

Zum Wirkungsbereich der chemischen Synthese: Aufbau einer Minipipeline in einem akademischen Labor

Rebecca M. Wilson und Samuel J. Danishefsky*

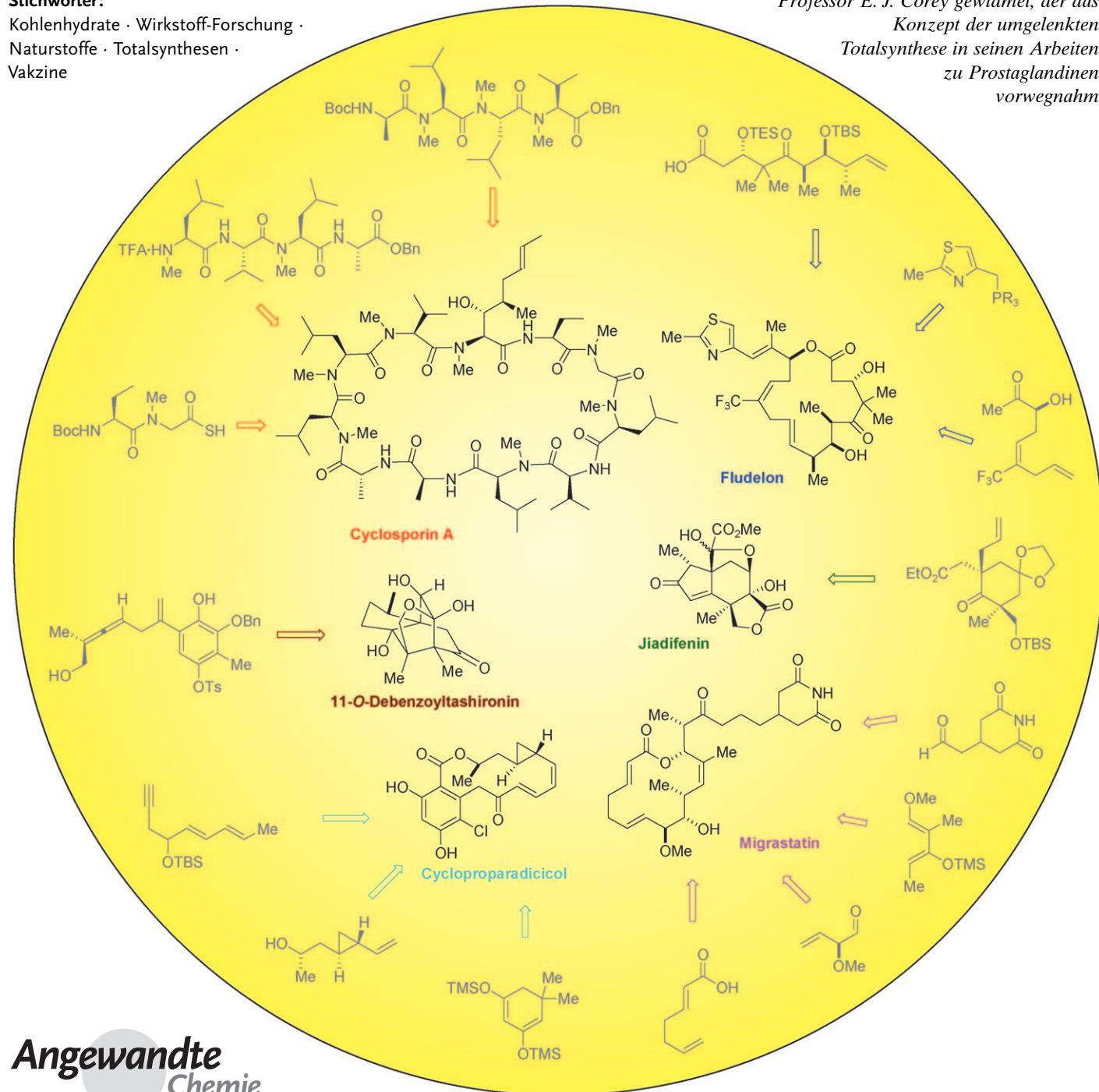
Stichwörter:

Kohlenhydrate · Wirkstoff-Forschung ·

Naturstoffe · Totalsynthesen ·

Vakzine

Professor E. J. Corey gewidmet, der das Konzept der umgelenkten Totalsynthese in seinen Arbeiten zu Prostaglandinen vorwegnahm



In dieser Retrospektive erinnern wir an einige ausgewählte Beispiele für die Synergie zwischen der sehr anspruchsvollen chemischen Synthese und der Identifizierung von neuen vielversprechenden Wirkstoff-Kandidaten als potenzielle Pharmazeutika. Die Weiterentwicklung von oft niedermolekularen Zielverbindungen zu solchen, deren Größe normalerweise mit biologischen Wirkstoffen assoziiert ist, wird ebenfalls dargelegt.

1. Einleitung

1.1. Niedermolekulare Naturstoffe in der Wirkstoff-Forschung

Der Reichtum an Naturstoffen ist eine unschätzbare Quelle bei der Suche nach neuen Leitstrukturen für potenzielle Therapeutika. Obwohl das Interesse der Pharmaindustrie an einer Wirkstoffentwicklung auf der Basis von Naturstoffen in den letzten Jahren erheblich abgenommen hat,^[1] muss zugegeben werden, dass bemerkenswert viele der Neuzulassungen (new chemical entities, NCEs) in den vergangenen 20 Jahren niedermolekulare Naturstoffe (small molecule natural products, SMNPs) waren oder auf diesen basierten.^[2] Tatsächlich sind viele der zugelassenen Wirkstoffe entweder selbst Naturstoffe oder sie stehen in eindeutigem Zusammenhang mit einer natürlichen Stammverbindung. Beispielsweise stammten Taxol,^[3] Rapamycin^[4] und Vancomycin^[5] zuerst aus natürlichen Quellen, dagegen wurden Cabergolin und Zocor^[6] durch Strukturveränderungen von biologisch wirksamen Naturstoffen entwickelt (Schema 1). Manchmal kann das zentrale Pharmakophor des SMNP auf eine völlig neue Strukturanordnung transferiert werden, wie das Beispiel von Lipitor zeigt.^[7] Wir bezeichnen diese Art von Wirkstoffen als SMNP-inspiriert.

Trotz der seitens der Pharmaindustrie fehlenden Begeisterung für die Naturstoff-Forschung sind SMNPs weiterhin eine wertvolle Quelle für Leitverbindungen in der Wirkstoff-Forschung. Der Grund dafür sind wahrscheinlich einige, den SMNPs eigene spezielle Eigenschaften, die auf ihre Biosynthese und Aufrechterhaltung in lebenden Wirtszellen zurückgehen und sie auch zu vielversprechenden Therapeutika machen. Die Biosynthese und evolutionäre Optimierung von SMNPs dient vermutlich dem Zweck, mit Proteinen wie Enzymen oder Rezeptoren in Wechselwirkung zu treten. Selbstverständlich werden therapeutische Wirkstoffe normalerweise so entwickelt, dass sie exakt an diese Arten von Biomolekülen binden. Außerdem bietet ein SMNP zu Beginn der Wirkstoffentwicklung eindeutig einen Vorteil, da es definitionsgemäß aus einem lebenden System stammt. Angeichts der hohen Ausfallquote von Wirkstoffen aufgrund von Unverträglichkeiten sollte auch der Verträglichkeit in einem biologischen Wirt Bedeutung beigemessen werden.

Trotz der potenziellen Vorteile, die SMNPs bieten, kommt es natürlich recht selten vor, dass sich der Naturstoff selbst als ideales therapeutisches Mittel erweist. Im Allgemeinen kann das Strukturgerüst des biologisch wirksamen SMNP als eine nützliche, fortgeschrittene Ausgangsverbindung für die Ent-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	6169
2. Totalsynthese und DTS von niedermolekularen Naturstoffen (SMNPs)	6171
3. Potenzielle therapeutische Biologika durch chemische Synthese	6180
4. Schlussbemerkungen	6191

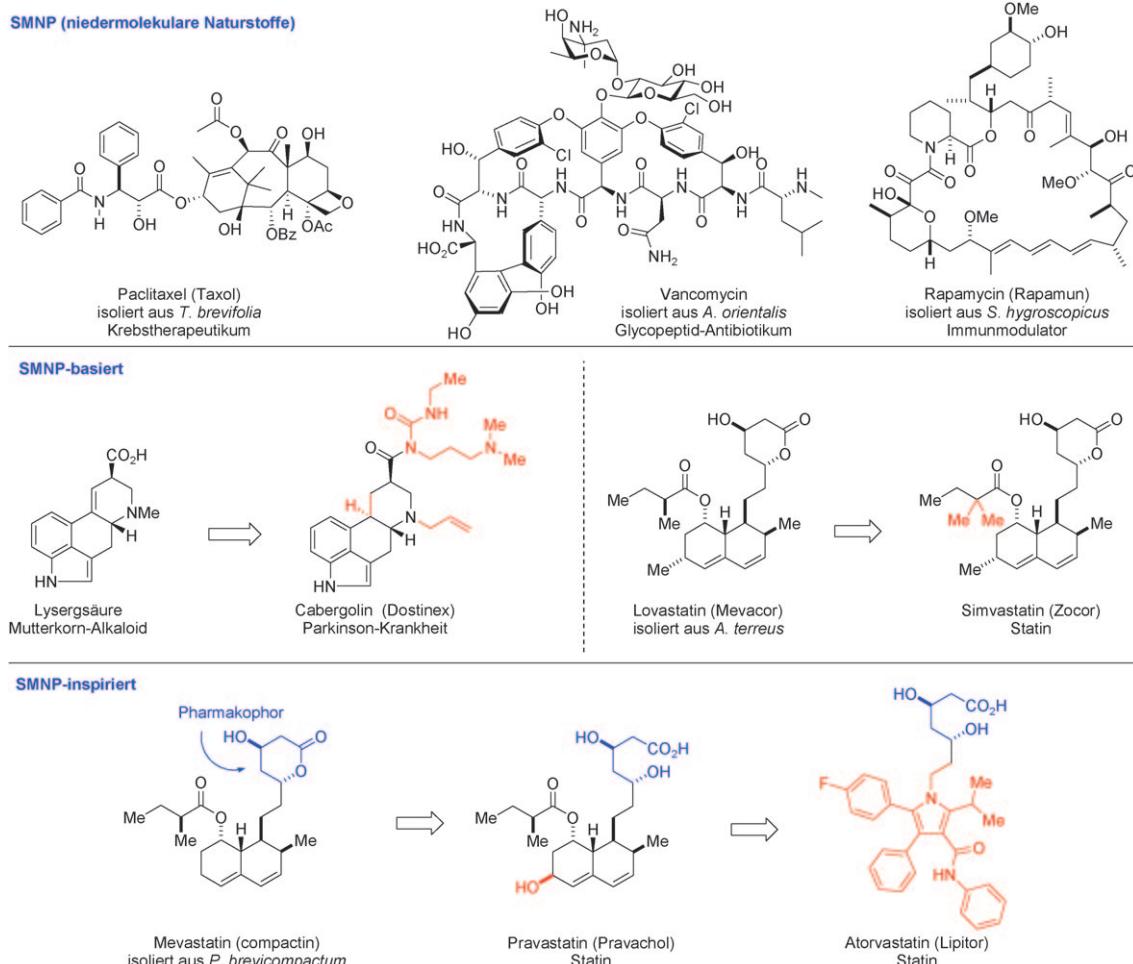
wicklung des optimalen Wirkstoff-Kandidaten angesehen werden,^[8] weil die biologische Zielsubstanz des SMNP und die spezifischen Biotargets, die für ein potenzielles Pharmazeutikum besonders interessant sind, wahrscheinlich nicht zwingend miteinander zusammenhängen. Außerdem muss das vom Wirtsorganismus produzierte SMNP als eine Konkurrenzstruktur betrachtet werden, die zwar die Optimierung einer biologischen Wirkung repräsentiert, aber praktischen Zwängen durch das Biosynthesevermögen des Wirtssystems unterliegt. Solche neuen Biosynthesewege werden nicht ohne weiteres geändert, wenn sie ausschließlich den wirtseigenen Verfahren überlassen bleiben.

Das biologisch aktive SMNP sollte als eine wertvolle, aber nicht unbedingt optimierte pharmakophore Basis betrachtet werden. Es ist das Ziel der medizinischen Chemie, wichtige Strukturmerkmale zu identifizieren, auf denen eine gewünschte biologische Wirkung beruht. Außerdem müssen innerhalb des SMNP die funktionellen Gruppen bestimmt werden, die im Hinblick auf die pharmazeutische Verwendung entbehrlich oder sogar unerwünscht sind. Damit hat ein Chemiker in gewissem Sinn beträchtliche Vorteile gegenüber der Natur, was den zeitlichen Rahmen für Molekülveränderungen durch Totalsynthese betrifft.

1.2. Totalsynthese und umgelenkte Totalsynthese in der Wirkstoff-Forschung

Bei der Abgrenzung verschiedener Strukturkomponenten des SMNP wird man sich vielleicht erstmals bewusst, über welches unglaubliche Leistungsvermögen die chemische Synthese und besonders die als „umgelenkte Totalsynthese“ (diverted total synthesis, DTS) bezeichnete Methode verfügen.^[9] Durch Rückgriff auf die chemische De-novo-Synthese

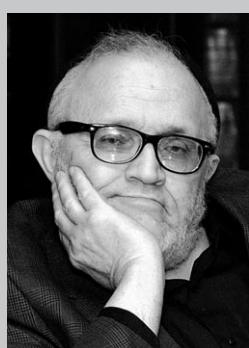
[*] R. M. Wilson, Prof. S. J. Danishefsky
Laboratory for Bioorganic Chemistry,
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research
1275 York Avenue, New York, NY 10065 (USA)
E-Mail: s-danishefsky@ski.mskcc.org
Prof. S. J. Danishefsky
Department of Chemistry, Columbia University
Havemeyer Hall, 3000 Broadway, New York, NY 10027 (USA)



Schema 1. Beispiele für niedermolekulare Naturstoffe in der Wirkstoff-Forschung.

ist es möglich, die durch den Biosyntheseweg vorgegebenen Einschränkungen zu umgehen und so Strukturmotive zugänglich machen, die durch Veränderungen des Naturstoffs selbst nicht erhältlich wären. Das in Abbildung 1 skizzierte DTS-Konzept ist erfreulich unkompliziert. Beispielsweise könnte die Totalsynthese eines biologisch interessanten Naturstoffs **C** in Angriff genommen werden. Auf dem Weg zu

diesem Naturstoff würde man vielleicht eine fortgeschrittene Zwischenstufe **B** synthetisieren. Die Verwendung von **B** könnte interessant sein, um zu **D** zu gelangen, das chemisch komplexer ist als der Naturstoff selbst, oder um das Analogon **E** mit niedrigerer Komplexität herzustellen. Diese Strukturtypen sind oft nicht aus dem Naturstoff selbst erhältlich, weil keine entsprechenden Synthesemethoden zur Verfügung



Samuel J. Danishefsky erhielt seinen B.S. an der Yeshiva University und promovierte bei Professor Peter Yates. 1963 begann er seine akademische Laufbahn als Dozent an der University of Pittsburgh, wo er 1971 Professor wurde. 1980 wechselte an die Yale University und wurde 1981 zum Eugene Higgins Professor ernannt. 1990 wurde er Sterling Professor in Yale und ging 1993 nach New York als Professor für Chemie (jetzt Centenary Professor) an der Columbia University und als Kettering Professor am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. 1996 erhielt er gemeinsam mit Professor Gilbert Stork den Wolf-Preis für Chemie. 2006 wurden ihm die Franklin-Medaille für Chemie, der Bristol Myers Squibb Lifetime Achievement Award für Chemie und der National Academy of Sciences Award für Chemiewissenschaften verliehen.



Rebecca M. Wilson studierte Biochemie an der Tufts University. Sie wechselte an die University of California at Berkeley und danach an das Caltech, wo sie bei Professor David MacMillan an der Entwicklung von organokatalytischen enantioselektiven intramolekularen Diels-Alder-Reaktionen forschte. Nach Abschluss ihres Studiums bei Prof. MacMillan bearbeitete sie bei Amgen Pharmaceuticals in der Projektgruppe über niedermolekulare Verbindungen analytische und regulatorische Themen. Seit 2004 arbeitet sie bei Professor Samuel Danishefsky am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, wo sie an verschiedenen Projekten zur chemischen Synthese und ihrer zunehmenden Bedeutung für Impfstoffe und niedermolekulare Wirkstoffe beteiligt ist.

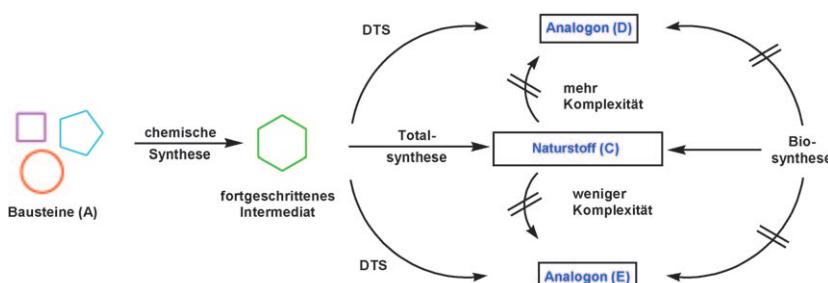


Abbildung 1. Umgelenkte Totalsynthese (DTS).

stehen. So könnte man mithilfe der DTS ein Struktur-Aktivitäts-Profil des Naturstoffs erstellen. Für die DTS-Strategie spricht auch die Auffassung, dass SMNPs generell als privilegierte, hoch entwickelte Stammstrukturen betrachtet werden können.

1.3. Biologika als Zielverbindungen der Totalsynthese

Die Konzepte von Totalsynthese und umgelenkter Totalsynthese stehen zwar traditionell im Zusammenhang mit niedermolekularen Naturstoffen (SMNPs), sind aber auch für sehr viel größere Biomoleküle wie Proteine und Oligosaccharide relevant. Als Folge der Entwicklung wichtiger Methoden bei uns und in anderen Arbeitskreisen ist die Unterscheidung zwischen niedermolekularen Verbindungen und Biomolekülen künftig vielleicht weit weniger angebracht. Potenziell nützliche so genannte Biologika können inzwischen durch chemische Synthese hergestellt werden, und die Grundlagen der umgelenkten Totalsynthese, die zur Entwicklung niedermolekularer Therapeutika genutzt werden, können analog auch auf biologische Wirkstoffe angewendet werden. Wenn eine bestimmte Zielstruktur in der biologischen Domäne schließlich als geeignet für die Weiterentwicklung identifiziert wurde, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die Biologie mit ihrem bemerkenswerten Vervielfältigungsvermögen diese Verbindung sehr viel effizienter produziert als die chemische Synthese. Im *Anfangsstadium der Identifizierung*, in dem die Reinheit entscheidend ist und nicht der Maßstab, ist die Synthese aber in vielen Fällen durchaus konkurrenzfähig.

1.4. Eine wissenschaftliche Pipeline

Das Interesse unseres Arbeitskreises richtet sich seit langem auf die chemische Synthese von niedermolekularen Naturstoffen und Biologika mit potziellem therapeutischem Nutzen.^[9,10] Wir wählen unsere Zielverbindungen nach interessanten Strukturmerkmalen sowie ihrer angeblichen biologischen Aktivität aus. Nach Vollendung der Totalsynthese des Naturstoffs selbst versuchen wir, die beschriebene Aktivität zu bestätigen und durch DTS verwandte Verbindungen herzustellen. Durch gezielte, in hohem Maß interaktive Zusammenarbeit beurteilen wir die biologischen Wir-

kungen verschiedener Veränderungen des Molekülgerüsts und setzen auf der Basis dieser Ergebnisse die Anpassung der Wirkstoff-Plattform fort. Als akademische Forschungsgruppe verfügen wir natürlich nicht über die Möglichkeiten, umfangreiche Substanzbibliotheken herzustellen. Statt dessen konzentrieren wir uns auf SMNPs in der Hoffnung, den „Molekülstamm“ nutzen zu können und damit vielleicht die Vielzahl von Verbindungen zu kompensieren, die an eine Aufgabe verschwendet werden. Nichtsdestotrotz haben unsere sorgfältig geplanten Kleinpipelines für Wirkstoffe bisher einige sehr vielversprechende Kandidaten für die weitere Entwicklung hervorgebracht. Mehrere dieser Verbindungen befinden sich in klinischen Tests.

Dieser Aufsatz veranschaulicht anhand von Beispielen unsere Suche nach Entwicklungsfähigen potenziellen Wirkstoffen aus dem Gebiet der biologischen und der niedermolekularen Verbindungen, die durch Totalsynthese, umgelenkte Totalsynthese und gemeinschaftliche biologische Untersuchungen erhalten werden. Der erste Abschnitt dieses Aufsatzes beschreibt unsere jüngsten Fortschritte in Bezug auf Synthese, DTS und biologische Untersuchung einer Reihe von Verbindungen auf SMNP-Basis, darunter die Epothilone, Migrastatine, Radicicole, Panaxytriol und neurotroph wirkende Substanzen. Ein weiterer Schwerpunkt des Aufsatzes sind ausgewählte aktuelle Programme auf dem Gebiet größerer Moleküle (Biologika). Wir beschreiben insbesondere die Entwicklung von Tumorvakzinen auf Kohlenhydratbasis sowie unsere Fortschritte bei der Totalsynthese von zwei hoch komplexen, biologisch aktiven Glycoproteinen: Erythropoietin alpha (EPO) und humanes follikelstimulierendes Hormon (hFSH).

