Angewandte

Chemie www.angewandte.org

Zyklische Dinukleotide

Zitierweise: Angew. Chem. Int. Ed. 2024, 63, e202416353 doi.org/10.1002/anie.202416353

Ein Phosphotriester-Maskiertes Dideoxy-cGAMP-Derivat als Zellpermeabler STING-Agonist

Anna-Lena J. Halbritter⁺, Yasmin V. Gärtner⁺, Jahongir Nabiev, Fabian Hernichel, Giacomo Ganazzoli, Dilara Özdemir, Aikaterini Pappa, Simon Veth, Samuele Stazzoni, Markus Müller, Veit Hornung, und Thomas Carell^{*}

Abstract: 2'3'-zyklisches GMP-AMP (cGAMP) ist ein zyklischer Dinukleotid-Botenstoff, bei dem Guanosin und Adenosin durch eine 3'-5'- und eine 2'-5'-Phosphodiester-Bindung verbunden sind. Es wird im Zytosol bei der Erkennung pathogener DNA durch das Enzym Guanosin-Monophosphat-Adenosin-Monophosphat-Synthase (cGAS) gebildet. cGAMP bindet anschließend an das Adapterprotein Stimulator der Interferon-Gene (STING), um eine angeborene Immunantwort auszulösen, die zur Produktion von Typ-I-Interferonen und Zytokinen führt. STING-Agonisten sind ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine immunonkologische Krebstherapie. Eine besondere Herausforderung bei zyklischen Dinukleotid-STING-Agonisten sind die beiden negativen Ladungen der Phosphodiester-Bindungen, die die Fähigkeit, Zellmembranen zu durchdringen, stark einschränken. Die Entwicklung zellpermeabler STING-Agonisten, die das Immunsystem stimulieren können und damit ihre krebsbekämpfende Wirkung verstärken, ist derzeit von größter Bedeutung. Hier berichten wir über die Entwicklung eines Dideoxy-Derivats von cGAMP als Phosphotriester-Prodrug, bei dem die negative Ladung des Phosphatrückgrats durch einen Thioester maskiert wurde. Wir konnten feststellen, dass diese Thioester-geschützte Verbindung eine drastische Steigerung ihrer zellulären Wirksamkeit aufweist, die von $EC_{50} = 5 \mu M$ auf 25 nM ansteigt. Die neue Verbindung soll eine effiziente Krebstherapie auf der Basis von STING-Agonisten ermöglichen.

Zyklische Dinukleotide, die ursprünglich in Bakterien entdeckt wurden, sind potente sekundäre Botenstoffe, die inzwischen sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryoti-

[*] Dr. A.-L. J. Halbritter,⁺ Y. V. Gärtner,⁺ J. Nabiev, F. Hernichel, Dr. G. Ganazzoli, Dr. D. Özdemir, Dr. A. Pappa, Dr. S. Veth, Dr. S. Stazzoni, Dr. M. Müller, Prof. Dr. T. Carell Fachbereich Chemie, Institut für chemische Epigenetik

Ludwig-Maximilians-Universität München Butenandtstr. 5–13, 81377 München, Deutschland E-mail: Thomas.Carell@Imu.de schen Zellen nachgewiesen wurden.^[1-2] Kürzlich wurde beobachtet, dass die Präsenz von pathogener DNA im Zytosol, entweder als Reaktion auf eine Virusinfektion oder aufgrund der Freisetzung von Kern- oder Mitochondrien-DNA, zur Bildung des zyklischen Dinukleotids 2'3'-zyklisches Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat (cGAMP) führt (1, Abbildung 1A).^[3] Das Molekül wird durch das Enzym Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat-Synthase (cGAS) nach dessen Bindung an DNA gebildet. cGAS zyklisiert ein Adenosintriphosphat und ein Guanosintriphosphat zu einem zyklischen Dinukleotid mit einer 2'-5'und einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung. Diese im Zytosol gebildete Struktur enthält zwei negative Ladungen. Es bindet eng an ein Transmembranprotein des endoplasmatischen Retikulums, den Stimulator der Interferon-Gene



Abbildung 1. A) cGAMP **1**, dd-cGAMP **2** und das für diese Studie hergestellte Thioester-geschützte zyklische Dinukleotid **3**. B) Mechanismus der Abspaltung der Thioester-Schutzgruppe.

