enhanced Potency and Selective Delivery for Breast Cancer Treatment; *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 2247–2253.
- [260] S. Safe; Age-Dependent Changes in Breast Cancer Hormone Receptors and Oxidant Stress Markers; *Vitam. Horm.*, **2001**, pp. 231–252.
- [261] P. J. Kushner, D. A. Agard, G. L. Greene, T. S. Scanlan, A. K. Shiau, R. M. Uht, P. Webb; Estrogen receptor pathways to AP-1; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *74*, 311–317.
- [262] P. Totta, C. Busonero, S. Leone, M. Marino, F. Acconcia; Dynamin II is required for 17 $\beta$ -estradiol signaling and autophagy-based ER $\alpha$  degradation; *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–10.
- [263] J. S. Carroll, C. A. Meyer, J. Song, W. Li, T. R. Geistlinger, J. Eeckhoute, A. S. Brodsky, E. K. Keeton, K. C. Fertuck, G. F. Hall, et al.; Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites; *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 1289–1297.
- [264] W.-D. Han, Y.-M. Mu, X.-C. Lu, Z.-M. Xu, X.-J. Li, L. Yu, H.-J. Song, M. Li, J.-M. Lu, Y.-L. Zhao, et al.; Up-regulation of LRP16 mRNA by 17 $\beta$ -estradiol through activation of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ), but not ER $\beta$ , and promotion of human breast cancer MCF-7 cell proliferation: a preliminary report.; *Endocr. Relat. Cancer* **2003**, *10*, 217–224.
- [265] D. S. Sánchez, L. K. Fischer Sigel, P. J. Azurmendi, S. G. Vlachovsky, E. M. Oddo, I. Armando, F. R. Ibarra, C. Silberstein; Estradiol stimulates cell proliferation via classic estrogen receptor-alpha and G protein-coupled estrogen receptor-1 in human renal tubular epithelial cell primary cultures; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *512*, 170–175.
- [266] C. Klinge; Estrogen Regulation of MicroRNA Expression; *Curr. Genomics* **2009**, *10*, 169–183.
- [267] R. Han, S. Gu, Y. Zhang, A. Luo, X. Jing, L. Zhao, X. Zhao, L. Zhang; Estrogen promotes progression of hormone-dependent breast cancer through CCL2-CCR2 axis by upregulation of Twist via PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling; *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9575.
- [268] N. Rothenberger, A. Somasundaram, L. Stabile; The Role of the Estrogen Pathway in the Tumor Microenvironment; *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 611.

- [269] M. Rouhimoghadam, A. S. Lu, A. K. Salem, E. J. Filardo; Therapeutic Perspectives on the Modulation of G-Protein Coupled Estrogen Receptor, GPER, Function; *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 1–16.
- [270] J. A. Katzenellenbogen, K. E. Carlson, B. S. Katzenellenbogen; Facile geometric isomerization of phenolic non-steroidal estrogens and antiestrogens: Limitations to the interpretation of experiments characterizing the activity of individual isomers; *J. Steroid Biochem.* **1985**, *22*, 589–596.
- [271] M. Hasan, R. K. Leak, R. E. Stratford, D. P. Zlotos, P. A. Witt-Enderby; Drug conjugates—an emerging approach to treat breast cancer; *Pharmacol. Res. Perspect.* **2018**, *6*, 1–17.
- [272] K.-L. Dao, R. N. Hanson; Targeting the Estrogen Receptor using Steroid–Therapeutic Drug Conjugates (Hybrids); *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 2139–2158.
- [273] A. Raza, T. Rasheed, F. Nabeel, U. Hayat, M. Bilal, H. Iqbal; Endogenous and Exogenous Stimuli-Responsive Drug Delivery Systems for Programmed Site-Specific Release; *Molecules* **2019**, *24*, 1117–1138.
- [274] X. Lin, J. Wu, Y. Liu, N. Lin, J. Hu, B. Zhang; Stimuli-Responsive Drug Delivery Systems for the Diagnosis and Therapy of Lung Cancer; *Molecules* **2022**, *27*, 948–962.
- [275] J. Yang, C. Chen, X. Tang; Cholesterol-Modified Caged siRNAs for Photoregulating Exogenous and Endogenous Gene Expression; *Bioconjugate Chem* **2018**, *29*, 1010–1015.
- [276] G. Cesarone, O. P. Edupuganti, C.-P. Chen, E. Wickstrom; Insulin Receptor Substrate 1 Knockdown in Human MCF7 ER+ Breast Cancer Cells by Nuclease-Resistant IRS1 siRNA Conjugated To a Disulfide-Bridged d -Peptide Analogue of Insulin-Like Growth Factor 1; *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1831–1840.
- [277] M. I. Meschaninova, N. S. Entelis, E. L. Chernolovskaya, A. G. Venyaminova; A versatile solid-phase approach to the synthesis of oligonucleotide conjugates with biodegradable hydrazone linker; *Molecules* **2021**, *26*, 1–15.
- [278] M. Shan, K. E. Carlson, A. Bujotzek, A. Wellner, R. Gust, M. Weber, J. A. Katzenellenbogen, R. Haag; Nonsteroidal Bivalent Estrogen Ligands: An Application of the Bivalent Concept to the Estrogen Receptor; *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 707–715.
- [279] F. Abendroth, A. Bujotzek, M. Shan, R. Haag, M. Weber, O. Seitz; DNA-Controlled Bivalent Presentation of Ligands for the Estrogen Receptor; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8592–8596.
- [280] P. J. Burke, B. T. Kalet, T. H. Koch; Antiestrogen binding site and estrogen receptor mediate uptake and distribution of 4-hydroxytamoxifen-targeted doxorubicin-formaldehyde conjugate in breast cancer cells; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6509–6518.
- [281] N. O. Keely, M. Carr, B. Yassin, G. Ana, D. G. Lloyd, D. Zisterer, M. J. Meegan; Design, synthesis and biochemical evaluation of novel selective estrogen receptor ligand conjugates incorporating an endoxifen-combretastatin hybrid scaffold; *Biomedicines* **2016**, *4*, 1–34.
- [282] P. M. Kelly, N. O. Keely, S. A. Bright, B. Yassin, G. Ana, D. Fayne, D. M. Zisterer, M. J. Meegan; Novel selective estrogen receptor ligand conjugates incorporating endoxifen-combretastatin and cyclofenil-combretastatin hybrid scaffolds: Synthesis and biochemical evaluation; *Molecules* **2017**, *22*, 1440–1490.

- [283] P. L. Coe, C. E. Scriven; Crossed coupling of functionalised ketones by low valent titanium (the McMurry reaction): a new stereoselective synthesis of tamoxifen; *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1986**, 475.
- [284] M. Hasan, M. A. Marzouk, S. Adhikari, T. D. Wright, B. P. Miller, M. D. Matossian, S. Elliott, M. Wright, M. Alzoubi, B. M. Collins-Burow, et al.; Pharmacological, Mechanistic, and Pharmacokinetic Assessment of Novel Melatonin-Tamoxifen Drug Conjugates as Breast Cancer Drugs; *Mol. Pharmacol.* **2019**, *96*, 272–296.
- [285] B. E. Gryder, M. K. Rood, K. A. Johnson, V. Patil, E. D. Raftery, L.-P. D. Yao, M. Rice, B. Azizi, D. F. Doyle, A. K. Oyelere; Histone Deacetylase Inhibitors Equipped with Estrogen Receptor Modulation Activity; *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5782–5796.
- [286] W. A. Wlassoff, C. D. Albright, M. S. Sivashinski, A. Ivanova, J. G. Appelbaum, R. I. Salganik; Hydrogen peroxide overproduced in breast cancer cells can serve as an anticancer prodrug generating apoptosis-stimulating hydroxyl radicals under the effect of tamoxifen-ferrocene conjugate; *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *59*, 1549–1553.
- [287] S. Ding, X. Qiao, G. L. Kucera, U. Bierbach; Design of a platinum–acridine–endoxifen conjugate targeted at hormone-dependent breast cancer; *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2415–2417.
- [288] W. Lv, J. Liu, T. C. Skaar, D. A. Flockhart, M. Cushman; Design and synthesis of norendoxifen analogues with dual aromatase inhibitory and estrogen receptor modulatory activities; *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2623–2648.
- [289] EMA; “EMA/451272/2007: Refusal CHMP Assessment Report for Genasense”; <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/genasense>; Stand: 06.10.2022.
- [290] A. H. Fauq, G. M. Maharvi, D. Sinha; A convenient synthesis of (Z)-4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen (endoxifen); *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3036–3038.
- [291] S. Gauthier, J. Mailhot, F. Labrie; New Highly Stereoselective Synthesis of (Z)-4-Hydroxytamoxifen and (Z)-4-Hydroxytoremifene via McMurry Reaction; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3890–3893.
- [292] W. Lv, J. Liu, D. Lu, D. A. Flockhart, M. Cushman; Synthesis of Mixed (E, Z)-, (E)-, and (Z)-Norendoxifen with Dual Aromatase Inhibitory and Estrogen Receptor Modulatory Activities; *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4611–4618.
- [293] E.-K. Bang, E. M. Jeon, W. Kim, K.-H. Lee, K.-T. Kim, B. H. Kim; Tissue specific delivery of estrone-conjugated siRNAs; *Mol BioSyst* **2013**, *9*, 974–977.
- [294] M. Adamczyk, Y. Y. Chen, J. A. Moore, P. G. Mattingly; Estradiol-mimetic probes. Preparation of 17 $\alpha$ -(6-amino-hexynyl)estradiol biotin, fluorescein and acridinium conjugates; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1281–1284.
- [295] K. M. Kasiotis, C. Mendorou, S. A. Haroutounian, M. N. Alexis; High affinity 17 $\alpha$ -substituted estradiol derivatives: Synthesis and evaluation of estrogen receptor agonist activity; *Steroids* **2006**, *71*, 249–255.
- [296] L. Q. Deng, O. Norberg, S. Uppalapati, M. D. Yan, O. Ramstrom; Stereoselective synthesis of light-activatable perfluorophenylazide-conjugated carbohydrates for glycoarray fabrication and evaluation of structural effects on protein binding by SPR imaging; *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3188–3198.
- [297] J. Mulzer; *Compr. Org. Synth.*, Elsevier, **1991**, pp. 323–380.