2. Totalsynthese und DTS von niedermolekularen Naturstoffen (SMNPs)

2.1. Epothilone

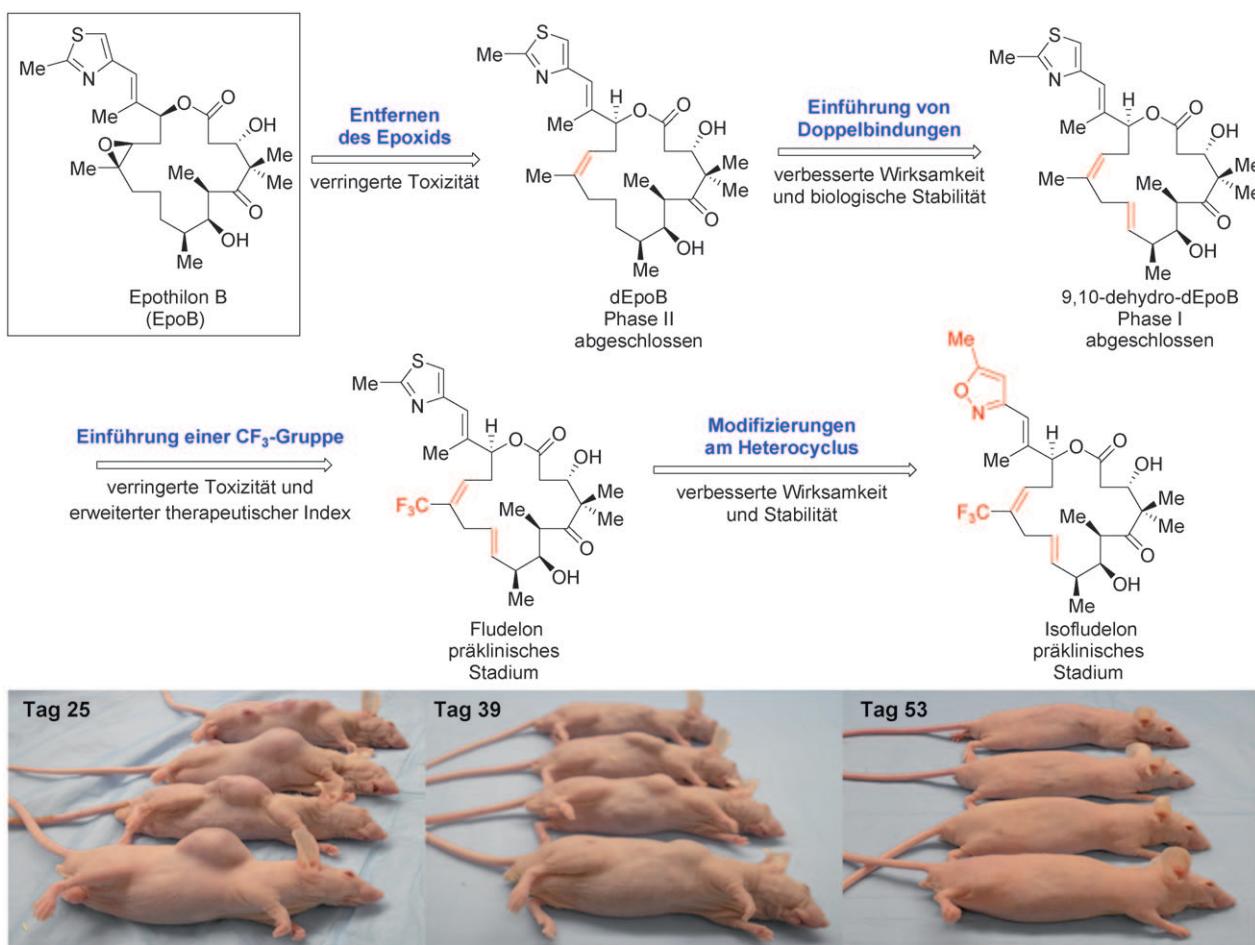
Das ursprünglich aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isolierte^[11] Epothilon B (EpoB) zeigt in vitro hohe Cytotoxizität. Wie Taxol fördert auch EpoB die Stabilisierung der Mikrotubuli-Polymerisierung und damit die Unterbrechung des Zellteilungsprozesses, die schließlich zum Zelltod führt. Anders als Taxol und die meisten klinisch verfügbaren Tumorthapeutika scheinen die Epothilone nicht von einem Wirkungsverlust im Zusammenhang mit der Entstehung von Multiwirkstoff-Resistenzen (multidrug resistance, MDR) betroffen zu sein.^[12] Auf Klinikebene kann die Entstehung von MDR, deren Ursachen noch nicht genau bekannt sind, nachteilige Folgen für die therapeutische Prognose haben. Ein Chemotherapeutikum, dessen Cytotoxizität gegenüber ansonsten Multiwirkstoff-resistenten Tumoren erhalten bliebe, wäre zweifellos vor allem für diejenigen von Bedeutung, auf die die derzeit verfügbaren Behandlungen nicht länger anwendbar sind.

Unsere Beteiligung am Epothilon-Programm begann mit der Vollendung der ersten Synthese von EpoB^[13] und dem verwandten Epothilon EpoA.^[14] Erste In-vivo-Untersuchungen ergaben, dass EpoB sogar in subtherapeutischer Dosierung für Mäuse hoch toxisch ist. Wir nahmen an, dass diese unspezifische Toxizität auf die Epoxidbindung an C12–C13 des Naturstoffs zurückzuführen ist, und versuchten, dieses Strukturmerkmal zu „lösen“. Daher wurde dEpoB (EpoD), das selbst eine biogenetische Vorstufe von EpoB ist, durch DTS hergestellt (Schema 2). Tatsächlich war diese Verbindung weit weniger toxisch als der ursprüngliche Naturstoff und wurde in einer Reihe von In-vivo-Versuchen sehr gut toleriert. Zudem behielt dEpoB seine Wirksamkeit gegenüber MDR-Zelllinien, obwohl es deutlich weniger wirksam ist als EpoB. Ausgehend von vielversprechenden präklinischen Ergebnissen wurde dEpoB in klinische Tests aufgenommen. Die Tests der Phase II bei Brustkrebs sind beendet,

und die Verbindung wird nun bei anderen Indikationen untersucht.

Mit unseren Analoga der zweiten Generation wollten wir einen Teil der Wirksamkeit zurückerhalten, der bei der Entwicklung von EpoB zu dEpoB verloren gegangen war. Wir gingen davon aus, dass die biologische Stabilität und Wirksamkeit verbessert werden könnten, indem Strukturmerkmale eingeführt werden, die dem Molekül Starrheit verleihen. Schließlich gelang es, die erhoffte Starrheit durch Einführung eines zweiten Alkens an der C9-C10-Position zu erreichen. Das neu synthetisierte Analogon, 9,10-Dehydro-dEpoB, zeigte in vivo an Mäusen deutlich höhere Wirksamkeit^[15a,b] und hatte zudem eine höhere Serumstabilität als dEpoB. 9,10-Dehydro-dEpoB wurde in klinischen Tests der Phase I untersucht und wird derzeit für andere Indikationen geprüft.

Vermutlich als Folge seiner höheren Wirksamkeit ist 9,10-Dehydro-dEpoB auch toxischer als dEpoB. Dementspre-



Schema 2. Umgelenkte Totalsynthese der Epothilone und chemotherapeutische Wirkung von Fludelone gegen sehr große MX-1-Xenotransplantate in Nacktmäusen (30 mg kg^{-1} , Q12Dx4, 6-stündige Infusion, $N=4$). Die präklinischen Tumortherapeutika aus der Familie der Fludelone wurden am MSKCC in der Arbeitsgruppe von Samuel Danishefsky entdeckt und weiterentwickelt. Das spezielle Fludelone KOS-1803 wurde am MSKCC und bei der Firma Kosan Biosciences gemeinsam entwickelt. Über die Ergebnisse dieser gemeinsamen Arbeiten wurde in maßgeblichen Fachzeitschriften und bei Kongressen eingehend berichtet. Meiner Ansicht nach (Samuel Danishefsky) sind die präklinischen Resultate bemerkenswert vielversprechend. Die mir zur Verfügung stehenden Ergebnisse für Kosan-1803 zeigen eine eindrucksvolle therapeutische Breite und beschreiben Heilungen. Ich halte Kosan-1803 für ein vielversprechendes Tumortherapeutikum, das präklinisch und klinisch weiterentwickelt werden sollte. Kosan Biosciences, für die SJD als wissenschaftlicher Berater tätig war, wurde von einer großen pharmazeutischen Firma gekauft, die nun über die Weiterentwicklung von Kosan-1803 bestimmt.

chend werden *in vivo* niedrigere Dosierungen toleriert, und bei der Behandlung einiger besonders refraktärer Tumoren kann mit 9,10-Dehydro-dEpoB nicht die erhoffte vollständige Tumorremission erreicht werden. In unserer nächsten Generation der Epothilon-Reihe wollten wir diese Toxizität abschwächen und damit die therapeutische Breite vergrößern. Bemerkenswerterweise stellte sich heraus, dass der Austausch der C12-Methylgruppe gegen einen Trifluormethyl-Substituenten den therapeutischen Index erheblich verbesserte. Das Trifluormethyl-Analogon, Fludelon, ist wesentlich weniger toxisch als 9,10-Dehydro-dEpoB.^[15] Trotz der entsprechend geringeren Wirksamkeit ist die therapeutische Breite von Fludelon weitaus besser als die der Stammverbindung. Tatsächlich bewirkte Fludelon bei Mäusen *in vivo* die vollständige Remission besonders hartnäckiger Tumoren, gegen die 9,10-Dehydro-dEpoB nicht annähernd so wirksam ist.

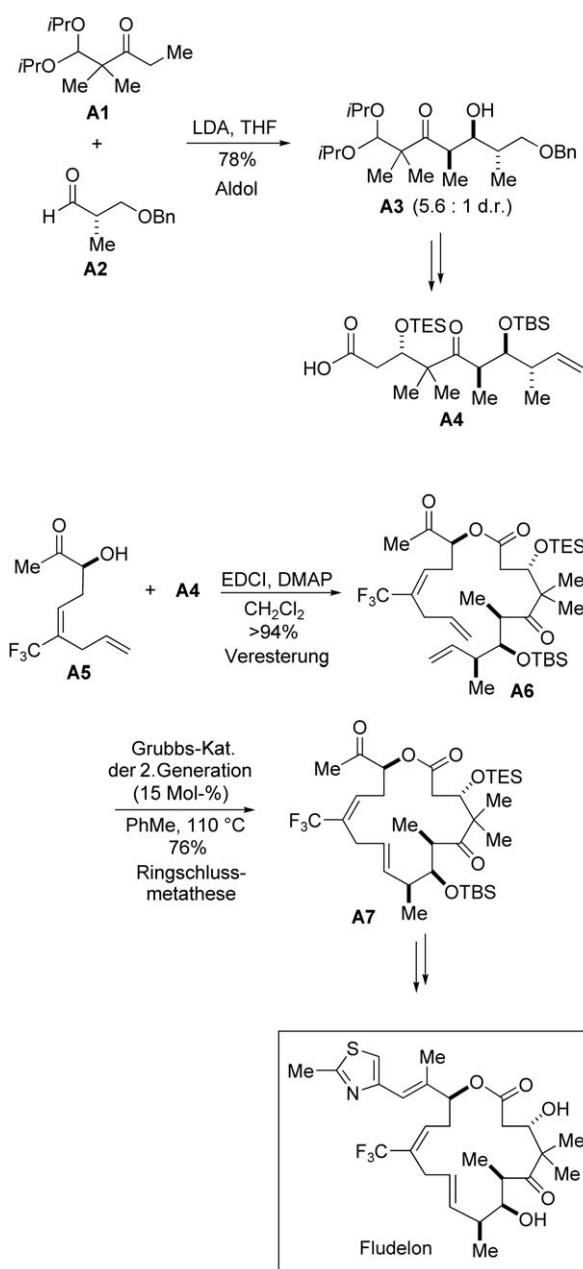
Schließlich wurde durch Modifizieren des heterocyclischen Abschnitts im Epothilon-Gerüst ein Isofludelon-Derivat (KOS-1803) hergestellt.^[15d] Diese bemerkenswert aktive und stabile Verbindung bewirkt mit nur vier Dosen, die in relativ großen Abständen (bis zu 12 Tage) verabreicht werden, bei bestimmten Xenotransplantat-Tumoren von Mäusen die vollständige Remission und therapeutische Heilung.

Isofludelon und Fludelon sind vielversprechende Verbindungen für die weitere Entwicklung. Wir halten das bei uns durchgeführte und durch sorgfältig gewählte Zusammenarbeit erweiterte Epothilon-Programm für ein ausgezeichnetes Beispiel, das die Leistungen der Totalsynthese und der umgelenkten Totalsynthese beim Auffinden von Leitstrukturen für die Weiterentwicklung verdeutlicht. Durch kleine, aber genau geplante Eingriffe in das Epothilon-Gerüst konnten wir den Naturstoff so modifizieren, dass zunehmend wirksamere potenzielle Tumorthapeutika erhalten wurden. Die in Schema 2 gezeigten Strukturänderungen konnten natürlich nicht einfach durch Modifizieren des Naturstoffs (EpoB) selbst erreicht werden. Nur durch Rückgriff auf die Grundlagen der DTS gelang die Herstellung adäquater Mengen dieser vielversprechenden Analoga für weitere Untersuchungen.

Nachfolgend wird die konvergente Totalsynthese von optisch aktivem Fludelon kurz vorgestellt (Schema 3).^[15] Dieser Syntheseweg nutzt eine diastereoselektive Aldolreaktion zur Bildung des β -Hydroxyketons **A3**, das die drei benachbarten Chiralitätszentren von Fludelon enthält. Die aus dem Intermediat **A3** erhaltene Säure **A4** wird mit dem Alkohol **A5** zur Metathese-Vorstufe **A6** verestert. Die nachfolgende Ringschlussmetathese (ring-closing metathesis, RCM) lieferte ausschließlich das gewünschte *trans*-Isomer **A7**, aus dem durch Anknüpfen der heteroaromatischen Einheit Fludelon erhalten wurde. Das analoge Isofludelon wird ganz ähnlich synthetisiert.

2.2. Migrastatin

Die Metastasierung von Tumorzellen bei fortschreitenden Krebserkrankungen kennzeichnet oft den Beginn der verheerendsten Krankheitsphase.^[16] In Anbetracht der ent-



Schema 3. Synthese von Fludelon. LDA = Lithiumdiisopropylamid, THF = Tetrahydrofuran, EDCI = 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin.

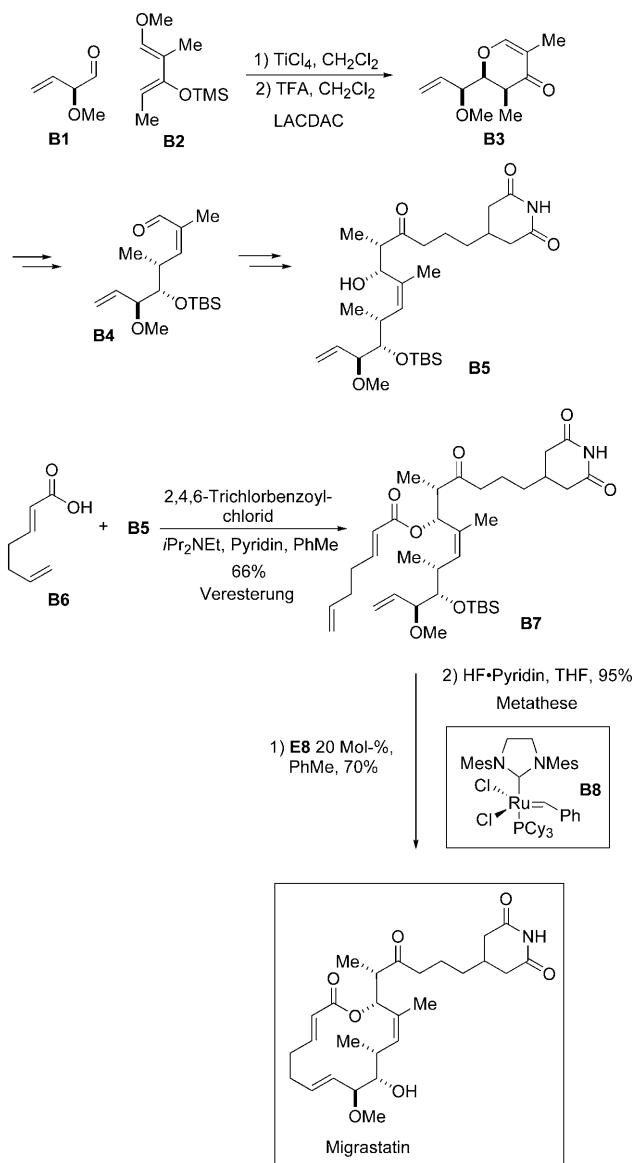
scheidenden Rolle, die die Zellmigration *in vivo* bei der Tumormetastasierung spielt, sind niedermolekulare Therapeutika zur Verhinderung dieser Zellwanderung besonders erwünscht, da sie dazu beitragen würden, die Tumorresektion zu vereinfachen und die Zahl der von der Erkrankung betroffenen Organe zu verringern. Zudem sind selektive Inhibitoren der Zellmigration vermutlich wesentlich weniger toxisch als herkömmliche „cytotoxische“ Wirkstoffe. In diesem Zusammenhang interessierte uns eine Entdeckung von Imoto et al., die Migrastatin, einen natürlich vorkommenden Inhibitor der Tumorzellmigration aus der *Streptomyces*-Spezies MKI-929-43F1 isoliert hatten.^[17] Wie Imoto berichtete, wurde

bei der Vorbehandlung einer Monoschicht aus menschlichen Ösophaguskrebszellen (EC17) mit 30 mg mL^{-1} Migrastatin im Rahmen eines Wundheilungsassays die Fähigkeit der Zellen, ein definiertes zellfreies Gebiet zu reinfiltrieren, drastisch unterdrückt. Für Migrastatin selbst wurde zwar nur mittlere Wirksamkeit ($\text{IC}_{50} = 29 \mu\text{M}$) beschrieben, wir hofften aber, dass der Naturstoff als wertvolle Leitverbindung dienen könnte, aus der sich wirksamere Analoga entwickeln ließen.

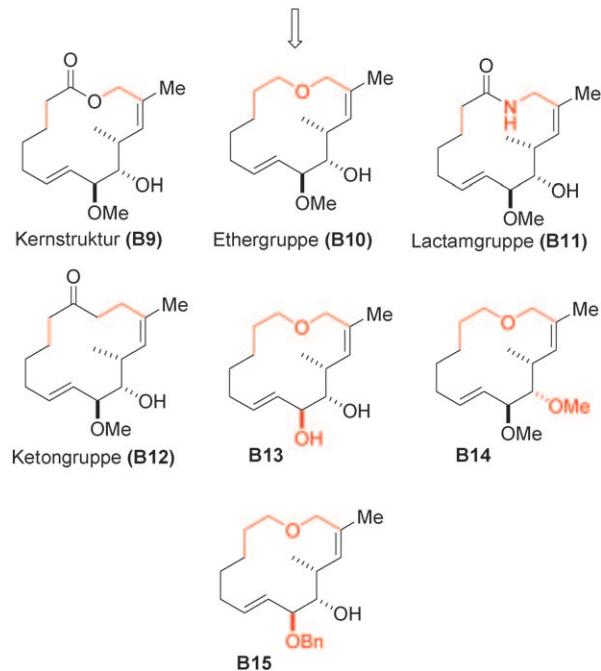
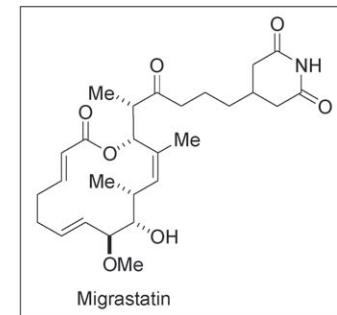
Mit dieser Zielvorstellung führten wir eine kurze, enantioselektive Totalsynthese von Migrastatin durch (Schema 4).^[18] Ein wichtiger Schritt dieser Synthese ist die diastereoselektive Lewis-Säure-katalysierte Dien-Aldehyd-Cyclo kondensation (Lewis-acid catalyzed diene-aldehyde cyclocondensation, LAC-DAC; diesen Reaktionstyp hatten wir 20 Jahre zuvor entdeckt), die zu **B3** führt. Eine Sequenz aus Veresterung und Metathese lieferte die makrocyclische

Verbindung, deren In-vitro-Aktivität mit der von natürlichem Migrastatin übereinstimmt.^[19a]

Danach stellten wir eine Reihe strukturell vereinfachter, synthetischer Analoga durch DTS her (Schema 5). Diese Kernstrukturen können nicht einfach aus dem Naturstoff selbst erhalten werden, sind aber aus fortgeschrittenen Zwi-



Schema 4. Synthese von Migrastatin. TFA = Trifluoressigsäure.