Prof. Dr. V. Hornung Genzentrum und Abteilung für Biochemie Ludwig-Maximilians-Universität München Feodor-Lynen-Str. 25, 81377 München, Deutschland

- [⁺] Diese Autoren haben gleichermaßen beigetragen.
- © 2024 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

© 2024 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

(STING), um eine angeborene Immunantwort auszulösen, die auf den angegriffenen Zustand der Zelle reagiert.^[4-6]

STING-Agonisten, die in der Lage sind, Zellmembranen zu überwinden, würden eine Möglichkeit bieten, das Immunsystem von außen zu stimulieren.^[7] Dies wiederum würde es ermöglichen, eine wirksame immunonkologische Behandlung als Teil einer Anti-Krebs-Therapie zu etablieren. Versuche, cGAMP oder dessen Derivate, bei denen die 2'- und 3'-Hydroxylgruppen durch Fluoratome oder die Phosphodiester durch Phosphothioate ersetzt wurden, zu diesem Zweck einzusetzen, waren jedoch bisher nicht erfolgreich.^[8-14]

Ein alternativer Ansatz besteht darin, die beiden Phosphodiester in Triester-Prodrugs umzuwandeln. Das beseitigt die Ladung, die das Eindringen in die Zelle behindert.^[15] Wenn der Triester in der Zelle in einen Diester gespalten werden könnte, würde dies die Freisetzung von cGAMP oder einem nahen Analogon und die Stimulierung des STING-Rezeptors ermöglichen. Ein gut etabliertes Konzept zur Maskierung von Phosphodiestern ist die Umwandlung in einen thioesterhaltigen Phosphotriester (Abbildung 1).^[16-17] Bei der Abspaltung des Thioesters entsteht nur vier Atome vom Phosphotriester entfernt ein Thioat, das zur spezifischen Spaltung der gewünschten P-O-Bindung führt (Abbildung 1B). Dieses Konzept hat den Nachteil, dass die 3'- und 2'-Hydroxylgruppen in cGAMP die Phosphotriester in deren unmittelbarer Nähe schnell angreifen würde, was zu einer intramolekularen Spaltung der Triester und damit zur Instabilität der Prodrug führt. Um dieses Problem zu umgehen, müssen die 2'- und 3'-Hydroxylgruppen entweder entfernt oder z.B. in F-Atome umgewandelt werden. Wir beschlossen, in einem ersten Versuch das Konzept der Entfernung dieser internen Nukleophile zu untersuchen, was zu der Zielverbindung Dideoxy (dd)-cGAMP (2, Abbildung 1A) 3 (Abbildung 1A) führte, bei der beide Phosphodiester als Phosphotriester maskiert sind. Um eine mögliche spätere Funktionalisierung der Triester-Schutzgruppe zu erleichtern, z.B. für die Anbringung von dirigierenden Einheiten durch Klick-Chemie, um die Effizienz der Bereitstellung zu erhöhen, beschlossen wir, die Schutzgruppe mit einer zusätzlichen terminalen Alkinfunktionalität auszustatten, indem wir einen 5-Hexinsäurethioester (HTE) (Abbildung 1A) an die Phosphodiester anfügten. Auf diese Weise entsteht eine neue Thioester-Schutzgruppe, die durch Klickreaktion funktionalisiert werden kann. Wir haben bereits gezeigt, dass Klick-Reaktionen an Oligonukleotiden mit außergewöhnlicher Effizienz ablaufen.