- [298] P. Patschinski, C. Zhang, H. Zipse; The lewis base-catalyzed silylation of alcohols—a mechanistic analysis; *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 8348–8357.
- [299] F. Hammerschmidt, M. Hanbauer; Transformation of arylmethyamines into  $\alpha$ -aminophosphonic acids via metalated phosphoramidates: Rearrangement of partly configurationally stable n-phosphorylated  $\alpha$ -aminocarbanions; *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6121–6131.
- [300] F. G. Bordwell; Equilibrium Acidities in Dimethyl Sulfoxide Solution; *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 456–463.
- [301] N. Blažević, D. Kolbah, B. Belin, V. Šunjić, F. Kajfež; Hexamethylenetetramine, a versatile reagent in organic synthesis; *Synthesis* **1979**, *1979*, 161–176.
- [302] H. Gurer-Orhan, J. Kool, N. P. E. Vermeulen, J. H. N. Meerman; A novel microplate reader-based high-throughput assay for estrogen receptor binding; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2005**, *85*, 149–161.
- [303] K. ichi Ohno, T. Fukushima, T. Santa, N. Waizumi, H. Tokuyama, M. Maeda, K. Imai; Estrogen receptor binding assay method for endocrine disruptors using fluorescence polarization; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4391–4396.
- [304] K. M. Sam, S. Auger, V. Luu-The, D. Poirier; Steroidal Spiro- $\gamma$ -lactones That Inhibit 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Human Placental Microsomes; *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4518–4528.
- [305] C. J. Huang, C. W. Hong, F. H. Ko, F. C. Chang; Fabrication of vesicle-like dual-responsive click capsules by direct covalent layer-by-layer assembly; *Soft Matter* **2011**, *7*, 10850–10855.
- [306] J. Liu, J. Fu, W. Li, Y. Zou, Z. Huang, J. Xu, S. Peng, Y. Zhang; Utilization of the inherent nucleophile for regioselective O-acylation of polyphenols via an intermolecular cooperative transesterification; *Tetrahedron* **2016**, *72*, 4103–4110.
- [307] F. B. Mallory, C. W. Mallory; Photochemistry of Stilbenes. VI.1 Steric Effects on the Photocyclizations of Some Meta-Substituted Stilbenes<sup>2</sup>; *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6041–6048.
- [308] T. D. Doyle, Nicolae. Filipescu, W. R. Benson, Daniel. Banes; Photocyclization of .alpha.,.alpha.'-diethyl-4,4'-stilbenediol. Isolation of a stable tautomer of the elusive dihydrophenanthrenes; *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6371–6372.
- [309] J. Salamoun, M. Macka, M. Nechvátal, M. Matousek, L. Knesel; Identification of products formed during UV irradiation of tamoxifen and their use for fluorescence detection in high-performance liquid chromatography.; *J. Chromatogr.* **1990**, *514*, 179–187.
- [310] M. Marín-García, G. Ioele, H. Franquet-Griell, S. Lacorte, G. Ragno, R. Tauler; Investigation of the photodegradation profile of tamoxifen using spectroscopic and chromatographic analysis and multivariate curve resolution; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2018**, *174*, 128–141.
- [311] T. Kojima, S. Onoue, F. Katoh, R. Teraoka, Y. Matsuda, S. Kitagawa, M. Tsuhako; Effect of spectroscopic properties on photostability of tamoxifen citrate polymorphs; *Int. J. Pharm.* **2007**, *336*, 346–351.
- [312] A. E. Finholt, A. C. Bond, H. I. Schlesinger; Lithium Aluminum Hydride, Aluminum Hydride and Lithium Gallium Hydride, and Some of their Applications in Organic and Inorganic Chemistry; *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 1199–1203.

- [313] E. C. Ashby, J. Prather; The Composition of "Mixed Hydride" Reagents. A Study of the Schlesinger Reaction; *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 729–733.
- [314] S. Thavaneswaran, K. McCamley, P. J. Scammells; N-Demethylation of Alkaloids; *Nat. Prod. Commun.* **2006**, *1*, 885–897.
- [315] P. V Solanki, S. B. Uppelli, B. S. Pandit, V. T. Mathad; An Improved and Efficient Process for the Production of Highly Pure Paliperidone, a Psychotropic Agent, via DBU Catalyzed N -Alkylation; *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2013**, *1*, 243–248.
- [316] C. E. Yeom, H. W. Kim, S. Y. Lee, B. M. Kim; DBU-mediated mild and chemoselective deprotection of aryl silyl ethers and tandem biaryl ether formation; *Synlett* **2007**, *2007*, 146–150.
- [317] A. Nguyen, S. Top, P. Pigeon, A. Vessières, E. A. Hillard, M.-A. Plamont, M. Huché, C. Rigamonti, G. Jaouen; Synthesis and Structure-Activity Relationships of Ferrocenyl Tamoxifen Derivatives with Modified Side Chains; *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 684–696.
- [318] J. L. Moore, S. M. Taylor, V. A. Soloshonok; An efficient and operationally convenient general synthesis of tertiary amines by direct alkylation of secondary amines with alkyl halides in the presence of Huenig's base; *Arkivoc* **2005**, *2005*, 287–292.
- [319] D. Lundberg; Dissertation "The Coordination Chemistry of Solvated Metal Ions in DMPU"; Swedish University of Agricultural Sciences, **2006**.
- [320] R. A. Woltornist, D. B. Collum; Aggregation and Solvation of Sodium Hexamethyldisilazide: Across the Solvent Spectrum; *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 2406–2422.
- [321] C. Eaborn; Organometallics: A concise introduction; *J. Organomet. Chem.* **1993**, *445*, 140–168.
- [322] B. H. Lipshutz, T. A. Miller; Deprotection of "sem" ethers: A convenient, general procedure; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 7149–7152.
- [323] A. B. Smith, Q. Lin, V. A. Doughty, L. Zhuang, M. D. McBriar, J. K. Kerns, C. S. Brook, N. Murase, K. Nakayama; The spongistatins: Architecturally complex natural products - Part two: Synthesis of the C(29-51) subunit, fragment assembly, and final elaboration to (+)-spongistatin 2; *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2001**, *40*, 196–199.
- [324] J. H. Zhang, T. D. Y. Chung, K. R. Oldenburg; A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays; *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 67–73.
- [325] V. Engemann; Dissertation "Entwicklung Zellbasierter Assays Für Die Evaluation von Chemokininhitoren"; Technischen Universität Darmstadt, **2020**.
- [326] H. Gubler, U. Schopfer, E. Jacoby; Theoretical and experimental relationships between percent inhibition and IC50 data observed in high-throughput screening; *J. Biomol. Screen.* **2013**, *18*, 1–13.
- [327] R. M. Campbell, J. Dymshitz, B. J. Eastwood; in *Assay Guid. Man. - Data Stand. Results Manag.*, **2012**, pp. 1–13.
- [328] M. Weimer, X. Jiang, O. Ponta, S. Stanzel, A. Freyberger, A. Kopp-Schneider; The impact of data transformations on concentration-response modeling; *Toxicol. Lett.* **2012**, *213*, 292–298.

- [329] N. Raval, R. Maheshwari, D. Kalyane, S. R. Youngren-Ortiz, M. B. Chougule, R. K. Tekade; *Basic Fundam. Drug Deliv.*, Academic Press, **2018**, 369–400.
- [330] A. S. Levenson, V. Craig Jordan; The key to the antiestrogenic mechanism of raloxifene is amino acid 351 (Aspartate) in the estrogen receptor; *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1872–1875.
- [331] J. I. Macgregor, V. C. Jordan; Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action; *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 151–196.
- [332] Y. C. Lim, Z. Desta, D. A. Flockhart, T. C. Skaar; Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *55*, 471–478.
- [333] A. K. Shiau, D. Barstad, P. M. Loria, L. Cheng, P. J. Kushner, D. A. Agard, G. L. Greene; The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen; *Cell* **1998**, *95*, 927–937.
- [334] R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan, S. L. Beaucage; 3H-1,2-Benzodithiole-3-one 1,1-Dioxide as an Improved Sulfurizing Reagent in the Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleoside Phosphorothioates; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1253–1254.
- [335] D. E. Volk, G. L. R. Lokesh; Development of phosphorothioate DNA and DNA thiocaptamers; *Biomedicines* **2017**, *5*, 41–61.
- [336] M. M. Lemaître, A. S. Murphy, R. L. Somers; Sulfurizing Reagent II and Its Use in Synthesizing Oligonucleotide Phosphorothioates; *Glen Rep.* **2006**, *18*, 1–6.
- [337] R. T. Pon, N. Usman, M. J. Damha, K. K. Ogilvie; Prevention of guanine modification and chain cleavage during the solid phase synthesis of oligonucleotides using phosphoramidite derivatives; *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 6453–6470.
- [338] J. S. Eadie, D. S. Davidson; Guanine modification during chemical DNA synthesis; *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 8333–8349.
- [339] G. Zon; *Protoc. Oligonucleotides Analogs*, Humana Press, New Jersey, **1993**, 165–189.
- [340] A. Guzaev, H. Lönnberg; Solid support synthesis of ester linked hydrophobic conjugates of oligonucleotides; *Tetrahedron* **1999**, *55*, 9101–9116.
- [341] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi; A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [342] C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano Del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu; Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: A comparative study; *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051–8056.
- [343] L. M. Gaetke, C. K. Chow; Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients; *Toxicology* **2003**, *189*, 147–163.
- [344] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn; Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation; *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879–9883.

- [345] J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft; Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides; *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 16–36.
- [346] S. I. Presolski, V. Hong, S. H. Cho, M. G. Finn; Tailored ligand acceleration of the Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction: Practical and mechanistic implications; *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570–14576.
- [347] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell; Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA; *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639–3642.
- [348] D. Perrone, E. Marchesi, L. Preti, M. L. Navacchia; Modified nucleosides, nucleotides and nucleic acids via click azide-alkyne cycloaddition for pharmacological applications; *Molecules* **2021**, *26*, 3100–3127.
- [349] P. Van Delft, N. J. Meeuwenoord, S. Hoogendoorn, J. Dinkelaar, H. S. Overkleeft, G. A. Van Der Marel, D. V. Filippov; Synthesis of oligoribonucleic acid conjugates using a cyclooctyne phosphoramidite; *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5486–5489.
- [350] D. Milesi, I. Kutyavin, E. A. Lukhtanov, V. V. Gorn, M. W. Reed; Synthesis of oligonucleotide conjugates in anhydrous dimethyl sulfoxide; *Methods Enzymol.* **2000**, *313*, 164–173.
- [351] M. P. Reddy, N. B. Hanna, F. Farooqui; *Nucleosides Nucleotides*, Marcel Dekker Inc., **1997**, 1589–1598.
- [352] Deprotection Guide; *Glen Rep.* **2020**, *20*, 1–14.
- [353] B. Mullah, A. Andrus; Automated synthesis of double dye-labeled oligonucleotides using tetramethylrhodamine (TAMRA) solid supports; *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5751–5754.
- [354] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse; Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules; *Science* **1989**, *246*, 64–71.
- [355] J. M. Koomen, W. K. Russell, S. E. Tichy, D. H. Russell; Accurate mass measurement of DNA oligonucleotide ions using high-resolution time-of-flight mass spectrometry; *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37*, 357–371.
- [356] I. Nikcevic, T. K. Wyrzykiewicz, P. A. Limbach; Detecting low-level synthesis impurities in modified phosphorothioate oligonucleotides using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry; *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *304*, 98–104.
- [357] Z. Cui, J. A. Theruvathu, A. Farrel, A. Burdzy, L. C. Sowers; Characterization of synthetic oligonucleotides containing biologically important modified bases by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; *Anal. Biochem.* **2008**, *379*, 196–207.
- [358] L. A. Marky, K. J. Breslauer; Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves; *Biopolymers* **1987**, *26*, 1601–1620.
- [359] J. L. Mergny, L. Lacroix; Analysis of Thermal Melting Curves; *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515–537.
- [360] J. Gralla, D. M. Crothers; Free energy of imperfect nucleic acid helices. II. Small Hairpin Loops; *J. Mol. Biol.* **1973**, *73*, 497–511.