Schema 5. Umgelenkte Totalsynthese der Migrastatine.

schenstufen der Migrastatin-Synthese leicht zugänglich. Bei In-vitro-Untersuchungen unserer Analoga der ersten Generation stellten wir fest, dass das „Migrastatin-Grundgerüst“ (**B9**) etwa 1000-mal wirksamer ($\text{IC}_{50} = 24 \text{ nm}$) ist als der Naturstoff selbst.^[20] Trotz der ausgezeichneten In-vitro-Aktivität war die Wirkung des von Migrastatin abgeleiteten Lactongerüsts bei Stabilitätsstudien in Mausplasma leider nicht so gut, was vermutlich auf die funktionelle Lactongruppe zurückzuführen ist, die das Molekül empfindlicher gegenüber Esterasen macht. In einer zweiten Generation von Analoga wurde versucht, dieses Problem zu lösen, indem das Lacton „entfernt“ und durch eine stabilere funktionelle Gruppe, wie eine Lactam- (**B11**), Ether- (**B10**) oder Ketongruppe, wie eine Ketongruppe (**B12**), ersetzt wurde.

einheit (**B12**), ersetzt wurde.^[20] Tatsächlich lieferten diese Untersuchungen eine sehr vielversprechende Verbindung, den von Migrastatin abgeleiteten Ether **B10**.^[20]

Der Ether **B10** zeigte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sehr vielversprechende Aktivität. In ersten Untersuchungen an Mäusen, die mit dieser Verbindung behandelt worden waren, verringerte sich die Krebsmetastasierung, und die Überlebensdauer der Tiere stieg. Bei einer in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Malcolm Moore am MSKCC durchgeführten *In-vivo*-Untersuchung wurden NOD-SCID-Mäusen menschliche Brustkrebszellen injiziert. Verschiedenen Mäusegruppen wurde eine geringe Dosis **B10** (40 mg kg^{-1} , i.p. (intraperitoneal), $3 \times$ wöchentlich), eine hohe Dosis **B10** (200 mg kg^{-1} , i.p., $3 \times$ wöchentlich) oder ein Placebo (Kontrolle, PBS) injiziert. Nach vier Wochen wurden die Primärtumoren entfernt und wöchentlich Bioimagings auf Metastasen durchgeführt. Die Mäuse wurden nach sieben Wochen getötet, Lunge, Leber, Gehirn und Thymus wurden entfernt und abgebildet. Während in Lunge und Leber der Kontrollmäuse ein umfangreiches Wachstum von Tumormetastasen stattgefunden hatte, trat bei den mit niedriger oder mit hoher **B10**-Dosis behandelten Mäusen kein solches Wachstum auf. Nach neun Wochen wurden in Lunge und Leber der mit niedriger **B10**-Dosis behandelten Mäuse Metastasen nachgewiesen, aber die mit der hohen Dosis behandelte Gruppe hatte zu diesem Zeitpunkt keine nachweisbaren Metastasen. Diese Ergebnisse sprechen klar dafür, dass der Ether **B10** mit Migrastatingerüst die Migration von Tumorzellen hemmen und so die Tumormetastasierung bei Mäusen *in vivo* verringern kann.

In einer anderen Studie führte die Arbeitsgruppe von Joan Massagué am MSKCC einen *In-vivo*-Versuch durch, bei dem immungeschwächten Mäusen menschliche metastatische Brustkrebszellen der Linie LM2-4175 injiziert wurden, die speziell in die Lunge metastasieren. Nach 27 Tagen wurden die Mäuse mit niedrig dosiertem **B10** (100 mg kg^{-1}), hoch dosiertem **B10** (200 mg kg^{-1}) oder einer Kontrolle (DMSO/PBS-Puffer) behandelt. Bei den mit einer hohen Dosis des Ethers **B10** behandelten Mäusen war die Metastasierung in die Lunge 4.5-mal geringer als bei der Kontrollgruppe (Abbildung 2).

Diese ersten Ergebnisse der *In-vivo*-Versuche bestätigen das Potenzial des Migrastatin-Gerüsts als Leitstruktur für die Wirkstoffentwicklung. Der von Migrastatin abgeleitete Ether (**B10**) zeigt *in vivo* deutlich höhere Stabilität und Wirksamkeit als der ursprüngliche Naturstoff. Das Migrastatin-Programm liefert weitere Beweise für den Nutzen von SMNPs und umgelenkter Totalsynthese bei der Suche nach klinisch nutzbaren Leitverbindungen. Auch wenn sich dieses Synthese-Programm für Verbindungen, die eine Metastasierung verhindern sollen, erst im Anfangsstadium befindet, ist es ein Lehrbuchbeispiel für die DTS.

2.3. Radicicole

Radicicole wurde 1953 erstmals aus *Monocillium bonorden* isoliert.^[21] Es hat eine hohe Bindungsaffinität zum molekularen Chaperon des Hitzeschockproteins 90 (Hsp90) und in-

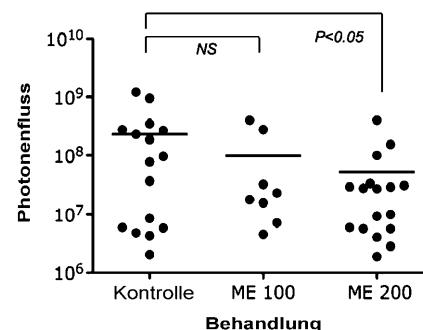
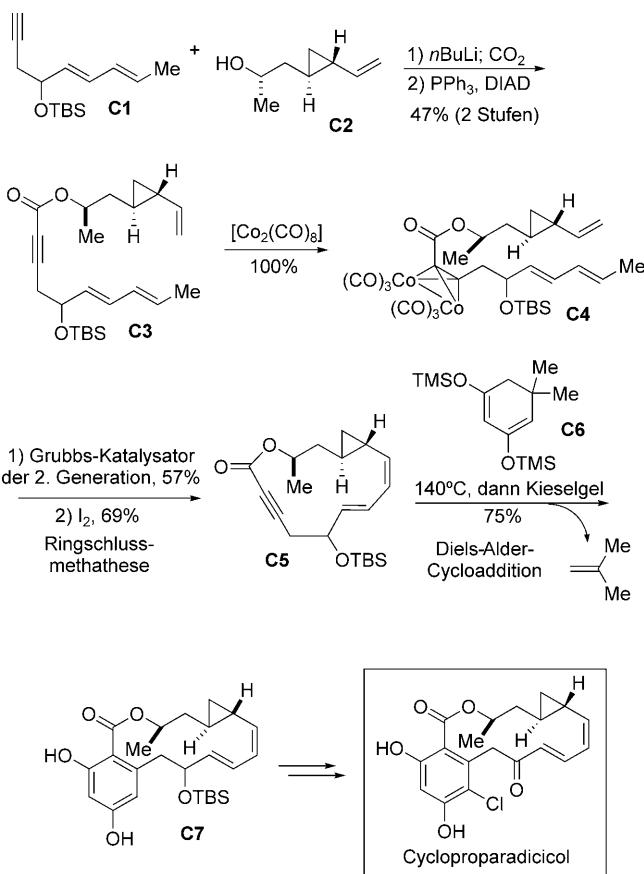
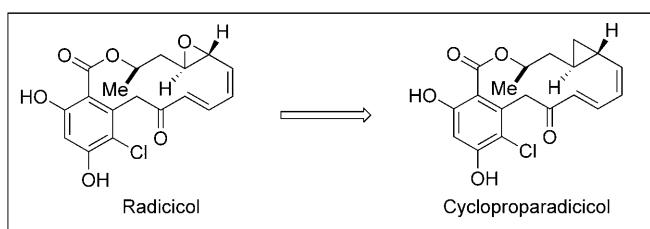


Abbildung 2. Analyse des Wachstums von Brustdrüsentumoren und Lungenmetastasen. Wachstum von Brustdrüsentumoren: Luciferase-transduzierte LM2-Zellen wurden seitengleich in das vierte Brustdrüsensettpolster von NOD-SCID-Mäusen injiziert. Die Größe des Brusttumors wurde regelmäßig mit einem Greifzirkel gemessen. Am Tag 27 nach der Injektion wurden die Mäuse mit 100 mg kg^{-1} **B10** (ME), 200 mg kg^{-1} **B10** (ME) oder Trägerflüssigkeit als Kontrolle behandelt. Die Verabreichung erfolgte dreimal pro Woche durch intraperitoneale Injektion. Kontrolle: $n=16$, ME 100 mg kg^{-1} : $n=8$, ME 200 mg kg^{-1} : $n=17$. Lungenmetastasen bei Versuchsende, gemessen durch Lumineszenz: Am Tag 42 wurden die Mäuse durch *Ex-vivo*-Biolumineszenz auf Lungenmetastasen untersucht, wobei die Luciferase-Aktivität in den Lungen quantifiziert wurde. ME 100: **B10** 100 mg kg^{-1} , ME 200: **B10** 200 mg kg^{-1} .

hibiert es.^[22] Hsp90 wird wegen seiner zentralen Rolle bei der Vermittlung der Faltung mehrerer onkogener Proteine, z.B. *Raf1* und *Her2*, als interessantes Ziel für die Inhibierung durch Tumortherapeutika angesehen. Anders als andere Hsp90-Inhibitoren besitzt Radicicole keine Chinon-Substruktur mit der zugehörigen Kardiotoxizität. Auf der Basis erster *In-vitro*-Studien begannen wir mit einem Programm zur Totalsynthese von optisch aktivem Radicicole.

2001 beendeten wir die erste asymmetrische Totalsynthese von Radicicole.^[23] Mit dieser synthetischen Substanz konnten wir die Inhibitorwirkung des Naturstoffs gegen das Hsp90-Chaperon bestätigen. Allerdings erwies sich Radicicole *in vivo* als unwirksam. Wir führten dies auf die Epoxideinheit zurück, die *in vivo* vermutlich zu Instabilität und unspezifischer Cytotoxizität führt. Um dieses Problem zu lösen, entwarfen wir das Analogon Cycloproparadicicole, das anstelle des Epoxids eine stabilere Cyclopropyleinheit enthält.^[24]

Ein interessanter Schritt in der Synthese von Cycloproparadicicole ist die Ringschlussmetathese-Sequenz zum Aufbau von **C5** (Schema 6).^[25b] Anfängliche Bemühungen, eine RCM-Reaktion des Alkinoatesters **C3** durchzuführen, blieben ohne Erfolg und lieferten unter verschiedenen Bedingungen lediglich die Ausgangsverbindung. Möglicherweise verhindert der sterische Zwang durch die lineare Alkingruppierung eine Cyclisierung des Substrats, und wahrscheinlich wird die Reaktion auch durch unproduktive Koordinierung des Alkins an den Katalysator beeinträchtigt. Wir konnten das Problem jedoch lösen, indem wir das Alkin vorübergehend durch Bindung in dem Dicobaltcarbonyl-Komplex **C4** maskierten. Wie erhofft, war diese Zwischenstufe geometrisch besser für eine Ringschlussmetathese geeignet und cyclisierte in Gegenwart des Grubbs-Katalysators leicht mit 57 % Ausbeute zum makrocyclischen Produkt. Das



Schema 6. Synthese von Cycloparadadicicol. DIAD = Diisopropylazodicarboxylat.

Alkin wurde durch Umsetzen des Dicobaltkomplexes mit Iod wieder hergestellt. Die funktionelle „Inolid-Einheit“ in **C5** erwies sich als effizientes Dienophil, und durch Diels-Alder-Cyclisierung mit **C6** wurde der aromatische Resorcinabschnitt eingeführt, wobei **C7** mit guter Ausbeute erhalten wurde.

Synthetisches Cycloparadadicicol bindet bei etwa 160 nm an das molekulare Chaperon von Hsp90. Vor allem behält dieses modifizierte Analogon anders als der ursprüngliche Naturstoff in vivo seine Wirksamkeit. Bei einer ersten In-vivo-Untersuchung an Mäusen mit menschlichem Brustkrebsimplantat (MX-1) bewirkte Cycloparadadicicol eine Tumorsuppression (Abbildung 3). Dieses Ergebnis spricht für unsere ursprüngliche Annahme, wonach die Epoxideinheit in einer In-vivo-Umgebung instabil ist. Die Entwicklungsfähigkeit von Cycloparadadicicol als Leitstruktur wird derzeit untersucht.

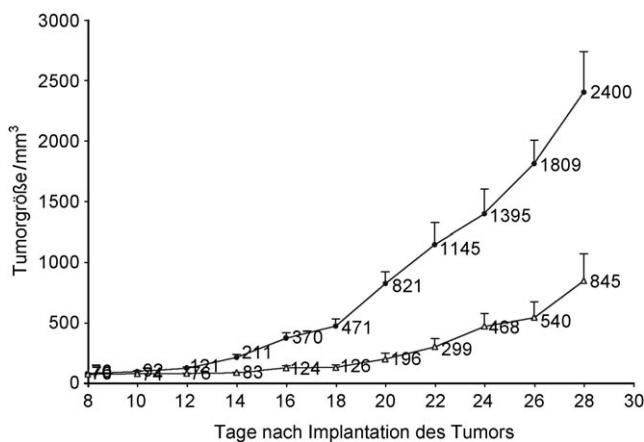


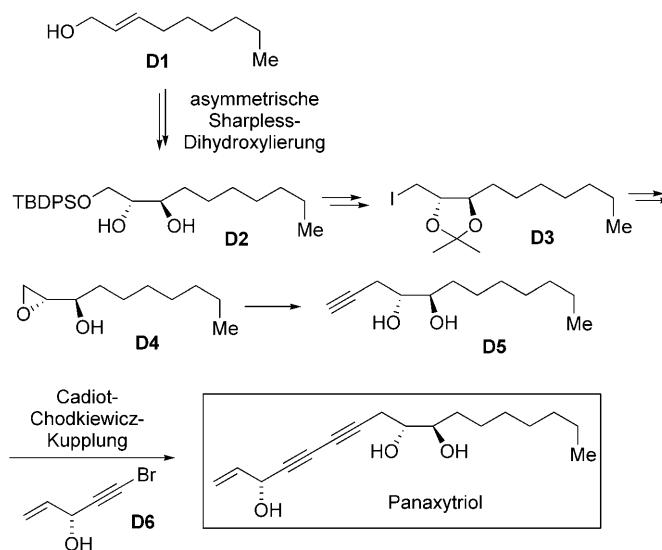
Abbildung 3. Therapeutischer Effekt von Cycloparadadicicol in Nacktmäusen mit xenotransplantiertem menschlichem MX-1-Brustkrebs. ● = Kontrolle; △ = Cycloparadadicicol, 20 mg kg⁻¹, Q2Dx3; 50 mg kg⁻¹, Q2Dx1, 100 mg kg⁻¹, Q2Dx5, intravenöse Injektion, n = 3.

2.4. Panaxytriol

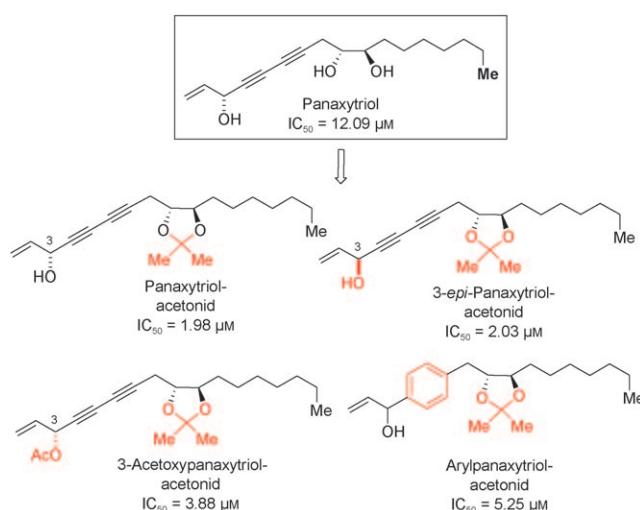
Roter Ginseng wird als wichtiges pflanzliches Nahrungs-ergänzungsmittel, d. h. als ein Nahrungsmittelextrakt mit nachgewiesenen medizinischen Nutzen, angesehen.^[25] Diese Pflanzenwurzel wird seit mehr als 2000 Jahren in ganz Asien als Volksmedizin zur Behandlung zahlreicher Beschwerden eingesetzt und soll Anwendungsmöglichkeiten bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes und Krebs haben. 1983 wurde Panaxytriol als charakteristischer Bestandteil von koreanischem Rotem Ginseng isoliert.^[26] Dieser Naturstoff zeigte in vitro Inhibitorwirkung gegen eine Reihe von Tumorzellen. Neueren Hinweisen zufolge wirkt Panaxytriol vorbeugend gegen Krebs, was teilweise auf der Induktion von Phase-II-Enzymen beruht.^[27] Diese chemoprotektiven Enzyme unterstützen über verschiedene Mechanismen Entgiftungsreaktionen und schützen auf diese Weise Zellen vor der Toxizität von reaktiven Elektrophilen und Sauerstoffspezies. Die Induktion von Phase-II-Enzymen kann der Krebsentstehung entgegenwirken, indem reaktive Elektrophile, die sich als Carcinogene oder Mutagene erweisen könnten, neutralisiert werden. Damit ist Panaxytriol ein seltenes Beispiel für ein Antitumormittel mit nachgewiesener Wirkung, das in einem weit verbreiteten Nahrungsmittel vorkommt. Daher könnte auch eine mittlere Wirkung von Nutzen sein, denn etwaige Nebenwirkungen sind leicht kontrollierbar.

Diese Überlegungen veranlassten uns zu einer kurzen asymmetrischen Totalsynthese von Panaxytriol.^[28] In dieser Synthese entsteht die Dioleinheit durch asymmetrische Sharpless-Dihydroxylierung (**D1** → **D2**, Schema 7). Die Diin-gruppierung sowie das letzte Hydroxy-substituierte Chiralitätszentrum von Panaxytriol werden in einem späten Synthesestadium durch eine Cadiot-Chodkiewicz-Kupplung eingeführt (**D5** + **D6**).

Ausgehend von dieser effizienten Synthesemethode für Panaxytriol synthetisierten wir anschließend eine Reihe verwandter Verbindungen durch DTS (Schema 8). Panaxytriol



Schema 7. Synthese von Panaxytriol.

Schema 8. Umgelenkte Totalsynthese der Panaxytrirole. IC_{50} gegen CCRF-CEM im XXT-Assay nach 72-stündiger Inhibierung.

und mehrere synthetische Analoga wurden *in vitro* auf ihre Inhibitorwirkung gegen CCRF-CEM-Krebszellen untersucht.^[29] Hierbei erwiesen sich die meisten synthetischen Analoga als wirksamer als der Naturstoff selbst. So führte die Bindung des Diols als Acetonid (Panaxytriolacetonid) *in vitro* zu erhöhter Aktivität. Die C3-Hydroxygruppe scheint für die Aktivität nicht essenziell zu sein, denn 3-Acetoxypanaxytriolacetonid wie auch 3-*epi*-Panaxytriolacetonid zeigten gute Wirkungen.

Interessante Ergebnisse haben kürzlich gezeigt, dass unsere synthetischen Panaxytriol-Analoga *in vivo* bei Mäusen die toxischen Nebenwirkungen, die bei der Verabreichung von cytotoxischen Chemotherapeutika auftreten, deutlich abschwächen. So wurde bei gemeinsamer Verabreichung von

Panaxytriol-Analoga und cytotoxischen Tumortherapeutika (z.B. Taxol oder Fludelone) an tumortragende Mäuse ein mäßiger, aber deutlicher und reproduzierbarer Synergismus der antiprofilierativen Wirkungen der cytotoxischen Mittel sowie Zunahmen bei der maximal tolerierten Dosis (MAD) und der letalen Dosis (LD) der cytotoxischen Mittel beobachtet. Darüber hinaus schwächen sich die verhaltenstypischen Merkmale einer peripheren Neuropathie ab, die eine häufige Nebenwirkung der Behandlung mit diesen Medikamenten ist. Außerdem können die Panaxytriolverbindungen leichte entzündungshemmende Eigenschaften aufweisen, die die Immunsuppression vermindern und für deutliche Linderung bei strahlungsinduzierten Schäden des peripheren Gewebes sorgen. Unserer Ansicht nach sind diese Wirkungen darauf zurückzuführen, dass die chemoprotektiven Phase-II-Enzyme durch die von Panaxytriol abgeleiteten Substanzen hochreguliert werden.