^[18-20] Synthetisch haben wir zunächst die Referenzverbindung dd-cGAMP 2 hergestellt, über die wir bereits berichtet haben.^[21] Die Synthese des doppelt HTE-geschützten dd-cGAMP 3 begann mit Nukleosid 4 (Schema 1A), das gemäß den veröffentlichten Verfahren synthetisiert wurde (siehe Vorstufen in der SI).^[21-24] Da wir einen Thioester zur Abschirmung der negativen Ladung der Phosphate verwenden wollten, mussten wir eine Schutzgruppenstrategie für die exozyklischen Amine von Guanosin und Adenosin finden, die mit den Thioestern kompatibel ist. Wir entschieden uns für eine photolabile Schutzgruppe (PSG), ein 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl-Derivat (Schema 1C), für die N2-Position von Guanosin und die N6-Position von 3'-Deoxyguanosin 7 zu erhalten. Die TBS-Gruppen von 7 wurden entfernt, das 5'-Hydroxyl wurde als 4,4'-Dimethoxytritylether geschützt, und das 3'-Hydroxyl wurde phosphityliert, um Phosphoramidit 8 zu erhalten. Die HTE-Schutzgruppe (Schema 1D, 9) wurde mit 5-Hexinsäure 10 und 2-Mercaptoethanol 11 hergestellt und mit dem 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol (BTT)-Aktivator an das Phosphoramidit 8 (Schema 1A) gekoppelt. Das Phosphoramidit wurde oxidiert und schließlich wurde die Dimethoxytrityl (DMTr)-Gruppe an der 5'-Position unter sauren Bedingungen entfernt, wodurch Phosphotriester 12 entstand. Als nächstes gingen wir zum 2'-Desoxyadenosin-Baustein über und beschlossen, dieselbe PSG, die wir für die N2-Position von Guanosin verwendet hatten, zum Schutz der N6-Position von Adenosin einzusetzen. Die aktivierte PSG 6 wurde in ähnlicher Weise wie beim 3'-Desoxyguanosin an das N6 des TBSgeschützten Adenosins 13 (Schema 1B) eingebaut. Die TBS-Gruppen wurden anschließend entfernt, und das 5'-Hydroxyl wurde als 4,4'-Dimethoxytritylether geschützt, um Adenosin 14 zu erhalten. Das Nukleosid wurde mit dem HTE-Phosphor-Reagenz 15 (hergestellt aus 9) phosphityliert, wodurch HTE-Phosphoramidit 16 entstand. Der Guanosin-Baustein 12 und der Adenosin-Baustein 16 wurden mit BTT an das Phosphor-Rückgrat des Adenosins und an das 5'-Hydroxyl des Guanosins gekoppelt. Durch Oxidation des Phosphoramidits und Entfernung der DMTr-Gruppe am 5'-Hydroxyl entstand das linear gekoppelte Dinukleotid 17. Die Cyanoethylgruppe wurde entfernt, gefolgt von einer Zyklisierung, die zu dem zyklischen Dinukleotid 18 führte. Schließlich wurden die PSGs entfernt, um bis-HTE-ddcGAMP 3 zu erhalten. Anschließend untersuchten wir, ob die neu entwickelten HTE-Phosphotriester-Schutzgruppen an 3 durch Carboxylesterase-1 (CES1) gespalten werden, ein Enzym, das in

Adenosin. Erstens ist diese PSG orthogonal zu anderen

Schutzgruppen, die für die Synthese von 3 verwendet wer-

den, zweitens ist sie während der gesamten Synthese von 3

stabil und drittens lässt sie sich leicht durch Licht entfernen.