- [361] G. Dai; Dissertation, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Metabolism of BCL2-Antisense Phosphorothioate Oligonucleotide G3139 (Genasense®), Ohio State University, **2005**.
- [362] M. Mills, P. B. Arimondo, L. Lacroix, T. Garestier, C. Hélène, H. Klump, J. L. Mergny; Energetics of strand-displacement reactions in triple helices: A spectroscopic study; *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 1035–1054.
- [363] J. D. Puglisi, I. Tinoco; Absorbance melting curves of RNA; *Methods Enzymol.* **1989**, *180*, 304–325.
- [364] S. J. Schroeder, D. H. Turner; Optical melting measurements of nucleic acid thermodynamics.; *Methods Enzymol.* **2009**, *468*, 371–387.
- [365] A. Ström, J. Hartman, J. S. Foster, S. Kietz, J. Wimalasena, J. Å. Gustafsson; Estrogen receptor  $\beta$  inhibits  $17\beta$ -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 1566–1571.
- [366] A. Pawlik, M. Słomińska-Wojewódzka, A. Herman-Antosiewicz; Sensitization of estrogen receptor-positive breast cancer cell lines to 4-hydroxytamoxifen by isothiocyanates present in cruciferous plants; *Eur. J. Nutr.* **2016**, *55*, 1165–1180.
- [367] R. L. Juliano, L. Wang, F. Tavares, E. G. Brown, L. James, Y. Ariyaratna, X. Ming, C. Mao, M. Suto; Structure–activity relationships and cellular mechanism of action of small molecules that enhance the delivery of oligonucleotides; *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 1601–1613.
- [368] X. Ming, K. Carver, Michael Fisher, Romain Noel, J. C. Cintrat, D. Gillet, J. Barbier, C. Cao, J. Bauman, R. L. Juliano; The small molecule Retro-1 enhances the pharmacological actions of antisense and splice switching oligonucleotides; *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 3673–3687.
- [369] T. Moldoveanu, A. V. Follis, R. W. Kriwacki, D. R. Green; Many players in BCL-2 family affairs; *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 101–111.
- [370] M. H. Naseri, M. Mahdavi, J. Davoodi, H. S. Tackallou, M. Goudarzvand, S. H. Neishabouri; Up regulation of Bax and down regulation of Bcl2 during 3-NC mediated apoptosis in human cancer cells; *Cancer Cell Int.* **2015**, *15*, 55.
- [371] R. S. Soderquist, L. Crawford, E. Liu, M. Lu, A. Agarwal, G. R. Anderson, K. H. Lin, P. S. Winter, M. Cakir, K. C. Wood; Systematic mapping of BCL-2 gene dependencies in cancer reveals molecular determinants of BH3 mimetic sensitivity; *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–13.
- [372] E. Macia, M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner, T. Kirchhausen; Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin; *Dev. Cell* **2006**, *10*, 839–850.
- [373] A. Kapara, V. Brunton, D. Graham, K. Faulds; Investigation of cellular uptake mechanism of functionalised gold nanoparticles into breast cancer using SERS; *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 5819–5829.
- [374] A. Christensen, P. Micevych; CAV1 siRNA reduces membrane estrogen receptor- $\alpha$  levels and attenuates sexual receptivity; *Endocrinology* **2012**, *153*, 3872–3877.
- [375] K. Soltysik, P. Czekaj; Membrane estrogen receptors - is it an alternative way of estrogen action?; *J. Physiol. Pharmacol.* **2013**, *64*, 129–142.
- [376] K. B. Horwitz, T. A. Jackson, D. L. Bain, J. K. Richer, G. S. Takimoto, L. Tung; Nuclear receptor coactivators and corepressors.; *Mol. Endocrinol.* **1996**, *10*, 1167–1177.

- [377] C. K. Glass, D. W. Rose, M. G. Rosenfeld; Nuclear receptor coactivators; *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 222–232.
- [378] A. M. Brzozowski, A. C. W. Pike, Z. Dauter, R. E. Hubbard, T. Bonn, O. Engström, L. Öhman, G. L. Greene, J. Å. Gustafsson, M. Carlquist; Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor; *Nature* **1997**, *389*, 753–758.
- [379] L. Li, M. P. Haynes, J. R. Bender; Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor  $\alpha$  variant (ER46) in human endothelial cells; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 4807–4812.
- [380] S. Kocanova, M. Mazaheri, S. Caze-Subra, K. Bystricky; Ligands specify estrogen receptor alpha nuclear localization and degradation; *BMC Cell Biol.* **2010**, *11*, 1–13.
- [381] A. Nadal, M. Díaz, M. A. Valverde; The estrogen trinity: Membrane, cytosolic, and nuclear effects; *News Physiol. Sci.* **2001**, *16*, 251–255.
- [382] A. De Mesmaeker, K. H. Altmann, A. Waldner, S. Wendeborn; Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems; *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 343–355.
- [383] C. J. Choy, C. R. Ley, A. L. Davis, B. S. Backer, J. J. Geruntho, B. H. Clowers, C. E. Berkman; Second-Generation Tunable pH-Sensitive Phosphoramidate-Based Linkers for Controlled Release; *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 2206–2213.
- [384] C. J. Choy, J. J. Geruntho, A. L. Davis, C. E. Berkman; Tunable pH-Sensitive Linker for Controlled Release; *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 824–830.
- [385] B. S. Backer, C. J. Choy, A. L. Davis, Z. S. Browne, C. E. Berkman; Tunable pH-sensitive 2-carboxybenzyl phosphoramidate cleavable linkers; *Tetrahedron Lett.* **2020**, *61*, 151650.
- [386] Y. Mehellou, J. Balzarini, C. McGuigan; Aryloxy phosphoramidate triesters: A technology for delivering monophosphorylated nucleosides and sugars into cells; *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1779–1791.
- [387] S. Wagner, M. Rakotomalala, Y. Bykov, O. Walter, M. Döring; Synthesis of new organophosphorus compounds using the ather-ton-todd reaction as a versatile tool; *Heteroat. Chem.* **2012**, *23*, 216–222.
- [388] S. S. Le Corre, M. Berchel, H. Couthon-Gourvès, J.-P. Haelters, P.-A. Jaffrès; Ather-ton-Todd reaction: mechanism, scope and applications; *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1166–1196.
- [389] A. W. Garrison, C. E. Boozer; The Acid-Catalyzed Hydrolysis of a Series of Phosphoramidates; *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 3486–3494.
- [390] M. Ora, K. Mattila, T. Lönnberg, M. Oivanen, H. Lönnberg; Hydrolytic reactions of diribonucleoside 3',5'-(3'-N-phosphoramidates): Kinetics and mechanisms for the P-O and P-N bond cleavage of 3'-amino-3'-deoxyuridylyl-3',5'-uridine; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14364–14372.
- [391] T. Lonnberg, M. Ora, H. Lonnberg; ChemInform Abstract: Hydrolytic Reactions of Nucleoside Phosphoramidates: Kinetics and Mechanisms; *Mini-Rev. Org. Chem.* **2010**, *7*, 33–43.
- [392] E. J. Sampson, S. J. Benkovic; Structure-Reactivity Correlation for the Hydrolysis of Phosphoramidate Monoanions; *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4009–4016.

- [393] E. S. Orth, E. H. Wanderlind, M. Medeiros, P. S. M. Oliveira, B. G. Vaz, M. N. Eberlin, A. J. Kirby, F. Nome; Phosphorylimidazole derivatives: Potentially biosignaling molecules; *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8003–8008.
- [394] N. Ranganathan, W. S. Brinigar; Thermal Decomposition of 1-(Dialkylphosphoryl)imidazoles; *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4853–4856.
- [395] J. R. Peyser, J. P. Ferris; The rates of hydrolysis of thymidyl-3', 5'-thymidine-H-phosphonate: The possible role of nucleic acids linked by diesters of phosphorous acid in the origins of life; *Orig. Life Evol. Biosph.* **2001**, *31*, 363–380.
- [396] B. C. Froehler; Deoxynucleoside H-Phosphonate diester intermediates in the synthesis of internucleotide phosphate analogues; *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5575–5578.
- [397] M. Milen, P. Ábrányi-Balogh, G. Balogh, L. Drahos, G. Keglevich; A Study on the Phosphorylation of Indole, Imidazole, Carbazole, and Phenothiazine Derivatives; *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2012**, *187*, 1091–1100.
- [398] K. A. Lennox, M. A. Behlke; Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides; *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 863–877.
- [399] T. Gökirmak, M. Nikan, S. Wiechmann, T. P. Prakash, M. Tanowitz, P. P. Seth; Overcoming the challenges of tissue delivery for oligonucleotide therapeutics; *Trends Pharmacol. Sci.* **2021**, *42*, 588–604.
- [400] F. Wada, T. Yamamoto, T. Ueda, M. Sawamura, S. Wada, M. Harada-Shiba, S. Obika; Cholesterol-GalNAc dual conjugation strategy for reducing renal distribution of antisense oligonucleotides; *Nucleic Acid Ther.* **2018**, *28*, 50–57.
- [401] L. S. Boogerd, M. C. Boonstra, A. J. Beck, A. Charehbili, C. E. Hoogstins, H. A. J. M. Prevoo, S. Singhal, P. S. Low, C. J. van de Velde, A. L. Vahrmeijer; Concordance of folate receptor- $\alpha$  expression between biopsy, primary tumor and metastasis in breast cancer and lung cancer patients; *Oncotarget* **2016**, *7*, 17442–17454.
- [402] L. C. Hartmann, G. L. Keeney, W. L. Lingle, T. J. H. Christianson, B. Varghese, D. Hillman, A. L. Oberg, P. S. Low; Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer; *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 938–942.
- [403] C. Dohmen, T. Fröhlich, U. Lächelt, I. Röhl, H.-P. Vornlocher, P. Hadwiger, E. Wagner; Defined Folate-PEG-siRNA Conjugates for Receptor-specific Gene Silencing; *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2012**, *1*, e7.
- [404] J. Willibald, J. Harder, K. Sparrer, K. K. Conzelmann, T. Carell; Click-modified amidamide siRNA enables delivery and gene silencing in neuronal and immune cells; *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12330–12333.
- [405] N. S. Barta, J. C. Hodges; *Phosphoramidite Derivatives of Folic Acid*, **2012**, WO2012018729A1.
- [406] K. Deprey, N. Batistatou, J. A. Kritzer; A critical analysis of methods used to investigate the cellular uptake and subcellular localization of RNA therapeutics; *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 7623–7639.
- [407] S.-H. Kang, M.-J. Cho, R. Kole; Up-Regulation of Luciferase Gene Expression with Antisense Oligonucleotides: Implications and Applications in Functional Assay Development; *Biochemistry* **1998**, *37*, 6235–6239.