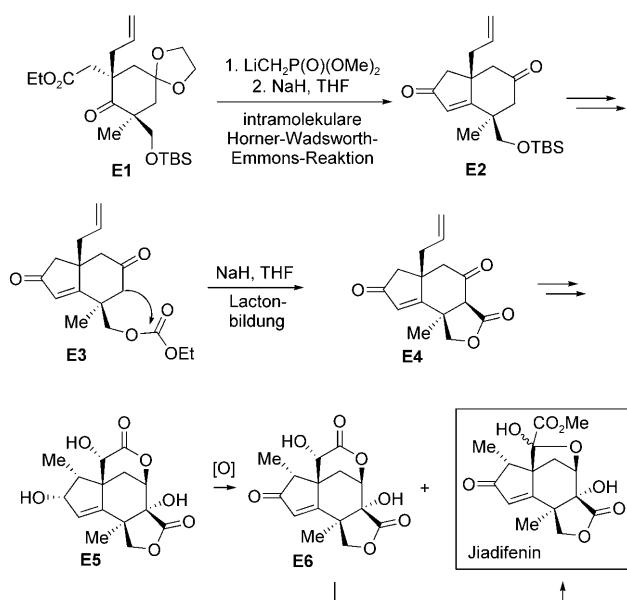
2.5. Synthese und Untersuchung neurotroph wirksamer Verbindungen

Natürlich vorkommende, neurotrophe Polypeptidylfaktoren spielen eine zentrale Rolle bei der Förderung des Zellüberlebens, der Differenzierung und des Wachstums von Neuronen.^[30] Vor allem das Fortschreiten häufiger neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-, der Huntington und der Parkinson-Krankheit wurde mit sinkenden Spiegeln der neurotropen Faktoren in Verbindung gebracht. Wir interessierten uns besonders für die Entwicklung von niedermolekularen, ZNS(Zentralnervensystem)-gängigen, neurotroph wirksamen Verbindungen, die zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden könnten.^[31] Dabei konzentrierten wir uns auf eine wachsende Klasse von SMNPs, die eine bestimmte Art potenziell nutzbarer ZNS-Aktivität aufweisen. Dieser Abschnitt beschreibt unsere Arbeiten bezüglich der Totalsynthese, der umgelenkten Totalsynthese und der biologischen Untersuchung von vier strukturell verschiedenen, neurotroph wirksamen Naturstoffen: 1) Jiadifenin, 2) Scabronin, 3) 11-*O*-Debenzoyltashironin und 4) Merrilacton.

2.5.1. Jiadifenin

Jiadifenin wurde aus der chinesischen Sternanisart *Illicium jiadifengpi* isoliert. Es fördert in Konzentrationen von nur 0.1 μ M das Auswachsen von Neuriten in kortikalen Rattenneuronen.^[32] Ausgehend von diesen ersten In-vitro-Resultaten begannen wir mit der Totalsynthese dieses strukturell interessanten Naturstoffs und beendeten 2004 die erste Totalsynthese von Jiadifenin (Schema 9).^[33] Wichtige Schritte dieser Synthese sind eine intramolekulare Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion (**E1**→**E2**) sowie die Einführung des Lactonrings über einen gemischten Carbonatester als Zwischenstufe (**E3**→**E4**).

Mit dieser synthetischen Substanz konnten wir die beschriebene neurotrophe Aktivität von Jiadifenin bestätigen. In Gegenwart des natürlich vorkommenden neurotropen Faktors NGF (nerve growth factor) steigerte Jiadifenin die



Schema 9. Synthese von Jiadifenin.

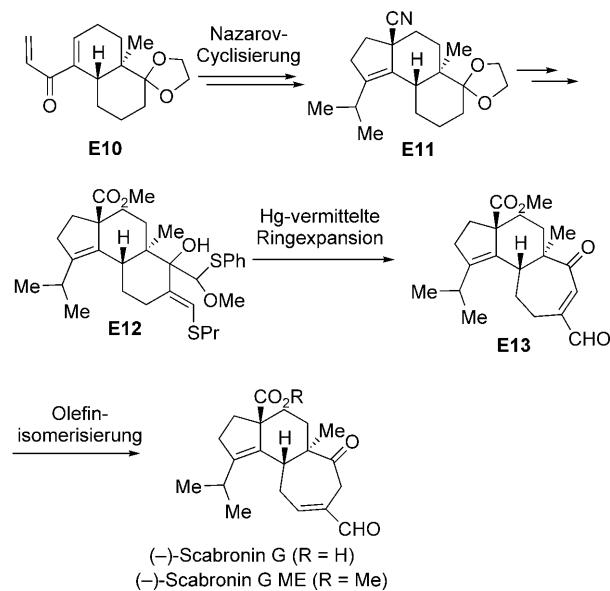
Neuritenlänge auf 162% (im Vergleich zu einer Kontrolle). Allerdings trat ohne NGF kein Neuritenwachstum auf. Diesen Ergebnissen zufolge wirkt Jiadifenin nicht unabhängig, sondern durch Hochregulieren der NGF-Wirkung.

Durch umgelenkte Totalsynthese haben wir eine Reihe von Jiadifenin-Analoga synthetisiert und ihre NGF-abhängige neurotrophe Aktivität untersucht. Zwei dieser synthetischen Analoga, die Normethyl-Variante von Jiadifenin (**E7**) und die nicht umgelagerte Jiadifenin-Vorstufe (**E6**), erwiesen sich als wirksamer im Vergleich zur Stammverbindung Jiadifenin (Schema 10). In Gegenwart von NGF steigerten die Verbindungen **E7** und **E6** die Neuritenlänge um 181% bzw. 184%. Interessanterweise hat das nicht umgelagerte Normethyl-Analogon (**E8**) nur mittlere Aktivität (121% Verlängerung), was ein möglicher Hinweis auf ein kompliziertes Struktur-Aktivitäts-Profil für diesen Naturstoff ist. Offenbar

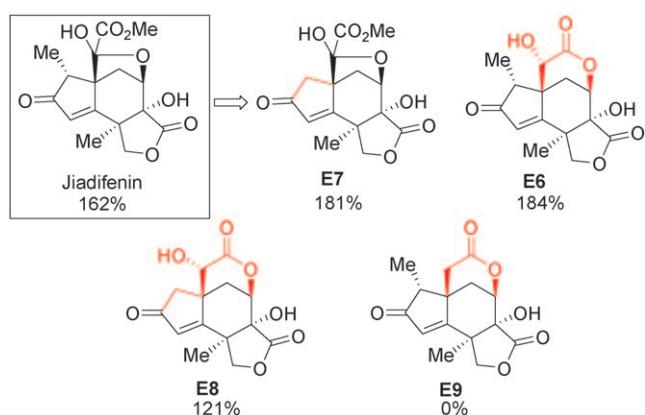
ist aber die Oxidation an C10 von Bedeutung, denn das nicht oxidierte Analogon **E9** weist in diesem Assay keine Aktivität auf. Weitere Untersuchungen sind nötig, um das therapeutische Potenzial dieser Verbindungsklasse besser zu bestimmen.

2.5.2. Scabronin G

Die Scabronine sind Stoffwechselprodukte, die aus dem bitteren Pilz *Sarcodon scabrosus* isoliert wurden.^[34] Die wirksamste Verbindung dieser Reihe ist Scabronin G, das die Produktion und Sekretion von NGF in menschlichen Astrogliazellen der Linien 1321N1 induziert.^[35] Interessanterweise erhöht der Methylester von Scabronin G im Vergleich zum Naturstoff die Produktion von NGF. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass Scabronin-G-Methylester die Produktion eines zweiten Neurotrophins, Interleukin-6 (IL-6), steigert. Diese Neurotrophininduktion führt vermutlich dazu, dass beide Verbindungen in Phäochromozytomzellen (PC-12) der Ratte eine drastische neuronale Differenzierung hervorrufen. Die Schlüsselschritte unserer 2005 beendeten Totalsynthese von Scabronin G sind eine Nazarov-Cyclisierung (**E10**→**E11**) und – in einem späten Synthesestadium – eine Hg-vermittelte Ringerweiterung zu **E13**, das unter Alkenisomerisierung zu Scabronin-G-Methylester reagiert (Schema 11).^[36] Durch nachfolgende saure Hydrolyse wird der Naturstoff selbst erhalten.



Schema 11. Synthese von Scabronin G und Scabronin-G-Methylester.



Schema 10. Umgelenkte Totalsynthese der Jiadifenine. Neuritenverlängerung bezogen auf die DMSO-NGF-Kontrolle.

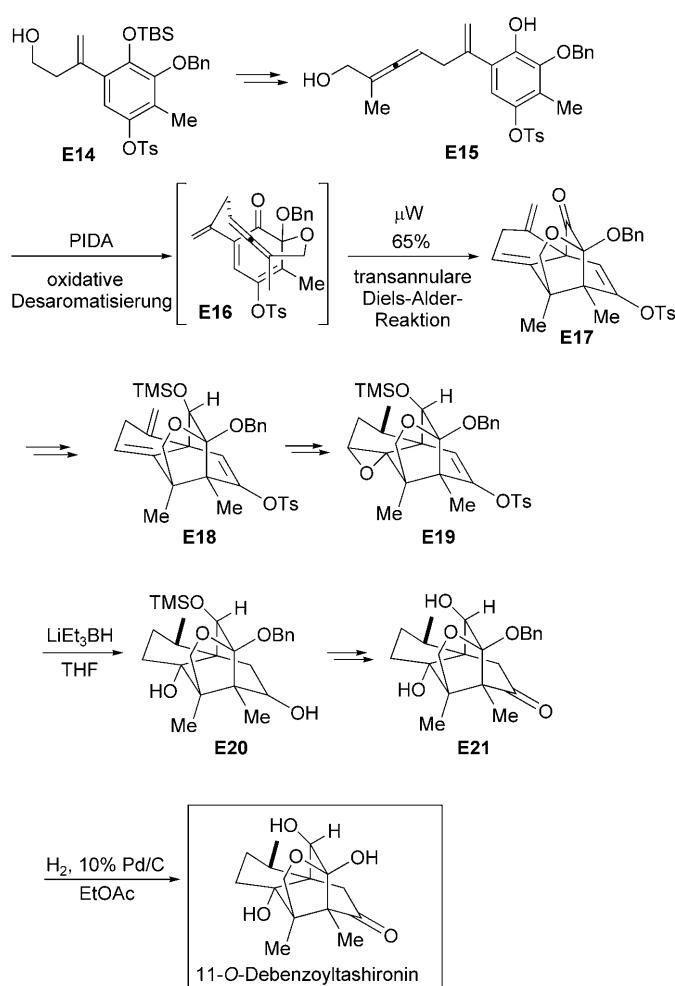
Nach Abschluss der Synthese konnten wir die beschriebene neurotrophe Wirkung von Scabronin G und Scabronin-G-Methylester bestätigen. Beide Verbindungen steigerten die Produktion und Sekretion von neurotropen Faktoren in 1321N1-Zellen. Außerdem wurde ein signifikantes Neuritenwachstum beobachtet, wenn Scabronin-G-Methylester in

PC-12-Zellen eingeschleust wurde. Ein Screening der Analoga ergab, dass die nicht isomerisierte Vorstufe von Scabronin-G-Methylester, **E13**, ein stärkeres Neuritenwachstum induzierte als Scabronin-G-Methylester selbst. Anschließend wurden die Scabronin-Verbindungen in einem Motoneuronen-Assay untersucht, der das Überleben und das Axonwachstum von Motoneuronen der Maus prüft. Die Motoneuronen wurden aus embryonalen Stammzellen gewonnen, die auf einem hemmenden Medium gewachsen waren (auf dem Myelinprotein MAG, das das Axonwachstum inhibiert). In diesem Assay bewirkte Scabronin-G-Methylester eine mäßige (10–20 %) Steigerung des Axonwachstums. Weitere Untersuchungen zur Bestimmung des therapeutischen Potenzials der Scabronin-Verbindungen sind geplant.

2.5.3. 11-O-Debenzoyltashironin

Das aus den Fruchtschalen der ostasiatischen Baumart *Illicium merrillianum* isolierte 11-O-Debenzoyltashironin fördert in einer Konzentration von nur 0.1 μM das Auswachsen von Neuriten in den kortikalen Nervenzellen fetaler Ratten.^[37] Die Totalsynthese dieses hoch funktionalisierten und oxygenierten tetracyclischen Naturstoffs gelang uns 2006,^[38] und kürzlich haben wir einen asymmetrischen Syntheseweg zu jedem Enantiomer von 11-O-Debenzoyltashironin beschrieben.^[39] Im Mittelpunkt der in Schema 12 skizzierten Synthese steht eine Reaktionskaskade, die mit der oxidativen Desaromatisierung des Allens **E15** beginnt. Dabei entsteht die Zwischenstufe **E16**, die durch mikrowelleninduzierte transannulare Diels-Alder-Reaktion zum tetracyclischen Addukt **E17** reagiert. Aus diesem Grundgerüst ist der Naturstoff über eine Reihe von Reaktionen der funktionellen Gruppen zugänglich.

Unser zweiter, asymmetrischer Syntheseweg zu 11-O-Debenzoyltashironin wurde durch die Entwicklung einer Methode erleichtert, die das enantiomerenangereicherte Allen **E15** durch asymmetrische Synthese der Propargylalkohol-Vorstufe zugänglich machte. Die nachfolgende oxidative Desaromatisierung dieser optisch aktiven Zwischenverbindung gelang ohne Racemisierung, sodass auf diese Weise schließlich beide Enantiomere des Naturstoffs erhalten wurden. So liefert die seitenselektive oxidative Desaromatisierung des Allens (–)-**E15** die Zwischenstufe **E16**, aus der durch nachfolgende transannulare Diels-Alder-Cyclisierung (+)-**E17** erhalten wird. Diese tetracyclische Verbindung wird anschließend zum natürlichen Enantiomer von 11-O-Debenzoyltashironin umgesetzt (Schema 13). Analog lagert sich das enantiomere Allen (+)-**E15** im oxidativen Desaromatisierungsschritt an die entgegengesetzte Seite des aromatischen Molekülteils an. Aus der so erhaltenen Zwischenstufe entsteht durch transannulare Diels-Alder-Cyclisierung (–)-**E17**, das schließlich in das nichtnatürliche Enantiomer des Naturstoffs überführt wird. Auch wenn die mechanistischen Details dieser interessanten Umwandlung nicht Gegenstand dieses Aufsatzes sind, soll erwähnt werden, dass die Durchführung der asymmetrischen Synthese ungewöhnliche Einblicke in die Feinheiten der oxidativen Desaromatisierung lieferte, die bei unserer ersten racemischen Synthese nicht ersichtlich waren.

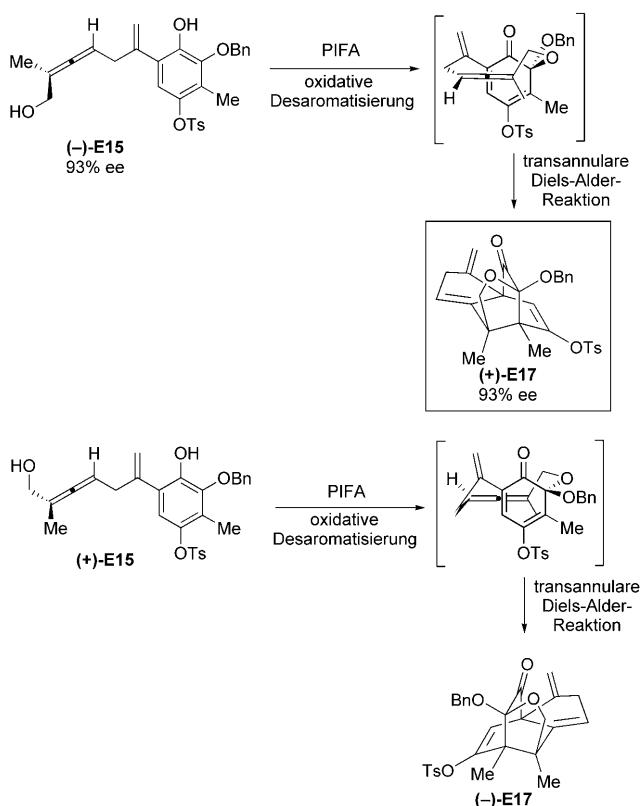


Schema 12. Synthese von 11-O-Debenzoyltashironin. PIDA = Phenyl-iod(III)-diacetat.

Die synthetische Verbindung bestätigte die beschriebene neurotrophe Wirkung, wobei wir aber kürzlich feststellten, dass nur das natürliche Enantiomer das Neuritenwachstum fördert. Diese Entdeckung hat natürlich Auswirkungen auf unsere Untersuchungen von Analoga, die als Einzelenantiomere hergestellt werden müssen. Derzeit werden Analoga synthetisiert, und weitere Studien zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sind in Vorbereitung.

2.5.4. Merrilacton

Merrilacton wurde aus der ostasiatischen Baumart *Illicium merrillianum* isoliert und soll das Neuritenwachstum der kortikalen Nervenzellen fetaler Ratten in Konzentrationen von nur 0.1 bis 1 μM signifikant fördern.^[40] Die erste racemische Synthese dieses strukturell interessanten Naturstoffs haben wir 2002 beschrieben.^[41] Später wurde ein zweiter, asymmetrischer Syntheseweg zu Merrilacton entwickelt.^[42] Ein zentrales Element dieser Synthese ist eine Sequenz aus desymmetrisierender Epoxidierung und asymmetrischer Ringöffnung (**E22** → **E23**), mit der die absolute Konfiguration in einem frühen Synthesestadium eingeführt wird (Schema 14). Das Intermediat wird in **E24** überführt, aus dem



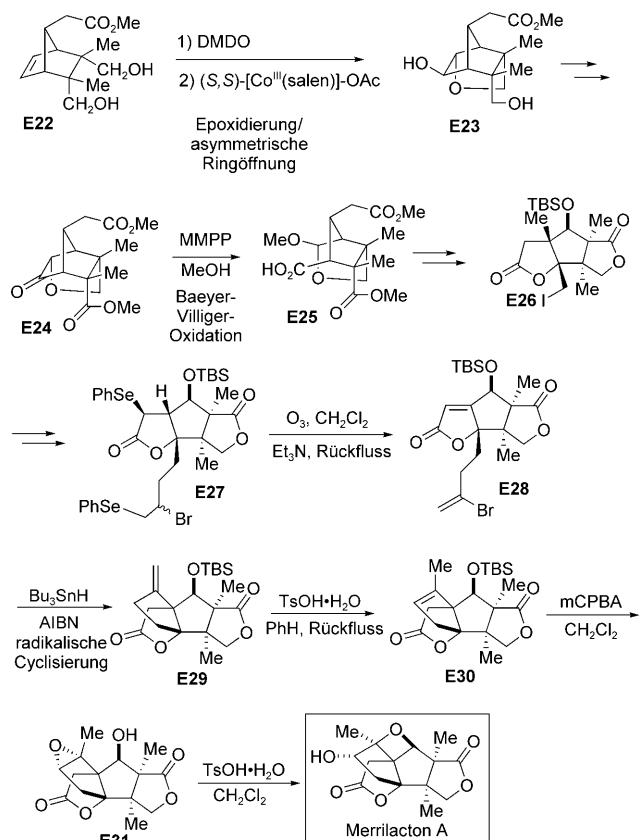
Schema 13. Asymmetrischer Zugang zu 11-O-Debenzoyltashironin.
PIFA = Phenyliod(III)-di(trifluoracetat).

durch Baeyer-Villiger-Oxidation **E25** entsteht. Eine zweite wichtige Umwandlung ist die durch freie Radikale induzierte Cyclisierung des Vinylbromids **E28** zum Tetracyclus **E29**, der das Kohlenstoffgerüst des Naturstoffs aufweist. Diese Verbindung wird wie gezeigt auf einfache Weise zu Merrilacton umgesetzt.

3. Potenzielle therapeutische Biologika durch chemische Synthese

3.1. Kohlenhydratsynthese: Hintergründe

Unser Interesse an der Synthese von Oligosacchariden kam mit der Entwicklung einer Cycloadditionsreaktion auf, bei der selektiv Dihydropyrone entstanden (Schema 15).^[43] Wir überlegten, ob die so erhaltenen Addukte als monomere Einheiten in einer allgemeinen Synthese von Kohlenhydraten genutzt werden könnten. Dabei gingen wir davon aus, dass das Strukturmotiv des Glycals, das aus dem Dihydropyron-addukt erhältlich ist, ein passender Synthesebaustein für Oligosaccharide sein könnte. Glycale, die nur drei statt fünf Hydroxygruppen enthalten, besitzen eine funktionelle Alkeneinheit, die sich für eine Differenzierung im Oligomerisierungsprozess eignen kann. Es war zwar bereits bekannt, dass Glycale als effiziente *Donoren* wirken können (z. B. durch Iodglycosidierung), aber wir erkannten, dass diese Synthesebausteine auch nützliche Glycosylakzeptoren sein könnten.^[44] Wir schlugen daher vor, komplexe Oligosaccha-

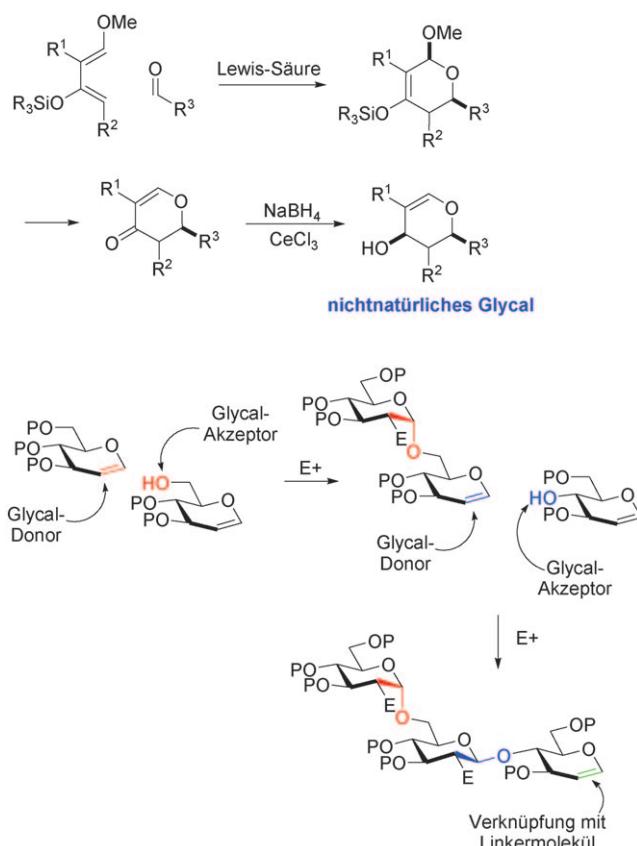


Schema 14. Synthese von Merrilacton A. DMDO = Dimethylidoxiran, MMPP = Magnesiummonoperoxyphthalat, AIBN = 2,2'-Azobisisobutyronitril, Ts = 4-Toluolsulfonyl, mCPBA = *meta*-Chlorperoxybenzoësäure.

ride über eine passend konzipierte Reihe von Schutzgruppenreaktionen ausschließlich aus Glycals iterativ aufzubauen. Diese synthetischen Oligosaccharide hätten natürlich ein endständiges Glycal mit einer Alkenfunktion, und bei Anwendung dieser Synthese müssten effiziente Methoden für ihre Derivatisierung und das Anhängen geeigneter Bindungsmotive entwickelt werden.