Wir verwendeten kommerziell erhältliches 4,5-Dimethoxy-2-

nitrobenzyl (Schema 1C, 5) als Ausgangspunkt und stellten

zunächst das aktivierte PSG 6 her. PSG 6 wurde dann mit

einem Kronenether unter basischen Bedingungen an der

N2-Position von 4 eingebaut, um das photolabil geschützte

Zellen mit hoher Stoffwechselaktivität wie Leberzellen, Monozyten, Makrophagen und Lungenzellen in erhöhtem Maße exprimiert wird und sogar in bestimmten Arten von Krebszellen wie Gallenblasen- und Leberkrebs überexprimiert ist.^[25–27] Für das Experiment wurde **3** mit dem gereinigten CES1-Enzym inkubiert und die Reaktion mittels HPLC verfolgt (Abbildung 2A). Zu unserer Freude konnten wir feststellen, dass die HTE-Gruppen tatsächlich effizient gespalten wurden (Abbildung 2A). Das Enzym spaltet den Thioester, gefolgt von der erwarteten Spaltung der richtigen P-O-Bindung (Abbildung 1B). Deutlich sichtbar ist die zeitabhängige Reduktion von bis-HTE-dd-cGAMP 3 (orange gepunktetes Kästchen) und die gleichzeitige Bildung zunächst des mono-geschützten Zwischenprodukts (schwarz gepunktetes Kästchen), bei dem nur eine HTE-Gruppe gespalten wurde, und anschließend von dd-cGAMP 2 (blau

© 2024 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH



Schema 1. A) Synthese von 3'-Deoxyguanosin 12. B) Synthese von bis-HTE-dd-cGAMP 3. C) Synthese der photolabilen Schutzgruppe 6. D) Synthese der HTE-Schutzreagenzien 9 und 15. Bedingungen: a) 6, 18-Krone-6, NaH, THF, 0°C – rt, 14 h, 61% Ausbeute; b) TBAF, THF, rt, 14 h, 84% Ausbeute; c) DMTrCl, DMAP, Pyridin, rt, 2 d, 77% Ausbeute; d) 2-Cyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidit, DIPAT, CH₂ Cl₂, rt, über Nacht; e) 1. BTT, CH₃ CN, rt, 2 h. 2. TBHP, rt, 30 min; f) 3% ν/ν DCA, CH₂ Cl₂, rt, 10 min, 58% Ausbeute; g) 7, 18-Krone-6, NaH, THF, 0°C – rt, 24 h, 85% Ausbeute; h) TBAF, THF, rt, über Nacht, 62% Ausbeute; i) DMTrCl, DMAP, Pyridin rt, 2 d, 82% Ausbeute; j) 16, DIPAT, CH₂ Cl₂, rt, über Nacht; k) 1. 12, 16, BTT, CH₃ CN, rt, 2 h. 2. TBHP, rt, 30 min; l) 3% ν/ν DCA, CH₂ Cl₂, rt, 10 min, 75% Ausbeute; m) tBuNH₂, CH₃ CN, rt, 30 min, 71% Ausbeute; q) DCC, CH₃ CN, 0°C – rt, über Nacht, 62% Ausbeute; n) 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid, NMI, THF, rt, 2 d, 58% Ausbeute; q) hv (365 nm), CH₃ CN, rt, 12 min, 63% Ausbeute p) CDI, THF, 0°C, 1 h, rt, 30 min, 71% Ausbeute; q) DCC, CH₃ CN, 0°C – rt, über Nacht, 62% Ausbeute; r) Bis(diisopropylamino)chlorophosphin, Et₃ N, Et₂ O, rt, 18 h, 92% Ausbeute. PSG: photolabile Schutzgruppe.



Abbildung 2. A) HPLC-Chromatogramme der *in vitro*-Spaltung von Bis-HTE-dd-cGAMP 3 durch das Enzym CES1 nach 0 Stunden (oben) und 24 Stunden (unten). Die Menge an 3 nimmt mit zunehmender Inkubationszeit in Gegenwart von CES1 ab (orange gestricheltes Kästchen). Gleichzeitig nimmt die Menge des ungeschützten dd-cGAMP 2 mit der Inkubationszeit zu (blau gestricheltes Kästchen) (siehe Abbildung S1für weitere Zeitpunkte). Während der Spaltung wird ein Zwischenprodukt beobachtet, das eine HTE-Schutzgruppe trägt (schwarzes gestricheltes Kästchen). B) Extrahierte Ionenchromatogramme, die die intrazelluläre Spaltung in THP1-Zellen nach 30 Minuten (oben) und 4 Stunden (unten) von 3 (links) bis 2 (rechts) darstellen. Nach 30 Minuten ist ein Peak für 3 und ein kleiner Peak des gespaltenen dd-cGAMP 2 zu sehen. Nach 4 Stunden ist ein kleiner Peak für 3, aber ein größerer Peak für 2 zu beobachten.