- [408] P. Sazani, S.-H. Kang, M. A. Maier, C. Wei, J. Dillman, J. Summerton, M. Manoharan, R. Kole; Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs; *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3965–3974.
- [409] B. Schmidtgal, A. P. Spork, F. Wachowius, C. Höbartner, C. Ducho; Synthesis and properties of DNA oligonucleotides with a zwitterionic backbone structure; *Chem Commun* **2014**, *50*, 13742–13745.
- [410] B. Schmidtgal, C. Höbartner, C. Ducho; NAA-modified DNA oligonucleotides with zwitterionic backbones: stereoselective synthesis of A–T phosphoramidite building blocks; *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 50–60.
- [411] M. Meng, B. Schmidtgal, C. Ducho; Enhanced Stability of DNA Oligonucleotides with Partially Zwitterionic Backbone Structures in Biological Media; *Molecules* **2018**, *23*, 2941.
- [412] M. Wojtyniak, B. Schmidtgal, P. Kirsch, C. Ducho; Towards Zwitterionic Oligonucleotides with Improved Properties: the NAA/LNA-Gapmer Approach; *ChemBioChem* **2020**, *21*, 3234–3243.
- [413] V. Böttner; Untersuchungen Zu Synthese Und Eigenschaften von Oligonucleotid-Prodrgs, Universität des Saarlandes, **2019**.
- [414] R. L. Letsinger, W. S. Mungall; Nucleotide chemistry. XVI. Phosphoramidate analogs of oligonucleotides; *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 3800–3803.
- [415] R. L. Letsinger, C. N. Singman, Gary. Histan, Manikrao. Salunkhe; Cationic oligonucleotides; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4470–4471.
- [416] D. V. Prokhorova, B. P. Chelobanov, E. A. Burakova, A. A. Fokina, D. A. Stetsenko; New oligodeoxyribonucleotide derivatives bearing internucleotide N-tosyl phosphoramidate groups: Synthesis and complementary binding to DNA and RNA; *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2017**, *43*, 38–42.
- [417] M. S. Kupryushkin, D. V. Pyshnyi, D. A. Stetsenko; Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues.; *Acta Naturae* **2014**, *6*, 116–8.
- [418] B. P. Chelobanov, E. A. Burakova, D. V. Prokhorova, A. A. Fokina, D. A. Stetsenko; New oligodeoxynucleotide derivatives containing N-(methanesulfonyl)-phosphoramidate (mesyl phosphoramidate) internucleotide group; *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2017**, *43*, 664–668.
- [419] E. A. Burakova, A. Sh. Derzhalova, B. P. Chelobanov, A. A. Fokina, D. A. Stetsenko; New Oligodeoxynucleotide Derivatives Containing N-(Sulfonyl)-Phosphoramidate Groups; *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2019**, *45*, 662–668.
- [420] A. Derzhalova, O. Markov, A. Fokina, Y. Shiohama, T. Zatspein, M. Fujii, M. Zenkova, D. Stetsenko; Novel Lipid-Oligonucleotide Conjugates Containing Long-Chain Sulfonyl Phosphoramidate Groups: Synthesis and Biological Properties; *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1174.
- [421] O. V. Markov, A. V. Filatov, M. S. Kupryushkin, I. V. Chernikov, O. A. Patutina, A. A. Strunov, E. L. Chernolovskaya, V. V. Vlassov, D. V. Pyshnyi, M. A. Zenkova; Transport Oligonucleotides—A Novel System for Intracellular Delivery of Antisense Therapeutics; *Molecules* **2020**, *25*, 3663–3690.
- [422] M. S. Kupryushkin, T. D. Zharkov, E. S. Ilina, O. V. Markov, A. S. Kochetkova, M. M. Akhmetova, A. A. Lomzov, D. V. Pyshnyi, O. I. Lavrik, S. N. Khodyreva; Triazylamidophosphate Oligonucleotides: Synthesis and Study of Their Interaction

- with Cells and DNA-Binding Proteins; *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2021**, *47*, 719–733.
- [423] John. Nielsen, M. H. Caruthers; Directed arbusov-type reactions of 2-cyano-1,1-dimethylethyl deoxynucleoside phosphites; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6275–6276.
- [424] B. A. Anderson, G. C. Freestone, A. Low, C. L. De-Hoyos, W. J. D. III, M. E. Østergaard, M. T. Migawa, M. Fazio, W. B. Wan, A. Berdeja, et al.; Towards next generation antisense oligonucleotides: mesylphosphoramidate modification improves therapeutic index and duration of effect of gapmer antisense oligonucleotides; *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 9026–9041.
- [425] M. Hyjek-Składanowska, T. A. Vickers, A. Napiórkowska, B. A. Anderson, M. Tanowitz, S. T. Crooke, X. H. Liang, P. P. Seth, M. Nowotny; Origins of the Increased Affinity of Phosphorothioate-Modified Therapeutic Nucleic Acids for Proteins; *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 7456–7468.
- [426] O. A. Patutina, S. K. Gaponova (Miroshnichenko), A. V. Sen'kova, I. A. Savin, D. V. Gladkikh, E. A. Burakova, A. A. Fokina, M. A. Maslov, E. V. Shmendel', M. J. A. Wood, et al.; Mesyl phosphoramidate backbone modified antisense oligonucleotides targeting miR-21 with enhanced in vivo therapeutic potency; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117*, 32370–32379.
- [427] S. Grijalvo, A. Aviñó, R. Eritja; Oligonucleotide delivery: a patent review (2010 – 2013); *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24*, 801–819.
- [428] S. M. Hammond, A. Aartsma-Rus, S. Alves, S. E. Borgos, R. A. M. Buijsen, R. W. J. Collin, G. Covelto, M. A. Denti, L. R. Desviat, L. Echevarría, et al.; Delivery of oligonucleotide-based therapeutics: challenges and opportunities; *EMBO Mol. Med.* **2021**, *13*, 1–23.

## 9 Anhang

### 9.1 Zyklenprogrammierung des DNA-Synthesizers

		Deblock															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Time (0.1s)		13			10			10			20	10	15			20	2
Source		TCA			TCA			TCA			GAS	ACN	ACN			GAS	ACN
Mixed																	
Destin		TRM			TRM			TRM			TRM	M_W	TRM			TRM	M_W
S.Col.Ptr.		ON	ON		ON	ON		ON	ON				ON	ON			
Delay (1s)				4			4			4						3	
Branch																	
		Coupling															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Time (0.1s)		20	10	10		10	5	3		20	10						
Source		GAS	ACN	GAS		GAS	ACN	ACN		GAS	ACN						
Mixed																	
Destin		Col	M_W	M_W		Col	M_W	Col		Col	M_W						
S.Col.Ptr.								ON	ON								
Delay (1s)		2			50												
Branch		1															
		Branch (ultramild amidites)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Time (0.1s)		3	7		10	20											
Source		TET	AMD		ACN	GAS											
Mixed			TET														
Destin		Col	Col		M_W	M_W											
S.Col.Ptr.		ON	ON														
Delay (1s)				4													
Branch																	
		Branch (DBCO amidite)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Time (0.1s)		3	7					10	20								
Source		TET	AMD					ACN	GAS								
Mixed			TET														
Destin		Col	Col					M_W	M_W								
S.Col.Ptr.		ON	ON														
Delay (1s)				180	180	180	180										
Branch																	
		Branch (Cy5 amidite)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Time (0.1s)		3	7		10	20											
Source		TET	AMD		ACN	GAS											
Mixed			TET														
Destin		Col	Col		M_W	M_W											
S.Col.Ptr.		ON	ON														
Delay (1s)				180													
Branch																	
		Oxidation (DDTT)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Time (0.1s)		10		8	10		30	3	17		20	30	2	20		30	8
Source		OXI		ACN	GAS		GAS	ACN	ACN			GAS	ACN	ACN		GAS	GAS
Mixed																	
Destin		Col		M_W	M_W		COL	M_W	COL			COL	M_W	COL		COL	M_W
S.Col.Ptr.		ON	ON						ON	ON				ON	ON		
Delay (1s)					8	60											
Branch																	

Abb. 9.1: Zyklenprogrammierung des DNA-Synthesizers. Akronyme gemäß Software Manual *Synthesizer H-8, V.02.11.*