Wir haben eine Reihe von Methoden zur stereoselektiven Funktionalisierung des endständigen Glycals und zur Anknüpfung des Linker-Moleküls entwickelt. Die stereoselektive Funktionalisierung kann entweder über ein α -Epoxid (a, b) oder ein Iod sulfonamid (c, d) als Zwischenstufe verlaufen (Schema 16). Durch direkte nucleophile Addition an das α -Epoxid entsteht das α -verknüpfte Addukt (Schema 16a). Alternativ kann aus dem Glycal das Iod sulfonamid gebildet werden, aus dem durch Umsetzen mit einer Base ein Sulfonylaziridin entsteht, das danach leicht unter nucleophiler Addition reagiert (Schema 16c).

In bestimmten Fällen, in denen die sterischen Spannungen des Systems die direkte Glycosylierung der α -Epoxid- oder Iod sulfonamid-Zwischenstufe verhindern, kann ein zweistufiger Prozess genutzt werden, bei dem ein intermedialer Ethylthioglycosid gebildet wird (vgl. Schema 16b und d). Diese Verbindung kann anschließend wie gezeigt unter Addition reagieren.



Schema 15. Synthese von Kohlenhydraten durch Aufbau aus Glycalen.

Im Verlauf der letzten 25 Jahre haben wir und andere ein breites Spektrum von Methoden entwickelt, die den selektiven und effizienten Aufbau sehr komplexer Kohlenhydrate-

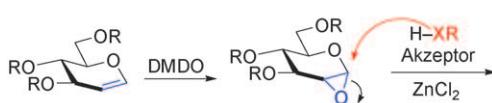
domänen ermöglichen. Über diese Synthesefortschritte wurde in anderem Zusammenhang eingehend berichtet.^[45]

3.2. Impfstoffe gegen Krebs auf der Basis von Kohlenhydraten

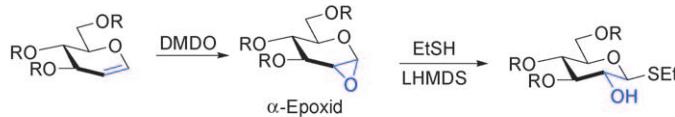
Klinikärzte, die auf dem Gebiet der Krebsimmunologie arbeiten, haben lange nach wirksamen Mitteln gesucht, die das Immunsystem dazu anregen, Tumorzellen zu erkennen und zu vernichten. Bei der Entwicklung eines Impfstoffs gegen Krebs müssen natürlich zuerst die besonderen Strukturmerkmale bösartig veränderter Zellen identifiziert werden, die vielleicht genutzt werden könnten, um das Immunsystem zu veranlassen, die Krebszellen als fremd zu erkennen. In diesem Zusammenhang ist uns und anderen aufgefallen, dass Krebszellen zu signifikanten Änderungen bezüglich der Art und Menge von Kohlenhydraten neigen, die sie als Glycoproteine oder Glycolipide an ihren Zelloberflächen aufweisen.^[45] Denkbar wäre ein tumorassoziiertes Antigen auf Kohlenhydratbasis, das bei richtiger Einführung in das Immunsystem eine Immunantwort auslöst, die zur Bildung von Antikörpern führt. Diese würden dann selektiv an Tumorzellen binden, die die betreffenden Kohlenhydrate überexprimieren, und sie vernichten.^[46]

Obwohl eine Reihe von tumorassoziierten Kohlenhydraten der Zelloberfläche identifiziert wurde, erschwerte die Heterogenität natürlich vorkommender Kohlenhydrate die Bemühungen, signifikante Mengen dieser Epitope aus natürlichen Vorkommen zu isolieren. Unsere Arbeitsgruppe favorisiert seit langem das therapeutische Potenzial von *vollständig synthetischen* Antigenen auf der Basis von Kohlenhydraten. Durch die Synthese kann ein Kohlenhydrat in einer Reinheit und Homogenität erhalten werden, die durch Isolierung nicht zu erreichen ist. Wie oben erwähnt, konzentriert sich ein langjähriges Programm in unserer Arbeits-

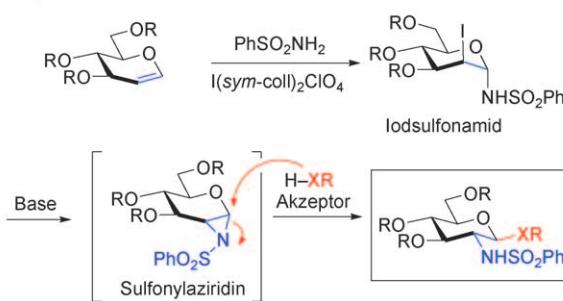
a) α -Epoxid-Intermediat:



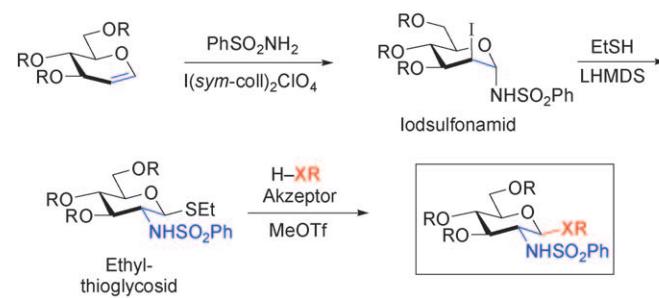
b) α -Epoxid-Intermediat:



c) Iod sulfonamid-Intermediat:



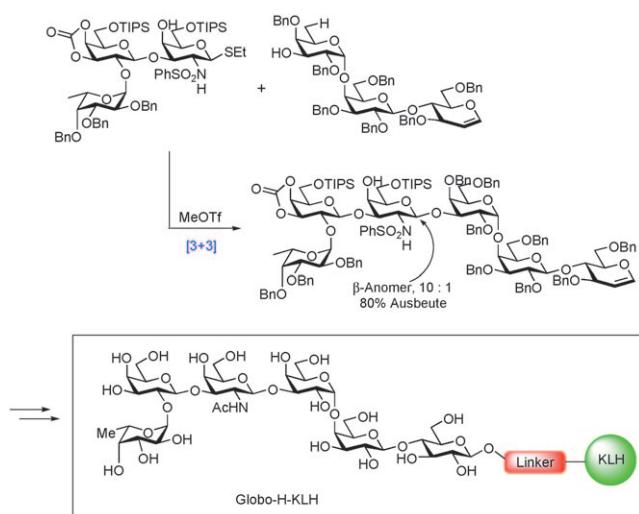
d) Iod sulfonamid-Intermediat:



Schema 16. Methoden zur Funktionalisierung des endständigen Glycals.

gruppe auf die Entwicklung von Technologien, die den Aufbau von Kohlenhydraten ermöglichen. Wir haben unsere kontinuierlich verbesserten Methoden genutzt, um zunehmend kompliziertere und hoffentlich therapeutisch nutzbare, vollständig synthetische Krebsimpfstoffe auf der Basis von Kohlenhydraten herzustellen.

Die erste Generation unserer komplett synthetischen Impfstoffe auf Kohlenhydratbasis hatte monovalenten Charakter, d.h. jedes Konstrukt bestand aus einem einzigen tumorassoziierten Antigen, das über einen kurzen Linker an ein immunogenes Trägermolekül (z.B. das KLH-Protein) gebunden war. Eine Reihe dieser monovalenten Vakzine der ersten Generation lieferte unter immunologischen Bedingungen vielversprechende Ergebnisse, und eines davon, **Globo-H-KLH**^[47] (Schema 17), soll demnächst in klinischen Tests der Phase-II/III gegen Brustkrebs geprüft werden.



Schema 17. Globo-H-KLH-Konjugat.

Mit dem Fortschreiten unseres Programms zu Kohlenhydratkonzentraten gegen Krebs erhielten wir wertvolle Einblicke in die Art der Immunantwort, die unsere synthetischen Konstrukte hervorriefen, und dabei wurden einige grundätzliche Mängel des monovalenten Ansatzes der ersten Generation erkennbar. Anhand der neuen Informationen begannen wir mit der Planung noch komplizierterer Vakzin-Konstrukte. Gleichzeitig entwickelten wir immer effizientere Methoden für die Kohlenhydratsynthese. Ein ausführlicher Bericht über den Fortschritt des Kohlenhydrat-Impfstoffprogramms geht über den Rahmen dieses Aufsatzes hinaus und ist an anderer Stelle nachzulesen.^[48] Wir stellen hier einige unserer neuesten Arbeiten an der Spitze dieses Programms vor.

Der Umstand, dass die Antigenexpression auf Tumorzelloberflächen in Wirklichkeit eine erhebliche Heterogenität aufweist, stellt eine wichtige Einschränkung für das Leitbild monovalenter Impfstoffe dar. So können Art und Verteilung der an der Zelloberfläche exprimierten Antigene sehr heterogen sein und oft in Abhängigkeit von der Zellentwicklung

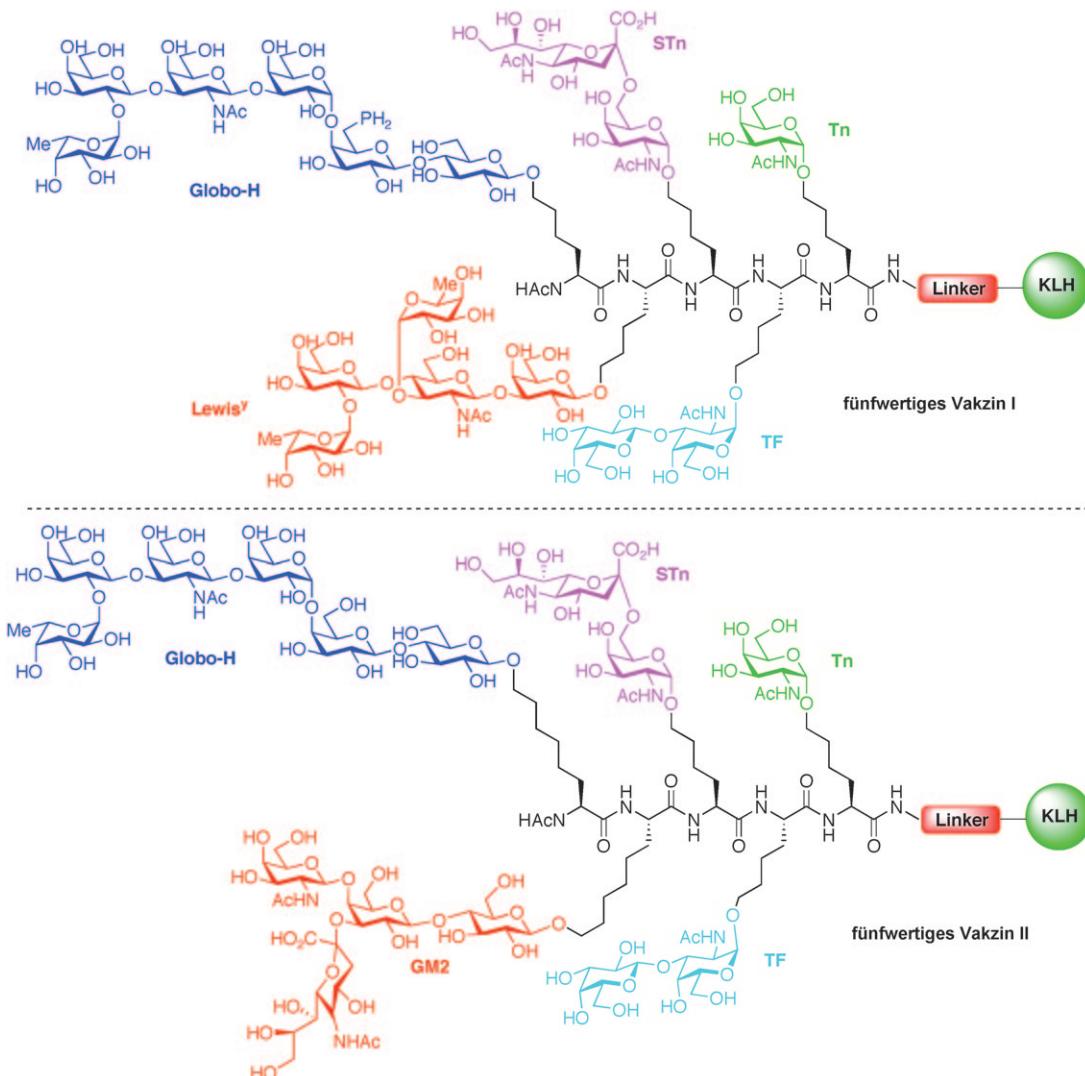
schwanken.^[49] Tatsächlich gibt es selbst innerhalb einer bestimmten Krebsart erhebliche Antigenheterogenität. Theoretisch könnte man ein *multiantigenes* Konstrukt mit mehreren, mit einer bestimmten Krebsart assoziierten Kohlenhydrat-Antigenen verwenden, um verschiedene Antikörper zu induzieren, die einen größeren Anteil an Tumorzellen effektiv angreifen würden.

Wir wollten das Problem der Heterogenität von Kohlenhydraten an Zelloberflächen mit unimolekularen, multiantigenen Vakzin-Konstrukten lösen und synthetisierten ein sehr komplexes pentavalentes Vakzin-Konstrukt mit den fünf Antigenen Globo-H, Lewis^Y, STn, TF und Tn, wovon jedes mit Brustkrebs und Prostatakrebs assoziiert ist (Schema 18).^[50] Erste immunologische Studien lieferten vielversprechende Resultate.^[51] Mit dem KLH-konjugierten pentavalenten Vakzin I immunisierte Mäuse produzierten IgM- und/oder IgG-Antikörper gegen vier der fünf Antigene, wie im ELISA-Assay nachgewiesen wurde. Lediglich das Lewis^Y-Antigen rief keine messbare Immunantwort hervor, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass es endogen exprimiert wird.

Auf der Basis dieser Ergebnisse synthetisierten wir ein pentavalentes Vakzin II der zweiten Generation. Anstelle des Lewis^Y-Kohlenhydrats enthält es GM2, das ebenfalls an den Oberflächen von Brust- und Prostatakrebszellen überexprimiert wird.^[52] Erfreulicherweise wurden nach der Impfung von Mäusen mit dem KLH-konjugierten pentavalenten Vakzin II IgM- und/oder IgG-Antikörper gegen jedes der fünf Antigene im Vakzin-Konstrukt gebildet. Dieses pentavalente Vakzin II der zweiten Generation wird derzeit für klinische Tests der Phase I vorbereitet.

Nach dem Auffinden dieser auf chemischer Synthese basierenden vielversprechenden Leitstruktur für die künftige Entwicklung von Krebsimpfstoffen verfolgten wir gleichzeitig verbesserte Strategien für die Präsentation des Vakzin-Konstrukt gegenüber dem Immunsystem. Eine besondere Herausforderung war dabei das Hervorrufen einer robusten T-Zellenantwort. Untersuchungen zufolge induzieren Antigene auf Kohlenhydratbasis allein nicht unbedingt starke T-Zellantworten. Derzeit werden mehrere Möglichkeiten untersucht, um diese Einschränkung zu beheben. Im Vordergrund dieser Studien steht eine Reihe neu synthetisierter Vakzin-Konstrukte mit zwei Domänen, die neben den tumorassoziierten Kohlenhydratabschnitten auch Peptidfragmente enthalten, die vermutlich die Antwort der T-Zellen verstärken. In dieser Hinsicht interessierten uns besonders die tumorassoziierten Mucinpeptide,^[53] die eine T-Zellenantwort auslösen sollen.^[54] Ihr Einbau in das Gerüst des Vakzin-Konstrukt könnte vielleicht zu einer kumulativ verstärkten Antikörperantwort führen. Wir haben nun ein Cluster-Gb₃-MUC5AC-Hybrid-Vakzinkonjugat hergestellt, das aus alternierenden Wiederholungseinheiten des tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigens, Gb₃ und des auf MUC5AC basierenden Mucinpeptids besteht (Schema 19).^[55] Analog haben wir beträchtliche Fortschritte bei der Synthese eines multi-antigenen MUC1-Hybrids gemacht, bei dem das immunogene MUC1-Peptid im pentavalenten Vakzin II enthalten ist.^[56]

Eine etwas andere Strategie wurde bei dem Fucosyl-GM1-MHC-II-Hybrid-Vakzin-Konstrukt verfolgt. Immuno-

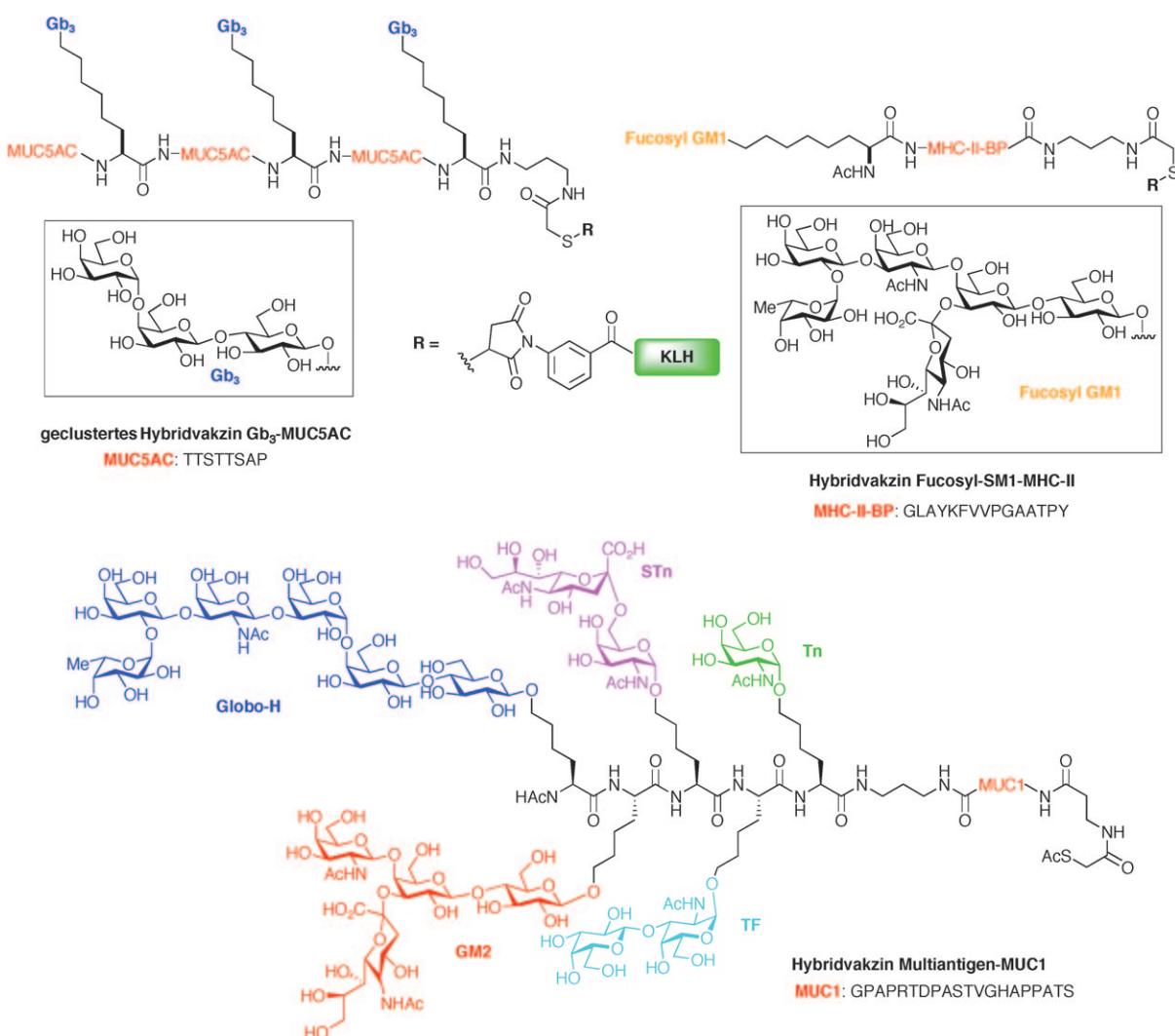


Schema 18. Unimolekulare multiantigene Vakzine.

gene Trägerproteine wie KLH enthalten MHC-II-bindende Peptide, die dazu beitragen, die Kohlenhydratepitope des Vakzins den T-Zellen für eine Aktivierung zu präsentieren.^[57] Die immunogene Aktivität eines Vakzins kann gesteigert werden, wenn die Nähe der MHC-II-bindenden Peptide zu den Kohlenhydratepitopen sichergestellt wird. Unsere Konstrukte sind zwar bereits an KLH konjugiert, aber die Nähe zu einer MHC-II-Sequenz konnte durch den Einbau eines MHC-II-bindenden Peptids am eigentlichen Glycopeptid zusätzlich gesichert werden. Wir haben so ein Hybridkonjugat synthetisiert, in dem das Kohlenhydrat-Antigen, Fucosyl-GM1, an ein MHC-II-bindendes Peptid angehängt ist.^[58] Immunologische Untersuchungen dieser Vakzin-Konstrukte werden derzeit durchgeführt.