Angew. Chem. 2024, 136, e202416353 (3 of 6)

© 2024 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

gepunktetes Kästchen) mit seinen zwei negativen Ladungen (Abbildungen 2A und S1). Alle drei in der HPLC nachgewiesenen Spezies wurden während der Messung gesammelt und durch LC-MS-Analyse identifiziert (Abbildung S2). Wir konnten kein weiteres Reaktionsprodukt feststellen, was zeigt, dass die Spaltung ein sauberer Prozess ohne die Bildung von linearisierten Dinukleotid-Nebenprodukten ist. Solche Verbindungen würden auf eine unerwünschte P-O-Bindungsspaltung der 2'- oder 3'-Desoxyribose-Einheiten hinweisen. Als nächstes haben wir die intrazelluläre Spaltung der HTE-Gruppen untersucht. Für dieses Experiment behandelten wir THP1-Zellen mit bis-HTE-dd-cGAMP 3 und ernteten sie zu verschiedenen Zeitpunkten. Anschließend extrahierten wir die zellulären Metaboliten, stellten eine Fraktion mit angereicherten kleinen Molekülen her und analysierten sie mittels HPLC-MS (Abbildung 2B) unter Verwendung der entsprechenden Massenfilter. Nach 30 Minuten (Abbildung 2B, oben) kann ein Peak für 3 (Abbildung 2B, links) und ein kleiner Peak des Spaltprodukts 2 (Abbildung 2B, oben) nachgewiesen werden. Nach 4 Stunden (Abbildung 2B, unten) war bereits eine beträchtliche Menge von 3 in die vollständig entschützte Verbindung dd-cGAMP 2 umgewandelt. Eine kleine Menge der ursprünglichen Verbindung konnte jedoch immer noch nachgewiesen werden, wahrscheinlich aufgrund des permanenten Zustroms in die Zellen. Es ist zu beachten, dass das intrazellulär gebildete dd-cGAMP 2 zu diesem Zeitpunkt zwei negative Ladungen aufweist, was sein passives Entweichen durch die Zellmembran erschwert. Somit ist ddcGAMP 2 gefangen und sammelt sich in der Zelle an.

Um die Fähigkeit der Verbindungen, STING zu aktivieren, zu messen, führten wir eine konzentrationsabhängige Studie der Interferon (IFN)-Reaktion durch. Zu diesem Zweck verwendeten wir die Reporterzelllinie THP1-DualTM (InvivoGen). Diese Zellen verfügen über eine sekretierte Luziferase unter der Kontrolle eines IFN-responsiven Promotors, so dass die STING-vermittelte Induktion des Signalwegs des IFN-regulatorischen Faktors (IRF) über eine Biolumineszenz-Auslesung überwacht werden kann. Um sicherzustellen, dass das Luziferase-Signal tatsächlich von der Aktivierung des STING-Signalwegs abhängt, wurden auch STING-defiziente THP1-Dual[™] KO-STING-Zellen (InvivoGen) mit demselben Reportersystem mit bis-HTEdd-cGAMP 3 behandelt, wodurch die Abhängigkeit der IFN-Produktion von der Anwesenheit von STING vollständig bestätigt wurde (Abbildung S4).