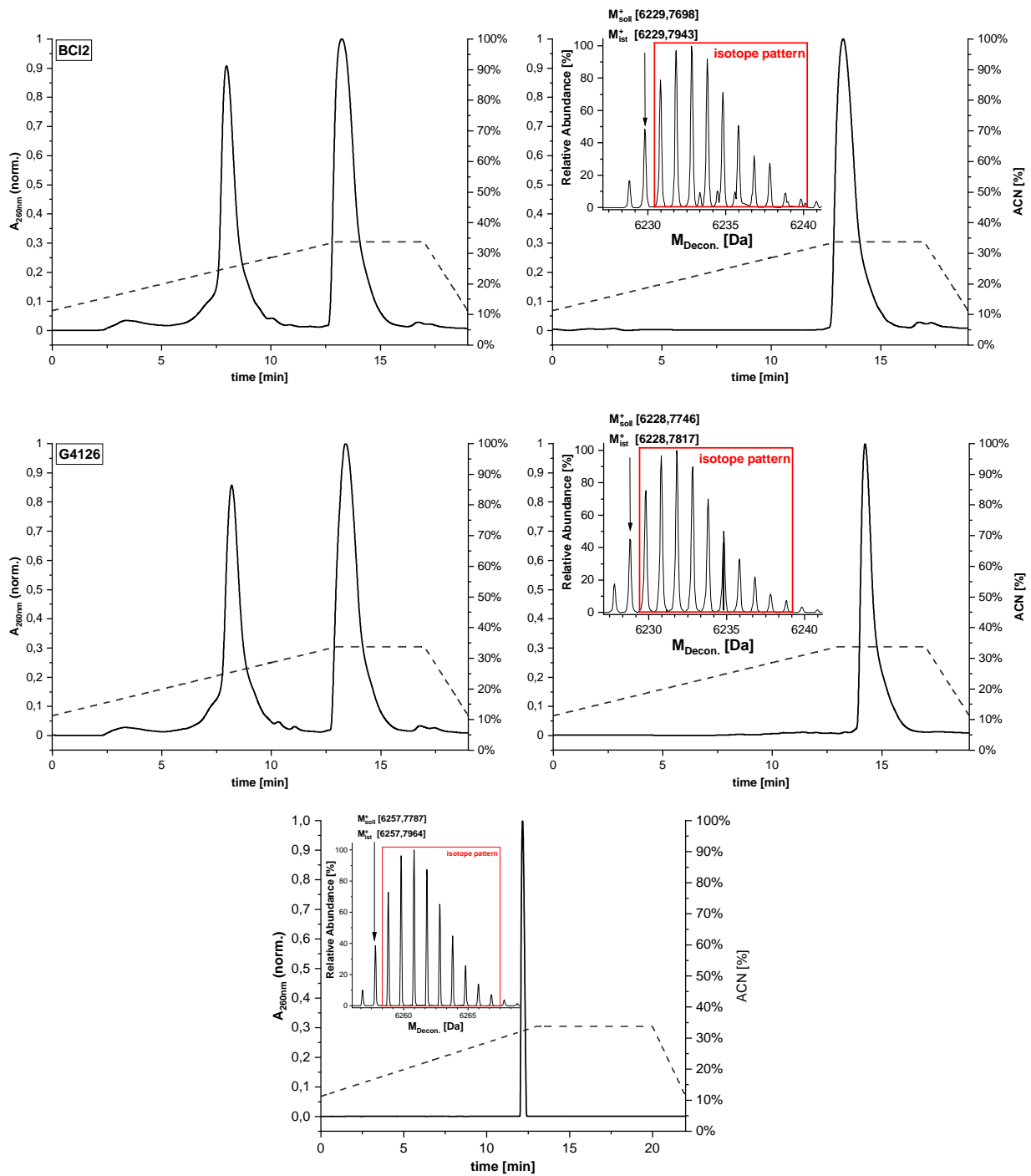
## 9.2 HPLC-Methoden Oligonucleotid-Konjugate

**Tabelle 9-1:** Übersicht der HPLC-Methoden zur Aufreinigung von Oligonucleotiden und Konjugaten.

BCI2, G4126, BCI2-TEG, G4126-TEG, MM-TEG										
t [min.]	0	13	20	22						
Buffer B [%]	15	45	45	15						
MM										
t [min.]	0	1	6	7	14	16				
Buffer B [%]	0	12	12	30	30	0				
BCI2-Tam <sub>1</sub>										
t [min.]	0	4	10	20	23	24	29	31	34	36
Buffer B [%]	15	40	40	55	55	75	75	90	90	15
G4126-Tam <sub>1</sub>										
t [min.]	0	4	10	20	23	24	31	33		
Buffer B [%]	15	40	40	55	55	75	75	15		
MM-Tam <sub>1</sub>										
t [min.]	0	4	10	20	30	31				
Buffer B [%]	15	40	40	55	55	15				
BCI2-Tam <sub>2</sub> , G4126-Tam <sub>2</sub>										
t [min.]	0	4	10	22	32	34	39	10		
Buffer B [%]	15	40	40	55	55	75	75	15		
MM-Tam <sub>2</sub>										
t [min.]	0	4	10	20	30	32				
Buffer B [%]	15	40	40	55	55	15				
BCI2-E <sub>1</sub> , G4126-E <sub>1</sub> , MM-E <sub>1</sub>										
t [min.]	0	4	10	20	23	24	28	30		
Buffer B [%]	15	40	40	55	55	75	75	15		
BCI2-E <sub>2</sub> , G4126-E <sub>2</sub> , MM-E <sub>2</sub>										
t [min.]	0	4	10	20	23	24	28	30		
Buffer B [%]	15	40	40	55	55	75	75	15		

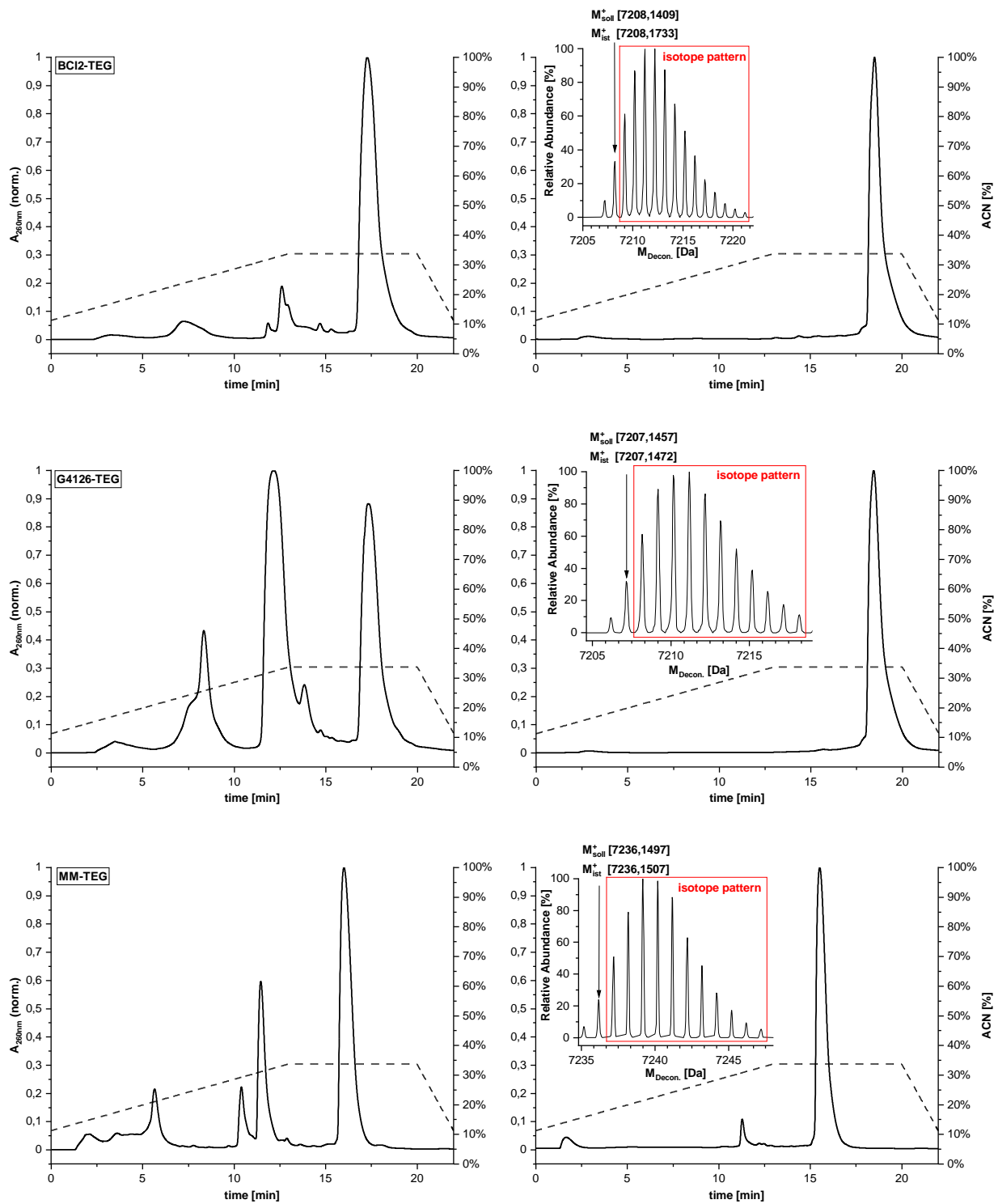
- Puffer A: 0.1 M TEAA (pH 7)
- Puffer B: 0.1 M TEAA / MeCN (1:3, v/v)