In den vergangenen zehn Jahren wurde unser Programm zu vollständig synthetischen Krebsimpfstoffen auf der Basis von Kohlenhydraten erheblich weiterentwickelt. Es wurden acht Tests der Phase I mit vollständig synthetischen Antigenen auf Kohlenhydratbasis durchgeführt. Die Stärke und

Vielseitigkeit des Programms beruhen auf chemischen De-novo-Synthesen von zunehmend komplexen Kohlenhydrat-Konstrukten. Durch enge Kommunikation mit Mitarbeitern in der Immunologie und der Klinik konnten wir die Stärken und Schwächen der von uns synthetisierten Konstrukte bestimmen und noch effizientere und breit wirkende potenzielle Wirkstoffe entwickeln. Diese großen, komplexen Verbindungstypen gehören zwar traditionell zum Gebiet der „Biologika“, aber das Programm hat erheblich von der Logik der iterativen chemischen Synthese und der biologischen Untersuchung profitiert, die wir auch bei unseren niedermolekularen Verbindungen anwenden. Es muss nicht betont werden, dass die Durchführung dieser Synthesen komplexer Kohlenhydrate ihre eigenen Syntheseprobleme mit sich bringt, und zur Fortsetzung des Programms war die Entwicklung einer Reihe von methodischen Voraussetzungen erforderlich, die auch auf einem breiteren Gebiet der Kohlenhydratsynthese von Nutzen sein sollten.



Schema 19. Folgegeneration von Antitumor-Vakzinen mit zwei Domänen auf Kohlenhydratbasis.

3.3. Synthese von Glycoproteinen

Dieser Aufsatz schließt mit der Besprechung eines neuen Schwerpunkts unseres „biologischen“ Syntheseprogramms: der De-novo-Synthese von natürlich vorkommenden, biologisch wirksamen Glycoproteinen. Die posttranskriptionale Glycosylierung von Proteinen ist in der Natur weit verbreitet, und die so angehängten Kohlenhydratdomänen verleihen dem Protein häufig Stabilität und biologische Aktivität.^[59] Der potenzielle therapeutische Wert von Glycoproteinen findet zunehmendes Interesse. Zu den bekanntesten klinisch genutzten Glycoprotein-Therapeutika gehören Erythropoietin alpha (EPO),^[60] das die Bildung roter Blutkörperchen anregt, und das die Fertilität steuernde humane Follikelstimulierende Hormon (hFSH).^[61]

Trotz umfangreicher Forschung auf dem Gebiet der Glycoproteine gibt es noch einen wichtigen erschwerenden Faktor: Bei der Biosynthese entsteht das Glycoprotein normalerweise als ein Gemisch aus Glycoformen, die nicht ohne weiteres zu trennen sind.^[62] Daher stellt sich die Frage, ob es

Vorteile bietet, homogene Varianten dieser Verbindungen zugänglich zu machen. Jüngste Fortschritte auf dem Gebiet des biosynthetischen Engineering ermöglichen seit kurzem einen erfolgreichen Zugang zur Biosynthese homogener Glycoproteine. Insbesondere durch Glycoengineering des Hefestamms *Pichia pastoris*^[63] konnten homogene sialylierte Glycoproteine erhalten werden. Alternativ sollte die chemische De-novo-Synthese ein brauchbares Mittel sein, um einzelne Glycoformen eines Glycoproteins zugänglich zu machen und die Auswirkungen der Glycosylierung auf die Molekülstruktur und die biologische Wirkung systematisch zu untersuchen.

Wie im Folgenden beschrieben wird, haben wir mit einem breit aufgestellten Syntheseprogramm für Glycoproteine begonnen, das schließlich zur homogenen Synthese der beiden therapeutisch wichtigen, mehrfach glycosylierten Proteine EPO und hFSH führte. Dabei haben wir eine Reihe von methodischen Voraussetzungen für die effiziente Verknüpfung komplexer Peptid- und Glycopeptidfragmente entwickelt.

3.3.1. Entwicklung von Verknüpfungsmethoden für Glycopeptide

Die Arbeiten zur Totalsynthese von Glycoproteinen boten unzählige Gelegenheiten zur Entwicklung neuer Methoden, von denen wir annehmen, dass sie für die Synthese insgesamt von Nutzen sind. Die De-novo-Synthese eines großen, mehrfach glycosylierten Proteins ist keine einfache Aufgabe, und zu Beginn fehlen zweifellos Methoden für alle Aspekte des Syntheseprozesses, von der Synthese der Oligosacchariddomäne über die Verknüpfung der Kohlenhydratmit der Peptiddomäne und schließlich die Verbindung der beiden Glycopeptidbausteine. Auch wenn die im Verlauf dieses Projekts entwickelten Methoden hier nicht umfassend besprochen werden können,^[64] ist es vielleicht nützlich, auf einige Fortschritte bei der Verknüpfung näher einzugehen, die sich als entscheidend für die Weiterentwicklung unserer Totalsynthese von Glycoproteinen erwiesen haben.

1994 gelang Kent et al. mit der Entdeckung der nativen chemischen Ligation (NCL) ein entscheidender Durchbruch auf dem Gebiet der Peptidsynthese.^[65] Die NCL ist eine vielseitige Methode und ermöglicht die Verknüpfung großer Peptidfragmente. Schema 20a zeigt die NCL zweier Peptide, von denen das eine einen C-terminalen Thioester und das andere einen N-terminalen Cysteinrest trägt.

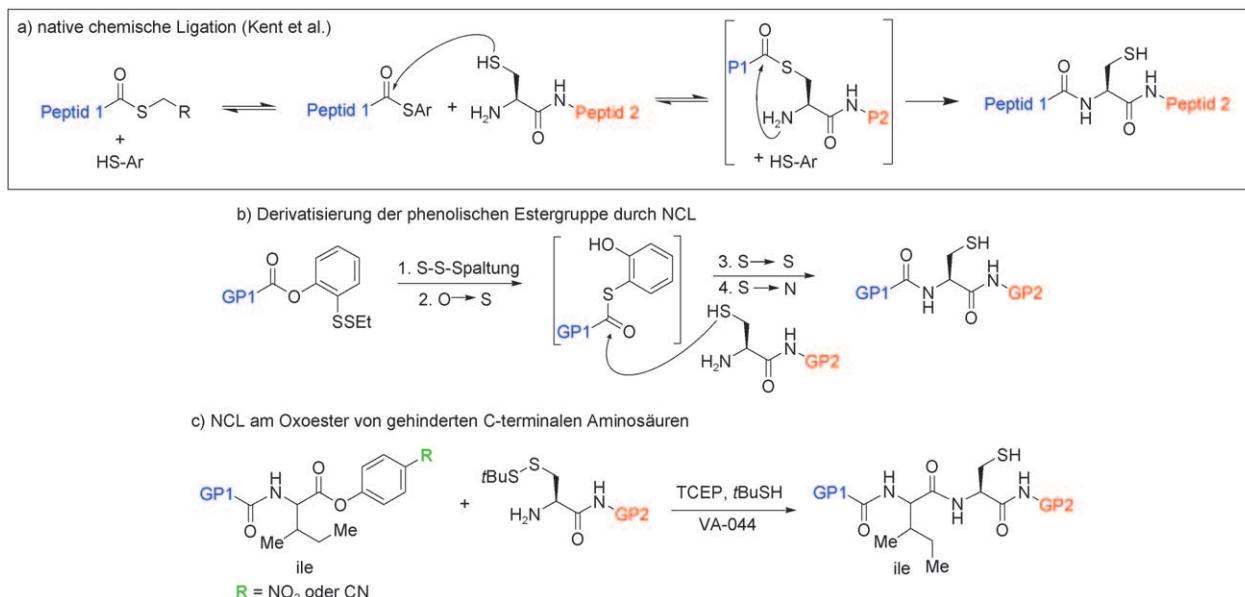
Im Zusammenhang mit unserer Synthesestrategie für mehrfach glycosylierte Proteine wollten wir den Anwendungsbereich der NCL auf die Verknüpfung von zwei *Glycopeptiden* ausdehnen. Eine direkte Erweiterung der NCL-Methode von Kent kam hierfür nicht in Betracht, weil Schwierigkeiten bei der Synthese eines zuvor gebildeten Glycopeptidthioesters erwartet wurden. Daher entwickelten wir eine Variante mit einem verhältnismäßig reaktionsträgen C-terminalen *ortho*-Thiophenolester an dem einem und einem geschützten N-terminalen Cysteinrest an dem anderen

Glycopeptidbaustein (Schema 20b).^[66] Bei gleichzeitiger Reduktion der beiden Disulfide erfolgt eine intramolekulare O→S-Wanderung der Phenoleinheit unter Bildung eines intermidiären Thioesters, der ausreichend aktiviert ist, um mit dem freien Cysteinrest des zweiten Glycopeptids einen intermolekularem Thioesteraustausch einzugehen. Die dabei entstehende unimolekulare Zwischenstufe reagiert spontan unter intramolekularem Acyltransfer zum Glycopeptidadukt mit zwei verschiedenen Glycosylierungsorten.

Später haben wir eine direkte Oxoester-Variante entwickelt, bei der ein *p*-NO₂- oder *p*-CN-substituierter Phenoester verwendet wird, dessen Aktivierung für die Cysteinkupplung ausreicht (Schema 20c).^[67] Diese aktivierte Oxoester sind besonders für die Ligation an sterisch gehinderte C-terminale Reste, beispielsweise Isoleucin (ile), geeignet.

Nachdem das Problem der allgemeinen Verknüpfung zweier Glycopeptide zufriedenstellend gelöst war, beschäftigten wir uns mit einer weiteren, bei der Totalsynthese von Glycoproteinen auftretenden Komplikation. So erforderten die in Schema 20 skizzierten damaligen Ligationsmethoden für Glycopeptide das Vorhandensein eines Cysteinrests an der Verknüpfungsstelle. Tatsächlich sind Cysteinreste in natürlich vorkommenden Proteinen und Glycoproteinen jedoch recht selten. Unsere allgemeine Synthesestrategie für EPO verlangt beispielsweise den Zusammenbau von vier einzelnen Peptidbausteinen mit je einer Kohlenhydratdomäne, die nach unserer Ligationsmethode für Glycopeptide verknüpft werden; allerdings enthält das Peptidgerüst von EPO an logischen Trennungspunkten keine Cysteinreste.

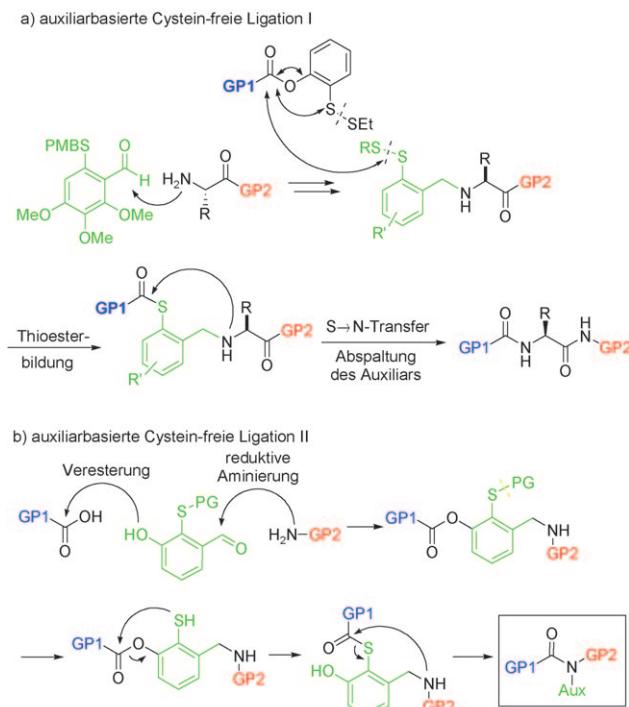
Für dieses Problem haben wir mehrere Lösungen entwickelt, darunter zwei auf Hilfsgruppen basierende Ligationsmethoden ohne Verwendung von Cystein. Beide lehnen sich stark an die Vorgehensweise an, die bei unserer ursprünglichen Ligationsmethode mit Cystein genutzt wurde (siehe



Schema 20. Glycopeptid-Glycopeptid-Ligationsmethoden auf der Basis von Cystein. TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphan, VA-044 = 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid.

Schema 20b). Bei der ersten Methode wird am N-terminalen Glycopeptidbaustein ein Thiobenzol als Auxiliar eingeführt (Schema 21a).^[68] Dieses dient als Surrogat für den Cysteinrest und verbindet vorübergehend die beiden Glycopeptid-

ckelt,^[70] mit der Thioaminosäuren als Bestandteil eines komplexen Glycopeptids selektiv in die entsprechenden Aminosäuren überführt werden konnten: ein Cystein in ein Alanin,^[71] ein γ -Thiovalin in ein Valin^[71] und ein γ -Thiothreonin in ein Threonin^[72] (Schema 22). Von Bedeutung ist hierbei, dass Alanin-, Valin- und Threoninreste in natürlichen Proteinen und Glycoproteinen deutlich häufiger vorkommen als Cysteinreste. Wir waren nun in der Lage, über eine einfache zweistufige Synthesestrategie aus Glycopeptidligation und Reduktion formal eine Verknüpfung an Alanin-, Valin- und Threoninpositionen zu erreichen.



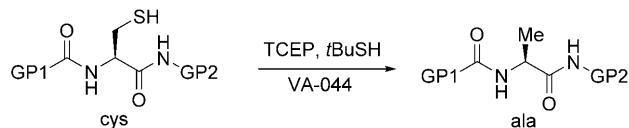
Schema 21. Glycopeptid-Glycopeptid-Ligationsmethoden ohne Cystein.

bausteine, um die Reaktionspartner in die für den S \rightarrow N-Acyltransfer erforderliche Nähe zu bringen. Nach einer einfachen zweistufigen Abspaltung des Auxiliars wird das Glycopeptid erhalten. Diese Ligationssequenz ohne Cystein konnte sogar bei komplizierten Systemen erfolgreich verwendet werden. Ihre praktische Anwendung wird dadurch eingeschränkt, dass die Reaktion am effizientesten verläuft, wenn mindestens einer der terminalen Aminosäurereste entweder ein Glycin- oder ein Alaninrest ist. Wenn beide Aminosäuren am Ligationsort stark verzweigt sind, sinkt die Reaktionsausbeute drastisch.

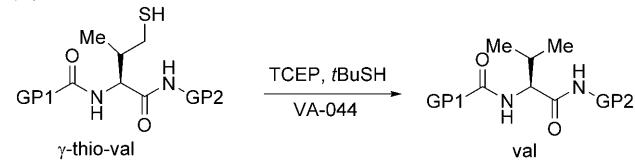
Eine zweite, bei uns entwickelte Ligationsmethode ohne Cystein ist in Schema 21b gezeigt.^[69] Für diese Verknüpfung ist ein Substrat charakteristisch, in dem die beiden Glycopeptidfragmente eine *meta*-Stellung am Benzylgerüst einnehmen und die Position zwischen ihnen von einem geschützten Thiol besetzt wird. Durch Abspalten der Schutzgruppe am Thiol wird ein O \rightarrow S-Acyltransfer ausgelöst, bei dem ein Thioester entsteht, der dann für den intramolekularen S \rightarrow N-Acyltransfer mit dem Amin des zweiten Glycopeptids positioniert wird. Diese Reaktionssequenz ist zwar recht effizient, ein Hauptproblem ist derzeit aber noch, dass die Hilfsgruppe mit Standardmethoden nicht einfach zu entfernen ist.

Schließlich haben wir als sehr nützliche und praktische Methode eine effiziente radikalische Desulfurierung entwi-

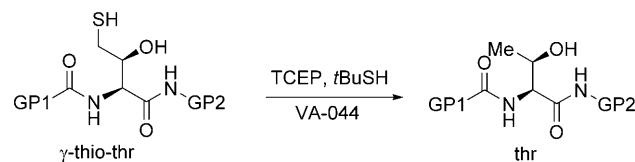
a) Cystein \rightarrow Alanin-Reduktion



b) γ -Thiovalin \rightarrow Valin-Reduktion



b) γ -Thiothreonin \rightarrow Threonin-Reduktion

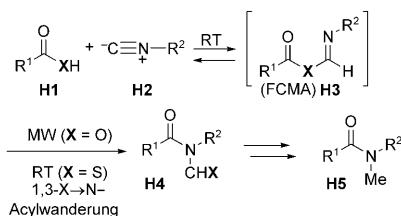


Schema 22. Cysteinfreie Glycopeptid-Glycopeptid-Ligationsmethoden durch radikalische Desulfurierung.

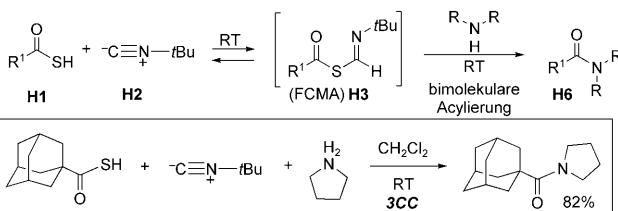
3.3.2. Isonitrile

Im Rahmen unserer Arbeiten über Reaktionen der Isonitrile haben wir vor kurzem neue Methoden zur Bildung schwieriger Peptidbindungen unter neutralen Reaktionsbedingungen entwickelt.^[73] Bei der in Schema 23 skizzierten Strategie einer „Zweikomponenten-Kupplung“ (2CC) reagieren eine Säure und ein Isonitril zu *N*-Formylamidaddukten. Diese Reaktion verläuft über ein gemischtes Formimidat-Carboxylat anhydrid (FCMA- oder Thio-FCMA-) als Zwischenstufe (**H3**, X = S oder O), das spontan unter 1,3-X \rightarrow N-Acyltransfer das *N*-Formylamidaddukt liefert. Die *N*-Formylgruppe ist sehr vielseitig und lässt sich leicht in die entsprechende *N*-Methylgruppe überführen.^[74a] Damit bietet diese Umwandlung einen Zugang zu nützlichen und synthetisch schwierigen tertiären Amiden. Nach unseren Beobachtungen sind Thiosäuren wesentlich reaktiver als die entsprechenden Säuren und können in 2CC-Reaktionen bei Raumtemperatur umgesetzt werden, wohingegen die Kupplung von Carbonsäuresubstraten Mikrowellenbestrahlung erfordert.

• Zweikomponentenkupplung:



• Dreikomponentenkupplung:



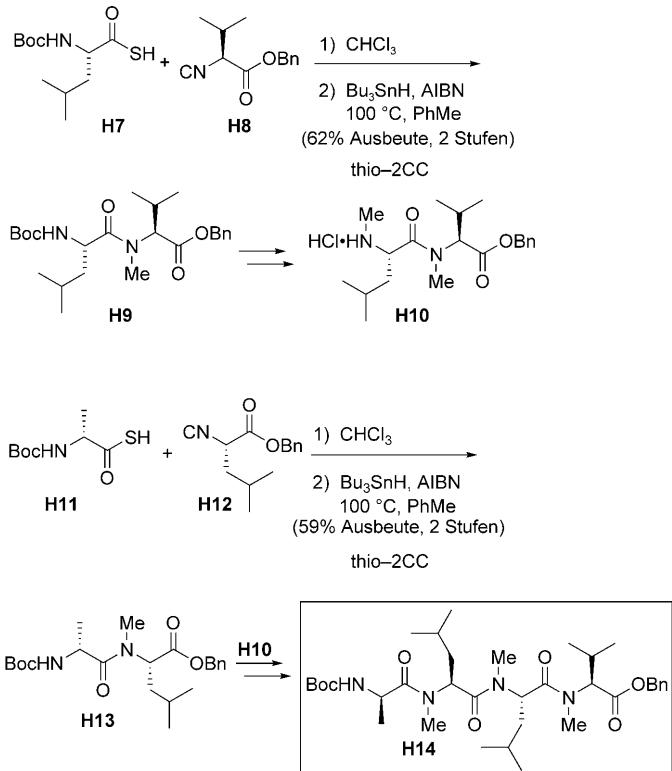
Schema 23. Amidkupplungen mit Isonitrilen: Zweikomponenten-Kupplung (2CC) und Dreikomponenten-Kupplung (3CC).