Die erhaltenen EC_{50} Kurven und Daten sind in Abbildung 3 und Tabelle 1 dargestellt. Wir haben den zuvor berichteten EC_{50} Wert von dd-2'3'-cyclischem Adenosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat (cAAMP) einbezogen, der 15-mal höher ist als die Desoxy-Version des natürlichen Liganden cGAMP.^[21] Die Stammverbindung dd-cGAMP **2** hat jedoch immer noch einen schlechten EC_{50} Wert von 5 µM, was zeigt, dass sie kaum in der Lage ist, eine Immunantwort *in cellulo* und vermutlich auch nicht *in vivo* auszulösen. Zu unserer Freude stellten wir jedoch fest, dass bis-HTE-geschütztes dd-cGAMP **3** einen hervorragenden EC_{50} Wert von 25 nM aufweist. Es ist eine Überraschung, dass die großen HTE-Schutzgruppen die zelluläre Aufnah-



Abbildung 3. Dosisabhängige Reaktion von THP1-Dual[™] Zellen auf ddcGAMP 2 (orange) und bis-HTE -dd-cGAMP 3 (grün) im Vergleich zu dem natürlichen STING-Liganden cGAMP 1 (blau). Die Punkte stellen den Mittelwert von mindestens drei biologisch unabhängigen Experimenten dar, die Schattierung entspricht dem 95 %-Konfidenzintervall (CI).

Tabelle 1: EC_{so} Werte der Dinukleotide **1–3** und des zuvor berichteten cGAMP-Analogons dd-cAAMP.^[21] Die EC_{so} Werte stellen den Mittelwert von mindestens drei biologisch unabhängigen Experimenten in THP1-DualTM monozytischen Reporterzellen dar.

C50 (nM)
619±2296
$400 \pm 4600^{[21]}$
/22±492
1.6±1.2

me nicht behindern und dass sie außerdem innerhalb der Zelle so effizient gespalten werden.

Um ein umfassenderes Verständnis der globalen Auswirkungen unseres neuen Wirkstoffs auf Immunzellen zu erlangen, behandelten wir die unmodifizierte Stammzelllinie THP1 für 18 Stunden mit bis-HTE-geschütztem dd-cGAMP **3**, bevor wir eine Proteomanalyse durchführten (Abbildung 4).

Die signifikante Hochregulierung von Proteinen, die rot hervorgehoben sind, zeigt die Gesamtauswirkung unserer Behandlung auf das zelluläre Proteom. Zur weiteren Untersuchung der biologischen Prozesse, die durch die Behandlung beeinflusst wurden, führten wir eine funktionelle Annotationsgruppierung mit Hilfe der Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DA-VID) durch.^[28] Die Analyse ergab, dass die hochregulierten Proteine hauptsächlich in drei Gruppen eingeteilt werden können, die alle mit immunologischen Prozessen in Verbindung stehen. Bemerkenswert ist, dass mit wenigen Ausnahmen alle hochregulierten Proteine mit mindestens einer dieser Gruppen verbunden sind, was die signifikante Auswirkung der Behandlung mit bis-HTE-geschütztem ddcGAMP 3 auf immunologische Prozesse verdeutlicht. Eine umfassende Liste der Proteine in diesen Gruppen befindet sich in Tabelle S1.

Zusammenfassend berichten wir über die Synthese und biologische Bewertung von dd-cGAMP, bei dem die negati-



Abbildung 4. Ein Vulkandiagramm zur Darstellung der unterschiedlich exprimierten Proteine in THP1-Zellen, die 18 Stunden lang mit bis-HTE-dd-cGAMP **3** behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (n=4). Proteine mit signifikanter Hochregulierung (*Cut-off p*-Wert 0,05 und Fold-Change > 2) sind rot hervorgehoben. Die DAVID-Analyse identifizierte 3 stark angereicherte Cluster innerhalb dieser Gruppe. Cluster-spezifische Proteine sind wie folgt dargestellt: Proteine in Cluster 1 werden durch blaue Punkte dargestellt, solche in Cluster 1 und 2 durch blaue Rechtecke, und Proteine, die in allen 3 Clustern vorkommen, sind gekennzeichnet und als grüne Rechtecke mit blauem Rand dargestellt.

ven Ladungen der verbindenden Phosphodiester durch Umwandlung in HTE-geschützte Phosphotriester entfernt wurden. Diese neutrale Verbindung zeichnet sich durch einen stark verbesserten EC_{50} Wert aus, wodurch sie sich für die Entwicklung immunstimulierender Wirkstoffe eignet, die uns bei der Krebsbekämpfung mit Hilfe immunonkologischer Ansätze helfen kann. Studien zum Konjugieren von dirigierenden Liganden an Verbindung **3** mittels Klick-Chemie für eine effiziente Verabreichung sind im Gange.