### 9.3 HPLC-Chromatogramme

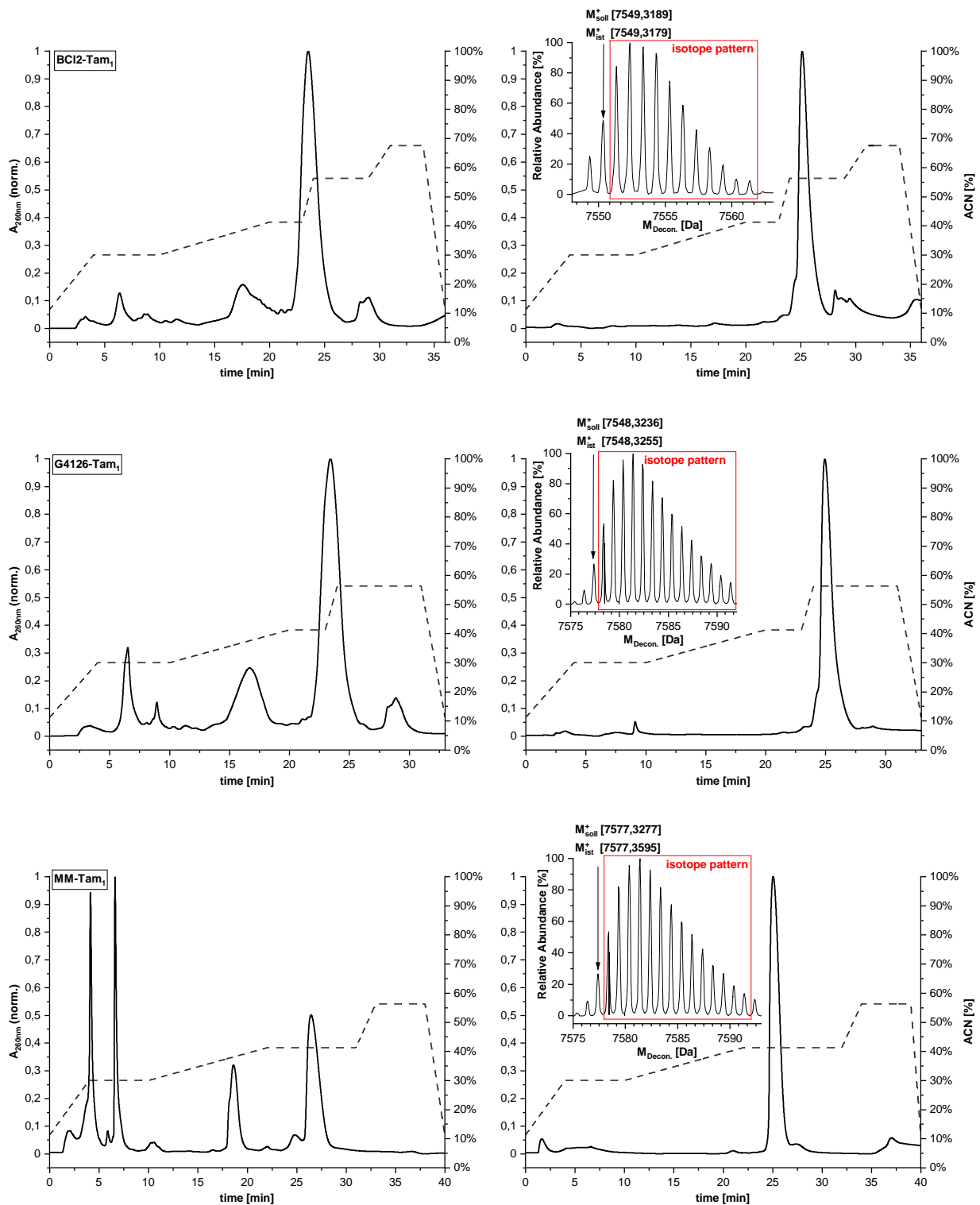


**Abb. 9.2:** Rohchromatogramm (links) und Reinchromatogramme (rechts) mit einem Ausschnitt des deconvulierten ESI-MS Spektrums (rechts) von ON **BCI2** (oben), **G4126** (mitte) und **MM** (unten).

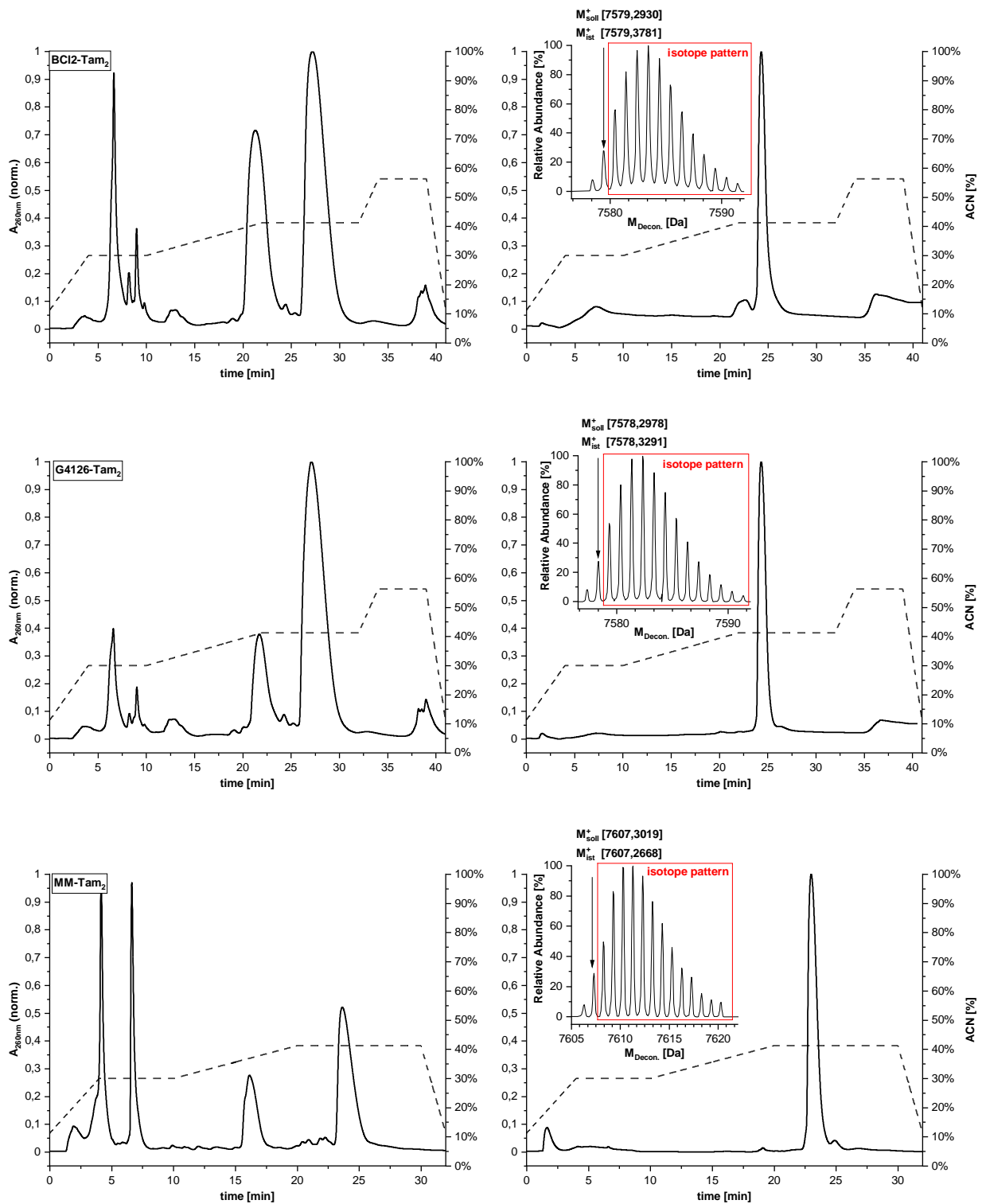




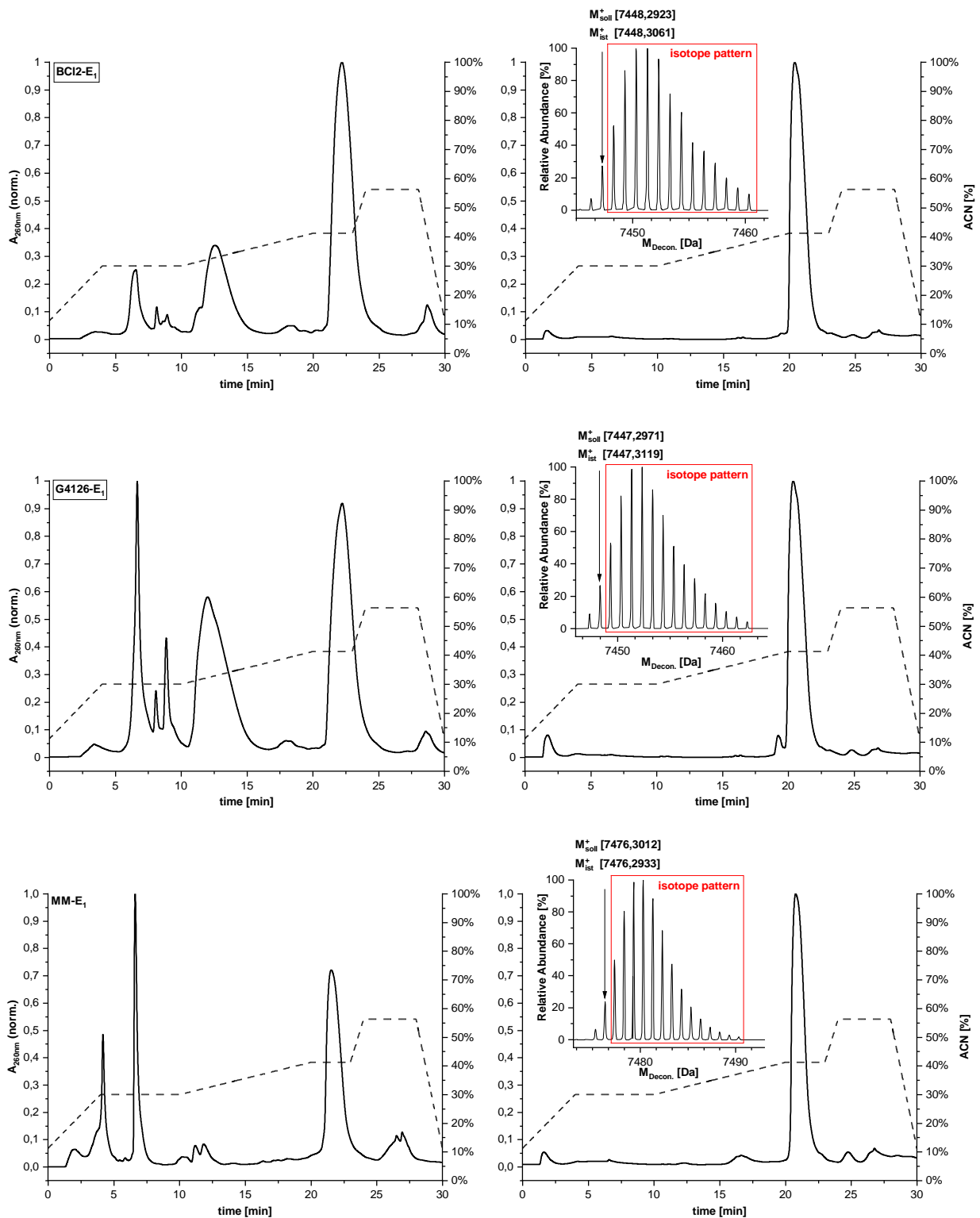
**Abb. 9.3:** Rohchromatogramm (links) und Reinchromatogramme (rechts) mit einem Ausschnitt des deconvulierten ESI-MS Spektrums (rechts) von ON **BC12-TEG** (oben), **G4126-TEG** (mitte) und **MM-TEG** (unten).