Wir wollten den Anwendungsbereich dieser Methode erweitern und untersuchen, ob die mutmaßlichen FCMA-Zwischenstufen (**H3**) auch brauchbare *bimolekulare Acylierungsmittel* sind.^[74] Dabei wollten wir Reaktionsbedingungen ermitteln, unter denen das FCMA-Intermediat *vor* der intramolekularen 1,3-*X*→*N*-Acylwanderung durch ein geeignetes externes Nucleophil abgefangen wird. Unter diesen Bedingungen wäre das Isonitril **H2** eine einfache „Wegwerfverbindung“ und würde nicht in das Endprodukt eingebaut. Der Vorteil einer solchen Umwandlung ist, dass das Amin direkt im Kupplungsschritt eingesetzt und so die vorherige Bildung eines „hochwertigen“ Isonitril-Strukturmotivs vermieden wird. Die Durchführbarkeit dieser Methode wird durch die Verknüpfung einer Reihe von Thioestern mit primären oder sekundären Aminen in Gegenwart von *tert*-Butylisonitril bei Raumtemperatur belegt, die zu den entsprechenden Amiden führt (Schema 23). Mechanistischen Untersuchungen zufolge wirkt die Thio-FCMA-Zwischenstufe bei dieser Umwandlung als aktiver Acyldonor.

3.3.3. Cyclosporin A

Die Effizienz und Vielseitigkeit der beschriebenen Isonitril-gestützten Amidbildung wurde nun mit einer schnellen Synthese des Cytokin-Inhibitors Cyclosporin A bewiesen (Schema 24–26).^[75] Dieser bekannte Naturstoff ist ein cyclisches Peptid^[76] mit sieben *N*-methylierten Positionen, die für die biologische Wirkung entscheidend sind. Wir gingen davon aus, dass unsere neuen Methoden auf der Basis von Isonitrilen ideal sind, um das cyclische Peptidgerüst mit dem benötigten *N*-Methylierungsmuster zu erhalten. Unser Syntheseplan für Cyclosporin sah den Aufbau der beiden Peptidfragmente **H14** und **H24** vor. **H14** wurde über eine kurze Sequenz aus Zweikomponenten-Kupplungen zwischen Thiosäure- und Isonitrilsubstraten hergestellt (Schema 24).

Das für die Synthese von **H24** hergestellte Dipeptid **H17** wurde durch mikrowellengestützte Zweikomponenten-



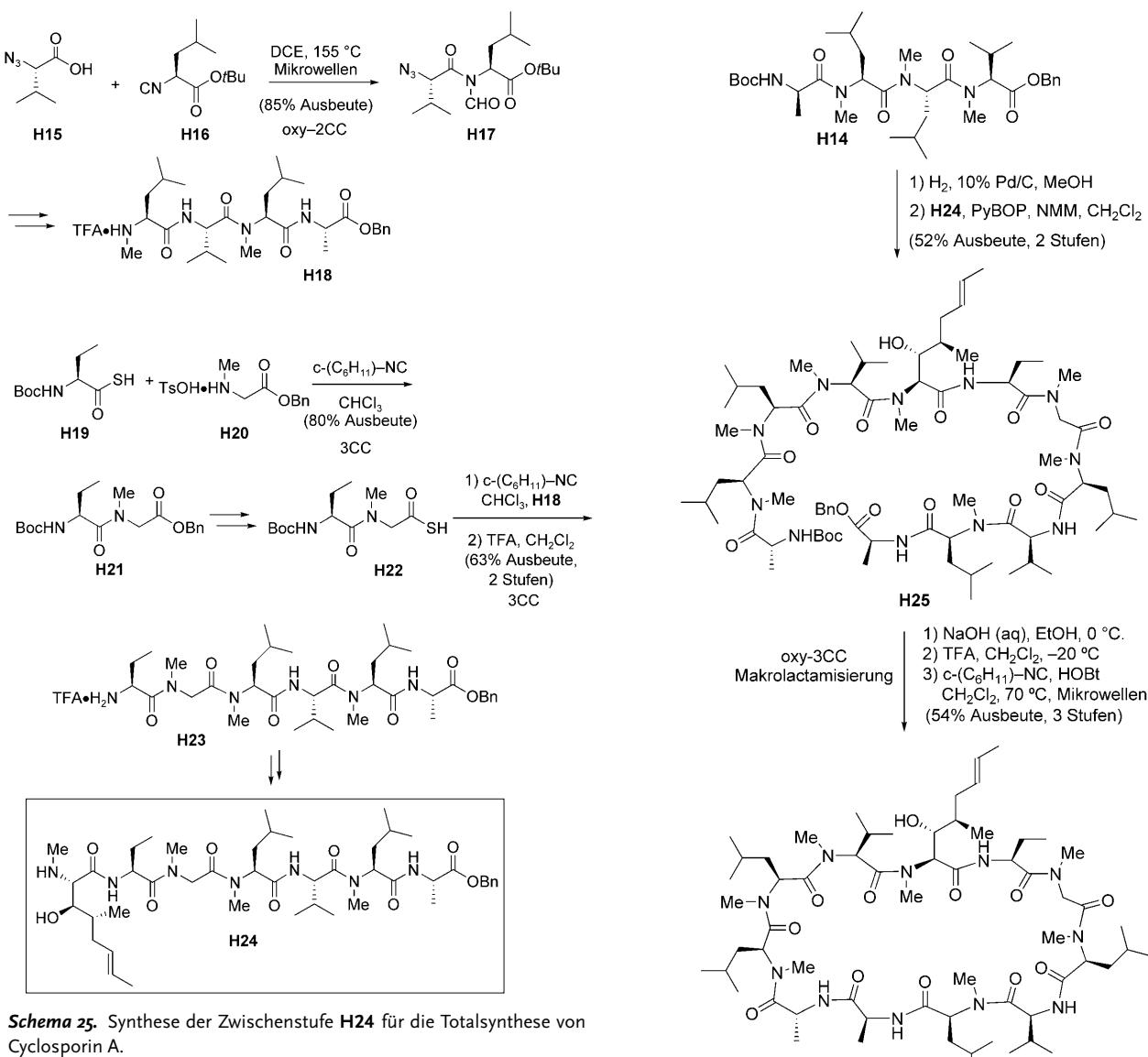
Schema 24. Synthese der Zwischenstufe **H14** für die Totalsynthese von Cyclosporin A.

Kupplung zwischen der Carbonsäure **H15** und dem Isonitril **H16** synthetisiert (Schema 25). Auch die Synthese von **H24** beinhaltet zwei direkte 3CC-Reaktionen zwischen Thiosäure- und Aminsubstraten in Gegenwart von „geopfertem“ Cyclohexylisonitril.

Die Peptide **H14** und **H24** wurden zur Zwischenverbindung **H25** verknüpft (Schema 26). Ausgehend von dieser Stufe konnten wir unsere 3CC-Methode auf die entscheidende Makrolactamisierung anwenden. Diese erfolgreiche Lactambildung ist besonders bemerkenswert, weil 3CC-Reaktionen zuvor auf die reaktiveren Thiosäuresubstrate beschränkt waren. Allerdings ist das Substrat im vorliegenden Fall durch Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Strangs präorganisiert. In Gegenwart von HOBT und Cyclohexylisonitril lieferte die nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe aus **H25** erhältene Carbonsäure unter Makrolactamisierung den Naturstoff Cyclosporin A in guter Gesamtausbeute (54 % bezogen auf **H25**). Die hier vorgestellte, schnelle und effiziente Synthese von Cyclosporin A veranschaulicht das Komplexität aufbauende Potenzial der neuen Amidbildung auf der Basis von Isonitrilen.

3.3.4. Erythropoietin

Erythropoietin (EPO) ist ein natürlich vorkommendes Glycoprotein, das die Produktion roter Blutkörperchen anregt und klinisch häufig zur Behandlung von chronischer und krebsbedingter Anämie verwendet wird. Krebspatienten



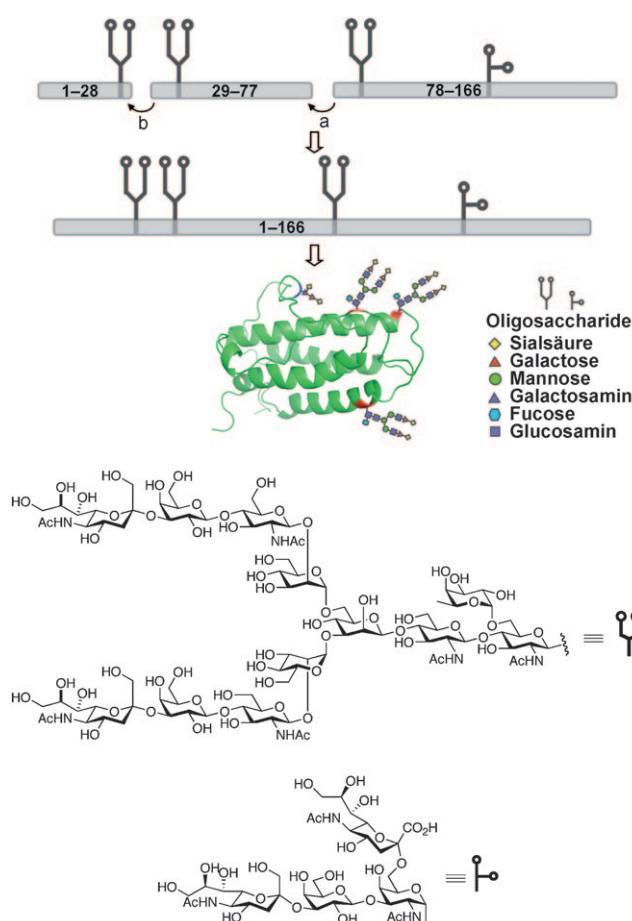
können während einer Chemotherapie eine Anämie entwickeln, und Erythropoietin wird oft benötigt, um die Behandlung fortsetzen zu können. Allerdings ist Erythropoietin, ein konserviertes Protein aus 166 Aminosäuren und mit vier Glycosidierungsstellen, aus natürlichen Quellen oder durch rekombinante Methoden derzeit nur als Gemisch von Glycoformen erhältlich. Man nimmt an, dass die verschiedenen Glycoformen von Erythropoietin unterschiedlich hohe biologische Aktivität aufweisen, aber ohne strukturell homogenes Erythropoietin ist es sehr schwierig, die relative Wirkung der einzelnen Glycoformen des Glycoproteins genau zu bestimmen und so zu versuchen, verbesserte Erythropoiesemittel zu entwickeln.

Wir arbeiten derzeit an der konvergenten Totalsynthese von homogenem Erythropoietin alpha. Ein langfristiges Ziel ist der Aufbau einer kleinen Kollektion von synthetischen homogenen Erythropoietin-Glycoformen, deren Untersuchung hoffentlich ein SAR-Profil von Erythropoietin liefert

Schema 26. Synthese von Cyclosporin A. PyBOP = (Benzotriazol-1-yloxy)tritypyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat, HOBT = Hydroxybenzotriazol.

und vielleicht zum Auffinden besserer Erythropoiesemittel führt. Unsere Synthesestrategie für EPO (Schema 27) beinhaltet den Aufbau von drei Glycopeptideinheiten: EPO(1–28), EPO(29–77) und EPO(78–166). Diese großen Fragmente werden anschließend iterativ durch sequenzielle Kondensationen zum homogenen Glycoprotein verknüpft.

Auf der Basis der oben beschriebenen Ligationsmethoden für Glycoproteine haben wir kürzlich die drei großen Glycopeptidfragmente, die zusammen das vollständige Peptidgerüst bilden, sowie die vier Oligosacchariddomänen von Erythropoietin synthetisiert. Die Synthese des Fragments Ala¹-Gly²⁸ beinhaltet eine Cysteinligation zwischen **H26** und **H27** zum Glycopeptid **H28** (Schema 28).^[77] Die bei uns entwickelte Methode der Schwefelreduktion (siehe Schema 28)

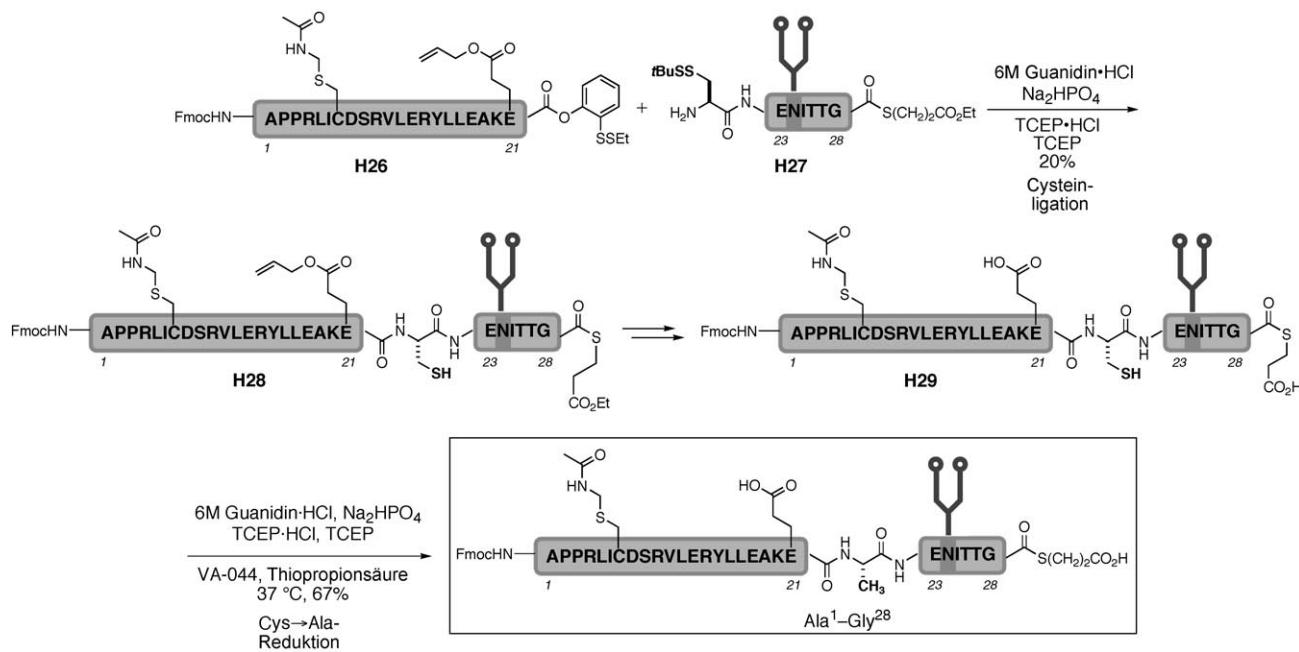


Schema 27. Synthesestrategie für Erythropoietin alpha (EPO).

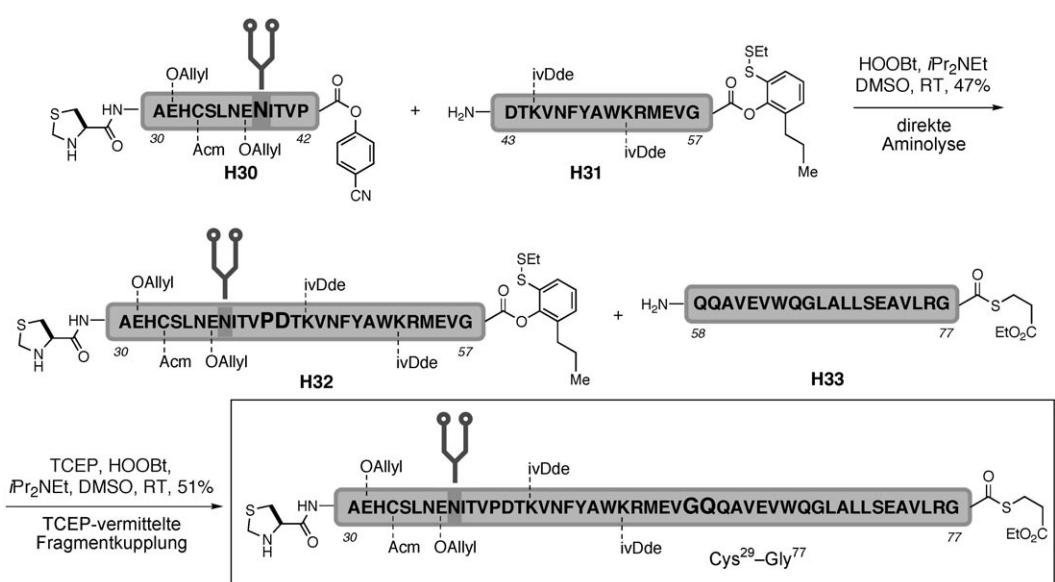
bewirkte in der Zwischenstufe **H29** die erforderliche Cys²⁹→Ala-Umwandlung am Ligationsort und ergab so den Ala¹-Gly²⁸-Baustein von EPO.

Für die Synthese der Cys²⁹-Gly⁵⁷-Einheit nutzten wir eine schnelle und konvergente reiterative Fragmentkupplung.^[78] Wir synthetisierten zunächst das Glycopeptid **H30** mit einem C-terminalen *para*-Cyanphenylester und das Peptid **H31** mit einem C-terminalen maskierten Thioester, der sowohl eine *ortho*-Disulfidgruppe als auch einen *ortho*-Propylsubstituenten besitzt (Schema 29). Die *ortho*-Propylgruppe ist entscheidend, um die Hydrolyse bei der ersten Kupplungsreaktion zu unterdrücken. **H30** und **H31** wurden schließlich glatt durch direkte Aminolyse zu **H32** verknüpft. Diese Zwischenverbindung geht eine TCEP-vermittelte Kupplung mit dem Peptid **H33** ein, bei der die Glycopeptiddomäne Cys²⁹-Gly⁵⁷ entsteht. Der maskierte C-terminale Thioester, der in der ersten Fragmentverknüpfung inert war, wirkte dabei unter modifizierten Kupplungsbedingungen als effizienter Acyldonor. Der Cys²⁹-Gly⁵⁷-Baustein besitzt mit dem C-terminalen Alkylthioester eine nützliche Funktionalität für die abschließende Anknüpfung der drei EPO-Domänen.

Schließlich wurde der Gln⁷⁸-Arg¹⁶⁶-Baustein mit zwei verschiedenen Glycosylierungspositionen durch sequenzielle TCEP/AgCl-Kupplungen aufgebaut.^[79] So lieferte die TCEP-vermittelte Kupplung des Glycopeptids **H34** mit dem Peptid **H35** die Zwischenstufe **H36** mit einem C-terminalen Alkylthioester (Schema 30). Dieser reagiert in Gegenwart von TCEP nicht, kann aber mit AgCl aktiviert werden. So wurde **H36** in Gegenwart von AgCl problemlos mit dem Glycopeptid **H37** zur Domäne Gln⁷⁸-Arg¹⁶⁶ verknüpft. Gegenwärtig konzentrieren sich unsere Anstrengungen auf die Verknüpfung dieser drei großen Einheiten, um so die erste Totalsynthese des komplizierten, mehrfach glycosylierten Proteins EPO zu vollenden.



Schema 28. Synthese des Ala¹-Gly²⁸-Fragments von EPO.