Danksagung

Wir danken dem Kielkowski-Labor für seine großzügige Unterstützung bei der Massenspektrometrie. Außerdem danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung durch CRC1309 (Projekt-ID 325871075), CRC1361 (Projekt-ID 893547839), CRC TRR 237 (Projekt-ID 369799452) und GRK2338 (Projekt-ID 321812289). Dieses Projekt wurde vom Europäischen Forschungsrat (ERC) im Rahmen des Forschungs- und Innovationsprogramms Horizont 2020 der Europäischen Union unter der Finanzhilfevereinbarung Nr. 741912 (EpiR) und der Marie-Skłodowska-Curie-Finanzhilfevereinbarung Nr. 642023 gefördert. Diese Arbeit wurde außerdem durch das internationale Graduiertenprogramm RNAmed unterstützt. Wir sind dankbar für die zusätzliche Finanzierung durch die Volkswagen-Stiftung. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die in dieser Veröffentlichung besprochenen Daten sind in der Supporting Information verfügbar. Proteomdaten wurden beim ProteomeXchange-Konsortium auf PRIDE hinterlegt^[29] mit dem Datensatz-Identifikator PXD057395 hinterlegt.

Stichwörter: zyklische Dinukleotide • Immuno-Onkologie • Prodrugs • STING-Agonisten • Thioester.

- [1] A. Decout, J. D. Katz, S. Venkatraman, A. Ablasser, *Nat. Rev. Immunol.* 2021, 21, 548–569.
- [2] P. Gao, M. Ascano, Y. Wu, W. Barchet, B. L. Gaffney, T. Zillinger, A. A. Serganov, Y. Liu, R. A. Jones, G. Hartmann, T. Tuschl, D. J. Patel, *Cell* **2013**, *153*, 1094–1107.
- [3] K. N. Miller, S. G. Victorelli, H. Salmonowicz, N. Dasgupta, T. Liu, J. F. Passos, P. D. Adams, *Cell* 2021, 184, 5506–5526.
- [4] A. Ablasser, M. Goldeck, T. Cavlar, T. Deimling, G. Witte, I. Rohl, K. P. Hopfner, J. Ludwig, V. Hornung, *Nature* 2013, 498, 380–384.
- [5] L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, Z. J. Chen, Science 2013, 339, 786–791.
- [6] J. Wu, L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen, Z. J. Chen, *Science* 2013, 339, 826–830.
- [7] L. Li, Q. Yin, P. Kuss, Z. Maliga, J. L. Millan, H. Wu, T. J. Mitchison, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1043–1048.
- [8] W. Chang, M. D. Altman, C. A. Lesburg, S. A. Perera, J. A. Piesvaux, G. K. Schroeder, D. F. Wyss, S. Cemerski, Y. Chen, E. DiNunzio, A. M. Haidle, T. Ho, I. Kariv, I. Knemeyer, J. E. Kopinja, B. M. Lacey, J. Laskey, J. Lim, B. J. Long, Y. Ma, M. L. Maddess, B. S. Pan, J. P. Presland, E. Spooner, D. Steinhuebel, Q. Truong, Z. Zhang, J. Fu, G. H. Addona, A. B. Northrup, E. Parmee, J. R. Tata, D. J. Bennett, J. N. Cumming, T. Siu, B. W. Trotter, J. Med. Chem. 2022, 65, 5675–5689.
- [9] Q. Chen, L. Sun, Z. J. Chen, Nat. Immunol. 2016, 17, 1142– 1149.
- [10] K. M. Garland, T. L. Sheehy, J. T. Wilson, Chem. Rev. 2022, 122, 5977–6039.
- [11] M. Jiang, P. Chen, L. Wang, W. Li, B. Chen, Y. Liu, H. Wang, S. Zhao, L. Ye, Y. He, C. Zhou, *J. Hematol. Oncol.* 2020, 13, 81.
- [12] T. Lioux, M. A. Mauny, A. Lamoureux, N. Bascoul, M. Hays, F. Vernejoul, A. S. Baudru, C. Boularan, J. Lopes-Vicente, G. Qushair, G. Tiraby, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10253–10267.
- [13] Z. Wang, C. Zhao, C. Wang, H. Zhang, D. Ma, Q. Zhang, X. Wen, L. Li, Z. Xi, *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, 29, 115899.
- [14] H. Zhang, Q. D. You, X. L. Xu, J. Med. Chem. 2020, 63, 3785– 3816.
- [15] J. A. Carozza, V. Böhnert, K. C. Nguyen, G. Skariah, K. E. Shaw, J. A. Brown, M. Rafat, R. von Eyben, E. E. Graves, J. S. Glenn, M. Smith, L. Li, *Nat. Cancer* **2020**, *1*, 184–196.
- [16] S. Peyrottes, D. Egron, I. Lefebvre, G. Gosselin, J. L. Imbach, C. Périgaud, *Mini-Rev. Med. Chem.* 2004, 4, 395–408.
- [17] Z. Xie, L. Lu, Z. Wang, Q. Luo, Y. Yang, T. Fang, Z. Chen, D. Ma, J. Quan, Z. Xi, *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 243, 114796.