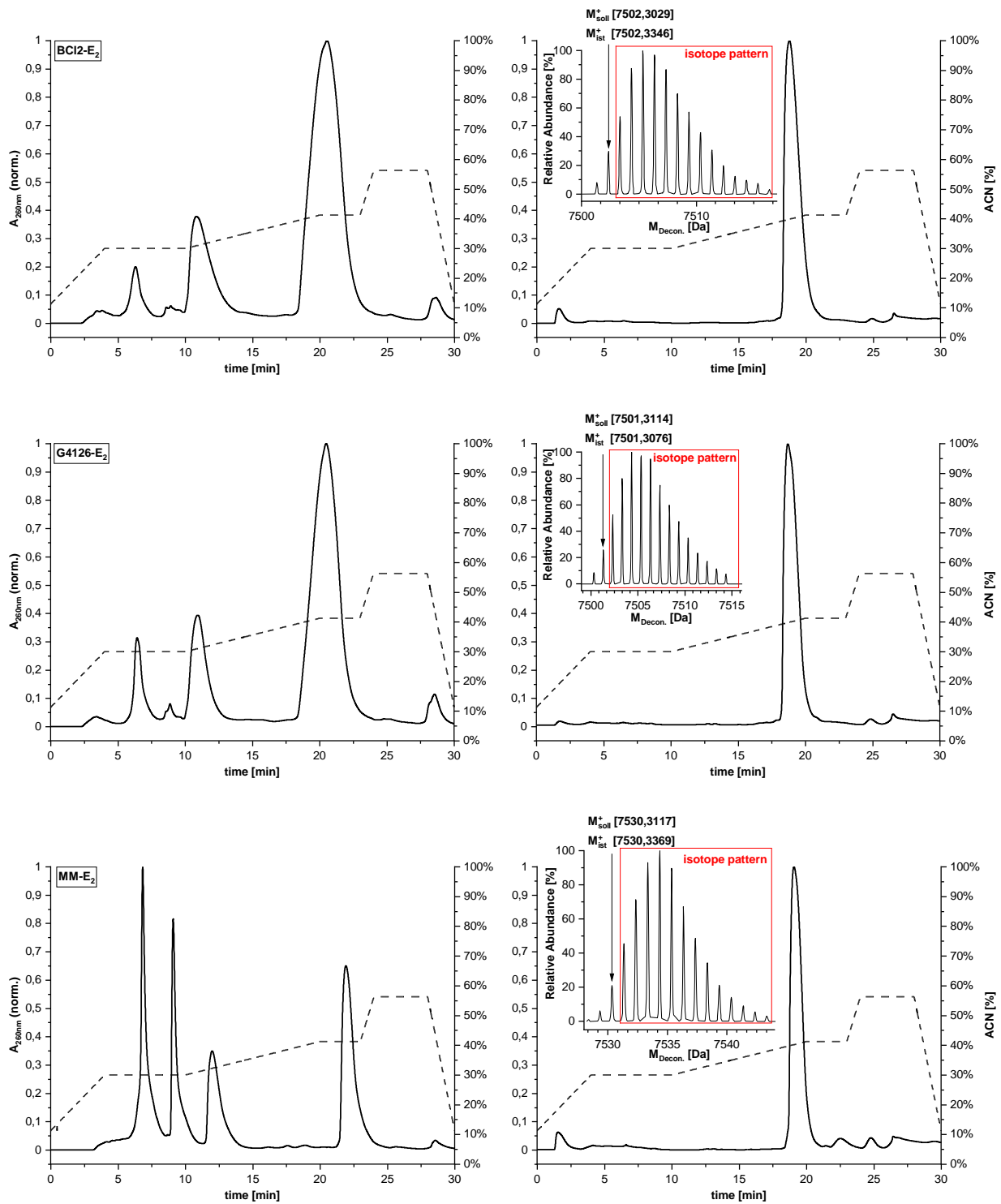
**Abb. 9.4:** Rohchromatogramm (links) und Reinchromatogramme (rechts) mit einem Ausschnitt des deconvulierten ESI-MS Spektrums (rechts) von ON **BCI2-Tam<sub>1</sub>** (oben), **G4126-Tam<sub>1</sub>** (mitte) und **MM-Tam<sub>1</sub>** (unten).



**Abb. 9.5:** Rohchromatogramm (links) und Reinchromatogramme (rechts) mit einem Ausschnitt des deconvulierten ESI-MS Spektrums (rechts) von ON **BCI2-Tam<sub>2</sub>** (oben), **G4126-Tam<sub>2</sub>** (mitte) und **MM-Tam<sub>2</sub>** (unten).

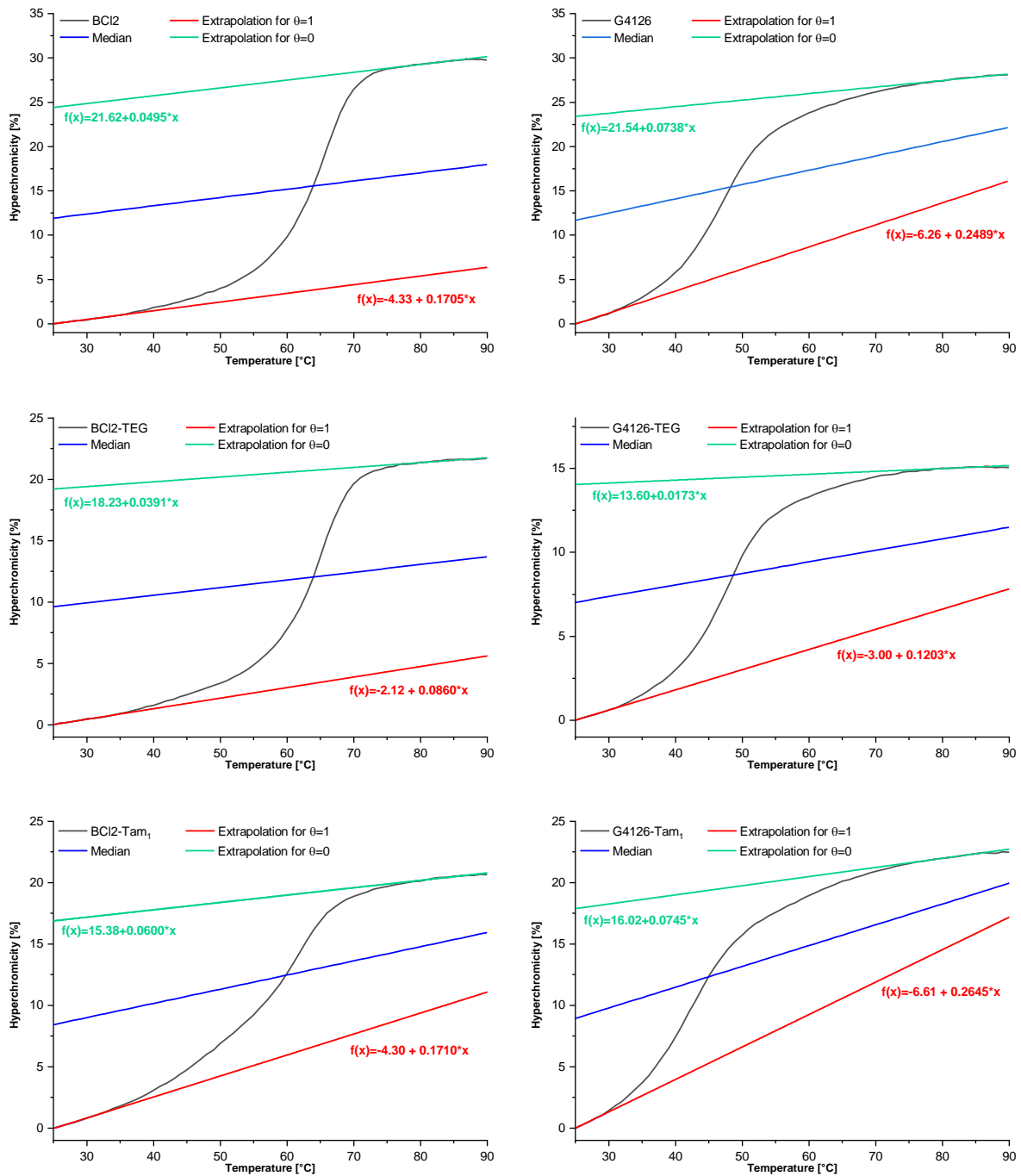


**Abb. 9.6:** Rohchromatogramm (links) und Reinchromatogramme (rechts) mit einem Ausschnitt des deconvulierten ESI-MS Spektrums (rechts) von ON **BCI2-E<sub>1</sub>** (oben), **G4126-E<sub>1</sub>** (mitte) und **MM-E<sub>1</sub>** (unten).

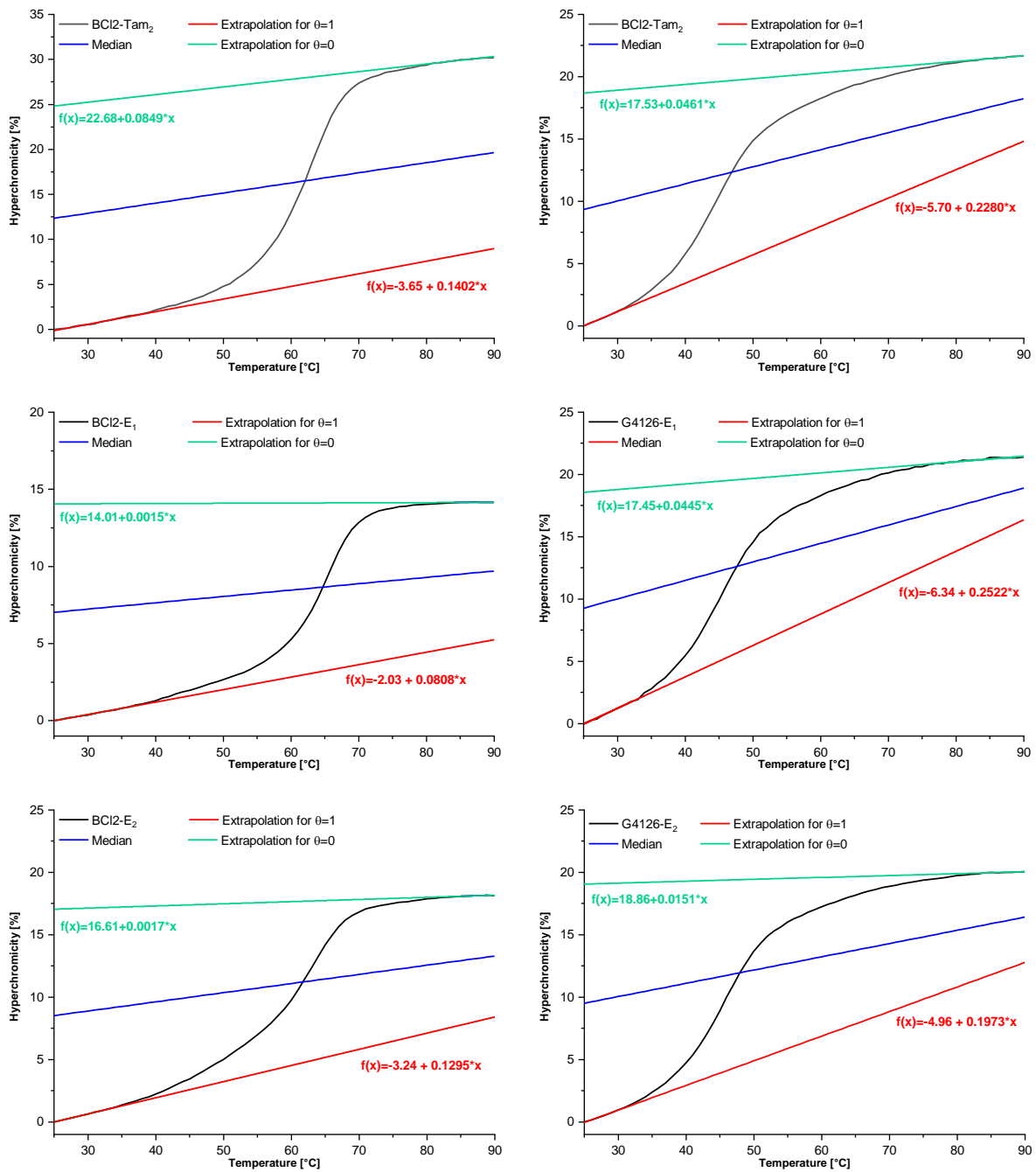


**Abb. 9.7:** Rohchromatogramm (links) und Reinchromatogramme (rechts) mit einem Ausschnitt des deconvulierten ESI-MS Spektrums (rechts) von ON **BCI2-E<sub>2</sub>** (oben), **G4126-E<sub>2</sub>** (mitte) und **MM-E<sub>2</sub>** (unten).