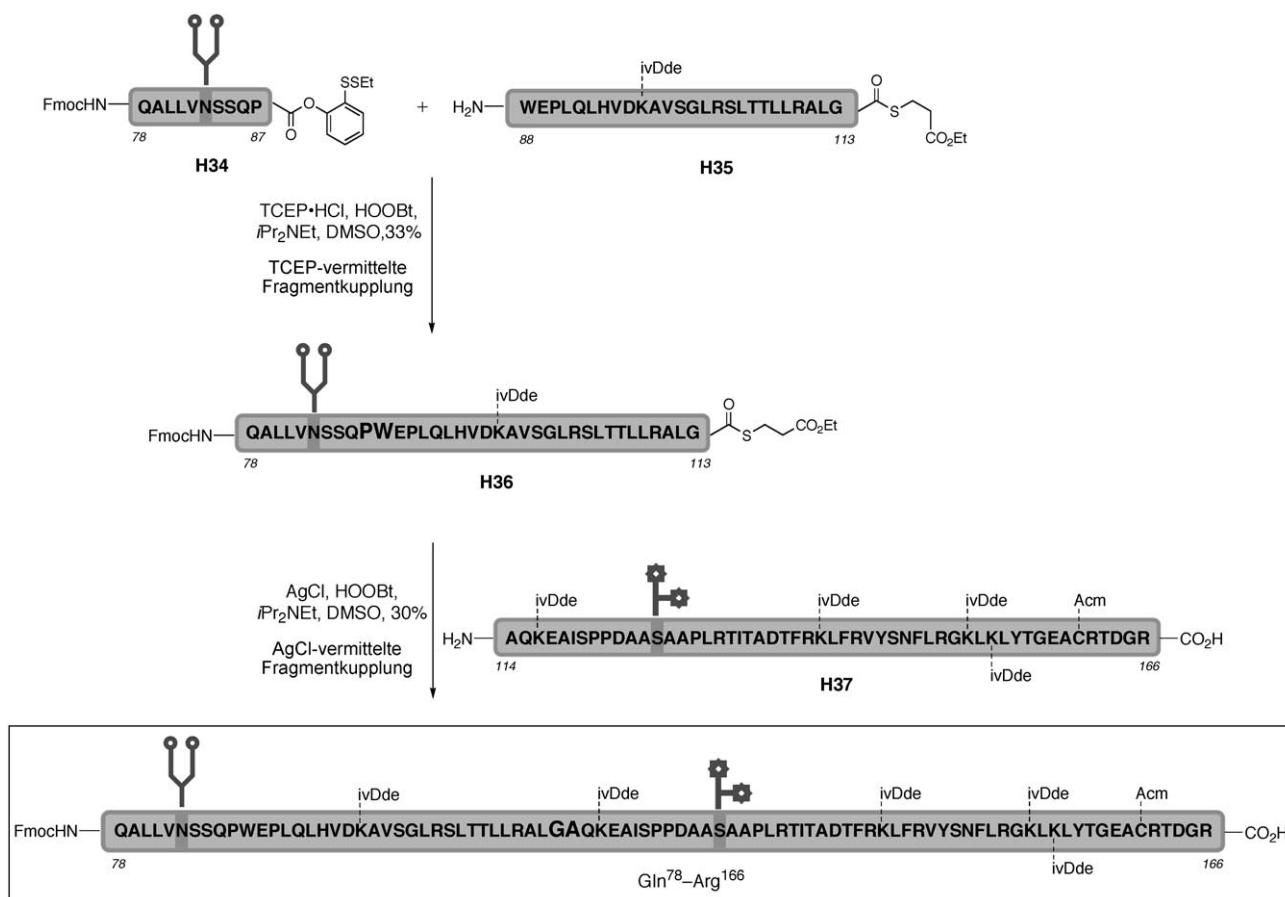
3.3.5. FSH

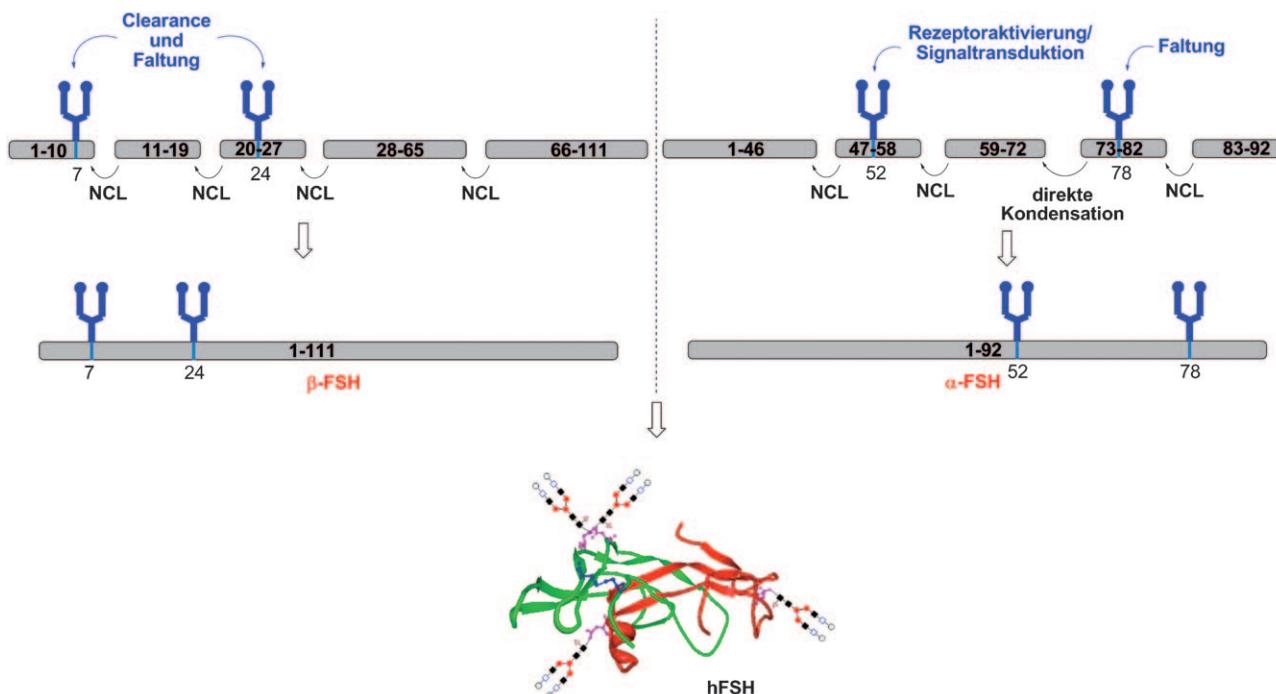
Das menschliche follikelstimulierende Hormon (hFSH, Schema 31) ist ein biologisch wichtiges Glycoprotein, das zur Behandlung von Ovulationsstörungen und bei der künstli-

chen Befruchtung, z. B. durch intrauterine Insemination (IUI), Verwendung findet. Es liegt als Heterodimer mit zwei Glycosylierungsstellen an jeder Domäne (α und β) vor. Im Zusammenhang mit unserem Programm zur Total-synthese von therapeutisch wichtigen Glycoproteinen interessierten wir uns für die Totalsynthese von hFSH.

Derzeit werden die Synthesen der beiden α - und β -FSH-Untereinheiten ne-

beneinander bearbeitet.^[80] Jede Domäne wird retrosynthetisch in vier Untereinheiten von annähernd gleicher Größe aufgespalten, die mit Standardmethoden verknüpft werden sollen. Bisher haben wir alle vier Peptidanteile der α -Domäne sowie drei der vier Peptidbausteine der β -Domäne syntheti-





Schema 31. Synthesestrategie für das humane follikelstimulierende Hormon (hFSH).

siert. Außerdem wurde das den Untereinheiten 1 und 2 der β -Domäne gemeinsame komplexe Glycan hergestellt. Derzeit versuchen wir, die Glycane mit den Peptidfragmenten zu verknüpfen.

4. Schlussbemerkungen

Es gibt traditionell viele Gründe, die für das Gebiet der organischen Synthese vorgebracht werden. Einer davon ist natürlich, dass die Synthese üblicherweise das Fundament der pharmazeutischen Industrie bei der Erstellung und Optimierung von Leitstrukturen war. Ein weiterer ist die Aufgabenlösung bei der Synthese komplizierter Zielverbindungen. Ohne diese, nach Grenzen suchenden Aufgaben wären Quantensprünge im Synthesefortschritt, wie sie im Zusammenhang mit diesen interessanten Herausforderungen gemacht werden, wahrscheinlich nicht realisierbar.

Im weiteren Sinn könnten die hier beschriebenen Arbeiten ein Hinweis darauf sein, dass sich diese unterschiedlichen Bestrebungen nicht widersprechen müssen. Auch die Arbeit an komplizierten Systemen kann Konsequenzen für das Auffinden und Optimieren von Wirkstoffen haben. Natürlich ist unser Labor keine pharmazeutische Firma und verfügt nicht über die Mittel, um von der Entdeckung über die DTS bis hin zur Bewertung nach dem neuesten Stand der Technik zu reichen. Hierfür – die Weiterentwicklungen für klinische Tests am Menschen eingeschlossen – wären die hier vorgestellten Konzepte die Basis für eine Zusammenarbeit, die den Übergang von der Entdeckung zur Anwendung ermöglicht. Wir hoffen, dass dies eintrifft.^[81]

Eingegangen am 9. Februar 2010
Online veröffentlicht am 26. Juli 2010

Übersetzt von Dr. Kathrin-M. Roy, Langenfeld

- [1] a) A. M. Rouhi, *Chem. Eng. News* **2003**, 78(October 13), 77; b) G. A. Cordell, *Phytochem. Rev.* **2002**, 1, 261; c) W. R. Strohl, *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 39.
- [2] Zur Funktion von Naturstoffen in der Wirkstoffentwicklung siehe: a) D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022; b) M. S. Butler, *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 2141; c) Y.-Z. Shu, *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1053; d) D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 215.
- [3] Übersicht: K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, R. K. Guy, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 38; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 15.
- [4] Isolierung: a) C. Vézina, A. Kudelski, S. N. Sehgal, *J. Antibiot.* **1975**, 28, 721; b) S. N. Sehgal, H. Baker, C. Vézina, *J. Antibiot.* **1975**, 28, 727. Strukturaufklärung: c) D. C. N. Swindells, P. S. White, J. A. Findlay, *Can. J. Chem.* **1978**, 56, 2491; Synthese: d) K. C. Nicolaou, T. K. Chakraborty, A. D. Piscopio, N. Minowa, P. Bertinato, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4419; e) D. Romo, S. D. Meyer, D. D. Johnson, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7906; f) C. M. Hayward, D. Yohannes, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9345; g) A. B. Smith III, S. M. Condon, J. A. McCauley, J. L. Leazer, Jr., J. W. Leahy, R. E. Maleczka, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5407.
- [5] a) M. Wainwright, *Miracle Cure: The Story of Penicillin and the Golden Age of Antibiotics*, Blackwell, Oxford, UK, **1990**; b) D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 215; c) W. Sneader, *Drug Prototypes and their Exploitation*, Wiley, Chichester, **1996**; d) J. Mann, *The Elusive Magic Bullet: The Search for the Perfect Drug*, Oxford University Press, Oxford, **1999**, S. 39.
- [6] Übersicht: P. A. Todd, K. L. Goa, *Drugs* **1990**, 40, 583.
- [7] Übersicht: A. P. Lea, D. McTavish, *Drugs* **1997**, 53, 828.

- [8] Zu einer neueren Übersicht über die Synthese (und DTS) von biologisch relevanten naturstoffinspirierten Verbindungsbibliotheken siehe: K. Kumar, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3272; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3224.
- [9] R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8329.
- [10] a) R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4293; b) R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1207.
- [11] G. Höfle, N. Bedorf, K. Gerth, H. Reichenbach, (GBF), DE-B 4138042, **1993** [*Chem. Abstr.* **1993**, *120*, 52841].
- [12] D. M. Bollag, P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, C. M. Woods, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2325.
- [13] D.-S. Su, D. Meng, P. Bertinato, A. Balog, E. J. Sorensen, S. J. Danishefsky, Y.-H. Zheng, T.-C. Chou, L. He, S. B. Horwitz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 775; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 757.
- [14] A. Balog, D. Meng, T. Kamenecka, P. Bertinato, D.-S. Su, E. J. Sorensen, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2976; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2801.
- [15] a) A. Rivkin, F. Yoshimura, A. E. Gabarda, Y. S. Cho, T.-C. Chou, H. Dong, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10913; b) A. Rivkin, T.-C. Chou, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2898; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2838; c) Y. S. Cho, K.-D. Wu, M. A. S. Moore, T.-C. Chou, S. J. Danishefsky, *Drugs Future* **2005**, *30*, 737; d) T.-C. Chou, X. Zhang, Z.-Y. Zhong, Y. Li, L. Feng, S. Eng, D. R. Myles, R. Johnson, N. Wu, Y. I. Yin, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 13157.
- [16] a) B. D. Hedley, E. Winquist, A. F. Chambers, *Expert Opin. Ther. Targets* **2004**, *8*, 527; b) L. Pérez, S. J. Danishefsky, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 159.
- [17] a) K. Nakae, Y. Yoshimoto, T. Sawa, Y. Homma, M. Hamada, T. Takeuchi, M. Imoto, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 1130; b) K. Nakae, Y. Yoshimoto, M. Ueda, T. Sawa, Y. Takahashi, H. Naganawa, T. Takeuchi, M. Imoto, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 1228; c) Y. Takemoto, K. Nakae, M. Kawatani, Y. Tahahashi, H. Naganawa, M. Imoto, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 1104; d) H. Nakamura, Y. Takahashi, H. Naganawa, K. Nakae, M. Imoto, M. Shiro, K. Matsumura, H. Watanabe, T. Kitahara, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 442.
- [18] C. Gaul, J. T. Njardarson, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6042.
- [19] a) J. T. Njardarson, C. Gaul, D. Shan, X.-Y. Huang, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1038; b) C. Gaul, J. T. Njardarson, D. Shan, D. C. Dorn, K.-D. Wu, W. P. Tong, X.-Y. Huang, M. A. S. Moore, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11326; c) D. Shan, L. Chen, J. T. Njardarson, C. Gaul, X. Ma, S. J. Danishefsky, X.-Y. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3772.
- [20] T. Oskarsson, P. Nagorny, I. Krauss, L. Perez, M. Mandal, G. Yang, O. Ouerfelli, D. Xiao, M. A. S. Moore, J. Massagué, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3224.
- [21] P. Delmotte, J. Delmotte-Plaquée, *Nature* **1953**, *171*, 344.
- [22] S. M. Roe, C. Prodromou, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, L. H. Pearl, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 260.
- [23] R. M. Garbaccio, S. J. Stachel, D. K. Baeschlin, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10903.
- [24] a) K. Yamamoto, R. M. Garbaccio, S. J. Stachel, D. B. Solit, G. Chiosis, N. Rosen, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1318; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1280; b) Z.-Q. Yang, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9602; c) Z.-Q. Yang, X. Geng, D. Solit, C. A. Pratilas, N. Rose, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7881.
- [25] T. Saito, H. Matsunaga, H. Yamamoto, F. Nagumo, H. Fujito, M. Mori, M. Katano, *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, *17*, 798.
- [26] I. Kitagawa, M. Yoshikawa, M. Yoshihara, T. Hayashi, T. Taniyama, *Yakugaku Zasshi* **1983**, *103*, 612.
- [27] a) F. Ng, H. Yun, X. Lei, S. J. Danishefsky, J. Fahay, K. Stephenson, C. Flexner, L. Lee, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 7178; b) M. Halim, D. J. Yee, D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14123.
- [28] H. Yun, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4519.
- [29] H. Yun, T.-C. Chou, H. Dong, Y. Tian, Y.-M. Li, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10375.
- [30] a) M. R. Bennett, W. G. Gibson, G. Lemon, *Auton. Neurosci.* **2002**, *95*, 1; b) D. Dawbarn, S. J. Allen, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2003**, *29*, 211.
- [31] R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 539.
- [32] R. Yokoyama, J.-M. Huang, C.-S. Yang, Y. Fukuyama, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 527.
- [33] a) Y. S. Cho, D. A. Carcache, Y. Tian, Y.-M. Li, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14358; b) D. A. Carcache, Y. S. Cho, Z. Hua, Y. Tian, Y.-M. Li, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1016.
- [34] T. Kita, Y. Takaya, Y. Oshima, T. Ohta, K. Aizawa, T. Hirano, T. Inakuma, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11877.
- [35] Y. Obara, H. Kobayashi, T. Ohta, Y. Ohizumi, N. Nakahata, *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1287.
- [36] S. P. Waters, Y. Tian, Y.-M. Li, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13514.
- [37] J. M. Huang, R. Yokoyama, C. S. Yang, Y. Fukuyama, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 428.
- [38] S. P. Cook, A. Polara, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16440.
- [39] A. Polara, S. P. Cook, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5906.
- [40] J.-M. Huang, R. Yokoyama, C.-S. Yang, Y. Fukuyama, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6111.
- [41] V. B. Birman, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2080.
- [42] Z. Y. Meng, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1535; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1511.
- [43] a) S. J. Danishefsky, J. F. Kerwin, S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 358; b) S. J. Danishefsky, N. Kato, D. Askin, J. F. Kerwin, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 360; c) S. J. Danishefsky, T. Kitahara, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7807.
- [44] Übersicht: S. J. Danishefsky, M. T. Bilodeau, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1482; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1380.
- [45] I. C. Le Poole, M. A. Gerber, W. M. Kast, *Curr. Opin. Oncol.* **2002**, *14*, 641.
- [46] a) F. Helling, A. Shang, M. Calves, S. L. Zhang, S. L. Ren, R. K. Yu, H. F. Oettgen, P. O. Livingston, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 197; b) F. Helling, S. Zhang, A. Shang, S. Adluri, M. Calves, R. Koganty, B. M. Longenecker, T. J. Yao, H. F. Oettgen, P. O. Livingston, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2783.
- [47] a) M. T. Bilodeau, T. K. Park, S. Hu, J. T. Randolph, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, S. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7840; b) T. K. Park, I. J. Kim, S. H. Hu, M. T. Bilodeau, J. T. Randolph, O. Kwon, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11488; c) J. R. Allen, J. G. Allen, X. F. Zhang, L. J. Williams, A. Zatorski, G. Ragupathi, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1366.
- [48] Neuere Arbeiten über das Programm zu Tumorvakzinen auf Kohlenhydratbasis: a) O. Ouerfelli, J. D. Warren, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Expert Rev. Vaccines* **2005**, *4*, 677; b) R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 2189; c) J. Zhu, J. D. Warren, S. J. Danishefsky, *Expert Rev. Vaccines* **2009**, *8*, 1399.
- [49] a) S. Zhang, C. Cordon-Cardo, H. S. Zhang, V. E. Reuter, S. Adluri, W. B. Hamilton, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 42; b) S. Zhang, H. S. Zhang, C. Cordon-Cardo, V. E. Reuter, A. K. Singhal, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 50.

- [50] S. J. Keding, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11937.
- [51] G. Ragupathi, F. Koide, P. O. Livingston, Y. S. Cho, A. Endo, Q. Wan, M. K. Spassova, S. J. Keding, J. Allen, O. Ouerfelli, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2715.
- [52] J. Zhu, Q. Wan, D. Lee, G. Yang, M. K. Spassova, O. Ouerfelli, G. Ragupathi, P. Damani, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9298.
- [53] a) P. Van den Steen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Opdenakker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151; b) I. Brockhausen in *Glycoproteins* (Hrsg.: J. Montreuil, J. F. G. Vliegenthart, H. Schachter), Elsevier Science, New York, **1995**, S. 201; c) S. Zhang, H. S. Zhang, C. Cordon-Cardo, G. Ragupathi, P. O. Livingston, *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 2669.
- [54] a) S. M. Barratt-Boyes, A. Vlad, O. J. Finn, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 1918; b) E. M. Hiltbold, P. Ciborowski, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5066; c) B. Kocer, J. McKolanis, A. Soran, *BMC Gastroenterol.* **2006**, *6*, 4; d) K. L. Bondurant, M. D. Crew, A. D. Santin, T. J. O'Brien, M. J. Cannon, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3446; e) M. J. Cannon, T. J. O'Brien, L. J. Underwood, M. D. Crew, K. L. Bondurant, A. D. Santin, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2002**, *2*, 97.
- [55] J. Zhu, Q. Wan, G. Ragupathi, C. M. George, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4151.
- [56] D. Lee, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2167.
- [57] a) A. Y. Rudensky, P. Preston-Hurlburt, S.-Ch. Hong, A. Barlow, C. A. Janeway, Jr., *Nature* **1991**, *353*, 622; b) C. A. Bona, S. Casares, T. D. Brumeanu, *Immunol. Today* **1998**, *19*, 126; c) C. Musselli, P. O. Livingston, G. Ragupathi, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2001**, *127*, R20.
- [58] P. Nagorny, W. H. Kim, Q. Wan, D. Lee, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5157.
- [59] Übersichten: a) R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683; b) F. Wold, *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 783; c) J. Roth, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 285; d) K. Ohtsubo, J. D. Marth, *Cell* **2006**, *126*, 855; e) R. J. Solá, J. A. Rodríguez-Martínez, K. Griebenow, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 2133; f) N. Mitra, S. Sinha, T. N. C. Ramya, A. Surolia, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 156.
- [60] Allgemeine Übersichten über EPO: a) A. J. Sytkowski, *Erythropoietin*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**; b) W. Jelkmann, *Intern. Med.* **2004**, *43*, 649.
- [61] a) S. C. Pang, *Women's Health* **2005**, *1*, 87; b) D. C. Herbert, *Am. J. Anat.* **1975**, *144*, 379; c) M. O. Dada, G. T. Campbell, C. A. Blake, *Endocrinology* **1983**, *113*, 970; d) P. Rathnam, B. B. Saxena, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 6735; e) B. B. Saxena, P. Rathnam, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 993.
- [62] a) R. G. Spiro, *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R; b) P. M. Rudd, R. A. Dwek, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *32*, 1; c) R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631.
- [63] Übersicht: S. R. Hamilton, T. U. Gerngross, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 387.
- [64] Neuere Übersichten: a) C. Kan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 9047; b) Y. Yuan, J. Chen, Q. Wan, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Biopolymers: Peptide Science* **2010**, *94*, 373.
- [65] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.
- [66] J. D. Warren, J. S. Miller, S. J. Keding, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6576.
- [67] Q. Wan, J. Chen, Y. Yuan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15814.
- [68] B. Wu, J. Chen, J. D. Warren, G. Chen, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4222; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4116.
- [69] G. Chen, J. D. Warren, J. Chen, B. Wu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7460.
- [70] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248.
- [71] J. Chen, Q. Wan, Y. Yuan, J. L. Zhu, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8649; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8521.
- [72] J. Chen, P. Wang, J. Zhu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2277.
- [73] a) X. Li, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5446; b) X. Li, Y. Yuan, W. F. Berkowitz, L. J. Todaro, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13222; c) X. Li, Y. Yuan, C. Kan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13225.
- [74] Y. Rao, X. Li, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12924.
- [75] X. Wu, J. Stockdill, P. Wang, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4098.
- [76] D. Faulds, K. L. Goa, P. Benfield, *Drugs* **1993**, *45*, 953.
- [77] C. Kan, J. D. Trzipek, B. Wu, Q. Wan, G. Chen, Z. Tan, Y. Yuan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5438.
- [78] Y. Yuan, J. Chen, Q. Wan, Z. Tan, G. Chen, C. Kan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5432.
- [79] Z. Tan, S. Shang, T. Halkina, Y. Yuan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5424.
- [80] P. Nagorny, B. Fasching, X. Li, G. Chen, B. Fasching, B. Aussedat, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5792.
- [81] Anmerkung im Fahnensymbol: KOS-1803 und das pentavalente Vakzin werden derzeit für mögliche klinische Tests der Phase I vorbereitet; Globo-H-KLH wird derzeit für mögliche klinische Tests der Phase II gegen Brustkrebs vorbereitet. Im Gange sind auch Untersuchungen zur Optimierung von Migrastatin, mit dem Ziel, einen Kandidaten für klinische Studien vorzustellen.