Angew. Chem. 2024, 136, e202416353 (5 of 6)

^{© 2024} Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

GDCh

- [18] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, Org. Lett. 2006, 8, 3639–3642.
- [19] P. M. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 3442–3444.
- [20] J. Gierlich, K. Gutsmiedl, P. M. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* 2007, 13, 9486–9494.
- [21] S. Stazzoni, D. F. R. Böhmer, F. Hernichel, D. Özdemir, A. Pappa, D. Drexler, S. Bauernfried, G. Witte, M. Wagner, S. Veth, K.-P. Hopfner, V. Hornung, L. M. König, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202207175.
- [22] F. Hulpia, S. V. Calenbergh, G. Caljon, L. Maes, WO2019076633 (Hrsg.: U. A. Universiteit Gent), 2019.
- [23] H. An, E. Gunic, Y.-H. Koh, H. Chen, D. Barawkar, W. Zhang, J.-L. Girardet, F. Rong, Z. Hong, WO2003051881 A1 (Hrsg.: R. Inc.), 2003.
- [24] M. J. Robins, R. Zou, Z. Guo, S. F. Wnuk, J. Org. Chem. 1996, 61, 9207–9212.
- [25] J. A. Crow, K. L. Herring, S. Xie, A. Borazjani, P. M. Potter, M. K. Ross, *Biochim. Biophys. Acta* 2010, 1801, 31–41.

- [26] M. Nagaoka, Y. Sakai, M. Nakajima, T. Fukami, *Biochem. Pharmacol.* 2024, 223, 116128.
- [27] D. Wang, L. Zou, Q. Jin, J. Hou, G. Ge, L. Yang, Acta Pharm. Sin. B 2018, 8, 699–712.
- [28] B. T. Sherman, M. Hao, J. Qiu, X. Jiao, M. W. Baseler, H. C. Lane, T. Imamichi, W. Chang, *Nucleic Acids Res.* 2022, 50, W216–w221.
- [29] Y. Perez-Riverol, J. Bai, C. Bandla, D. García-Seisdedos, S. Hewapathirana, S. Kamatchinathan, D. J. Kundu, A. Prakash, A. Frericks-Zipper, M. Eisenacher, M. Walzer, S. Wang, A. Brazma, J. A. Vizcaíno, *Nucleic Acids Res.* 2022, 50, D543– d552.

Manuskript erhalten: 26. August 2024

Akzeptierte Fassung online: 12. November 2024 Endgültige Fassung online: 25. November 2024