## 9.4 Schmelzkurven der Konjugate mit komplementärer mRNA

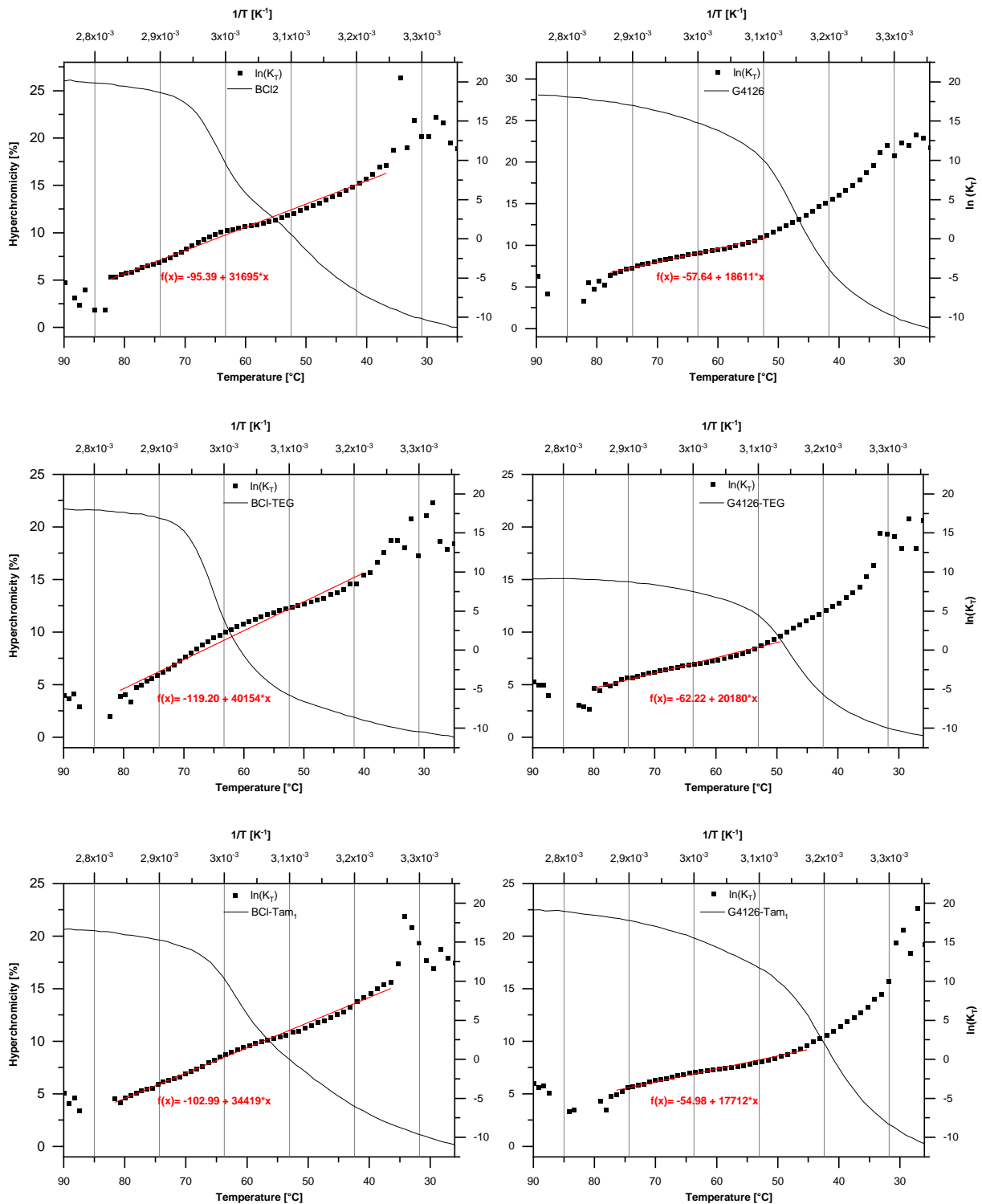


**Abb. 9.8:** Schmelzkurven (Mittel aus Triplikaten) der ONs **BCI2** (oben links) und **G4126** (oben rechts), **BCI2-TEG** (mitte links) und **G4126-TEG** (mitte rechts) sowie **BCI2-Tam<sub>1</sub>** (unten links) und **G4126-Tam<sub>1</sub>** (unten rechts) mit zur Bcl-2 Sequenz komplementären RNA.



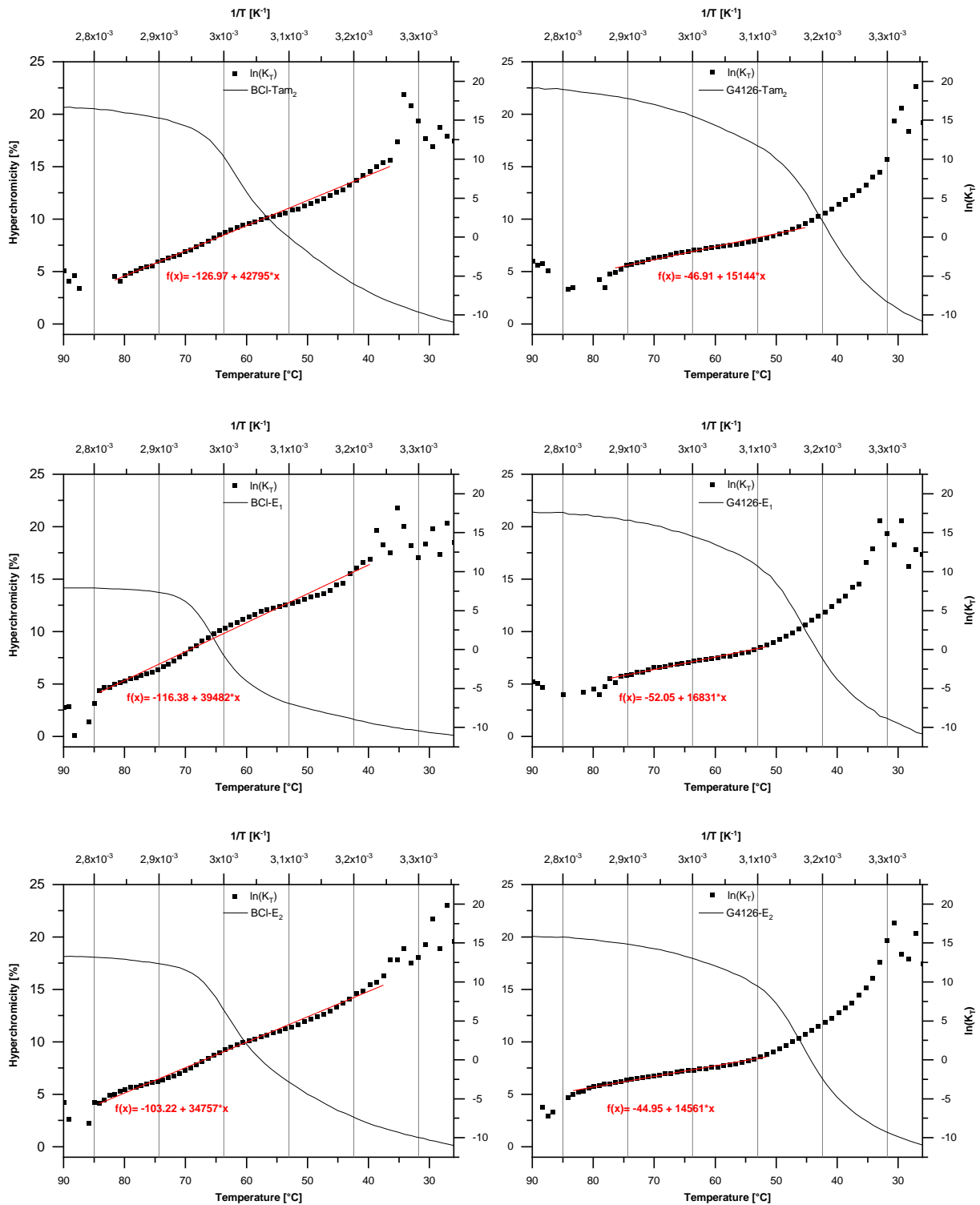
**Abb. 9.9:** Schmelzkurven (Mittel aus Triplikaten) der ONs **BCI2-Tam<sub>2</sub>** (oben links) und **G4126-Tam<sub>2</sub>** (oben rechts), **BCI2-E<sub>1</sub>** (mitte links) und **G4126-E<sub>1</sub>** (mitte rechts) sowie **BCI2-E<sub>2</sub>** (unten links) und **G4126-E<sub>2</sub>** (unten rechts) mit zur Bcl-2 Sequenz komplementären RNA.

## 9.5 Van't Hoff-Analyse



**Abb. 9.10:** Schmelzkurven (Mittel aus Triplikaten) und Arrhenius-Darstellung der ONs **BCI2** (oben links) und **G4126** (oben rechts), **BCI2-TEG** (mitte links) und **G4126-TEG** (mitte rechts) sowie **BCI2-Tam<sub>1</sub>** (unten links) und **G4126-Tam<sub>1</sub>** (unten rechts) mit zur Bcl-2 Sequenz komplementären RNA.





**Abb. 9.11:** Schmelzkurven (Mittel aus Triplikaten) und Arrhenius-Darstellung der ONs **BCI2-Tam<sub>2</sub>** (oben links) und **G4126-Tam<sub>2</sub>** (oben rechts), **BCI2-E<sub>1</sub>** (mitte links) und **G4126-E<sub>1</sub>** (mitte rechts) sowie **BCI2-E<sub>2</sub>** (unten links) und **G4126-E<sub>2</sub>** (unten rechts) mit zur Bcl-2 Sequenz komplementären RNA.

