

Totalsynthese von Erythropoietin: ein Ergebnis der Entwicklung wegbereitender Synthesetechniken

Richard J. Payne*

Chemische Ligation · Glycopeptide · Glycoproteine · Glycosylierungen · Totalsynthese

Glycosylierungen sind die häufigsten posttranslationalen Modifikationen bei Proteinen, und geschätzte 50–70 % aller Proteine des Menschen tragen kovalent gebundene Glycane.^[1] Die Glycosylierung von Proteinen ist an verschiedenen Prozessen beteiligt, einschließlich Befruchtung, Immunüberwachung, Hormonaktivität, neuronale Entwicklung und Proteininfaltung.^[2] Trotz der unbestreitbaren Bedeutung der Glycosylierung war es bisher mühsam, die Auswirkungen dieser Modifikation auf die Struktur und Funktion von Proteinen aufzuklären. Einer der Hauptgründe hierfür ist, dass solche Glycoproteine in reiner Form schwer zugänglich sind. Dieses Problem entsteht insbesondere dadurch, dass, anders als die Proteinsynthese, der Glycosylierungsprozess nicht an einer Matrize stattfindet. Glycosylierungen werden vielmehr von Glycosyltransferasen gesteuert, die zu Mischungen von Glycoformen führen. Da sich diese Glycoformen nur in der Art der kovalent gebundenen Glycane unterscheiden, sind sie mit chromatographischen Methoden oftmals unmöglich zu trennen. Rekombinantes humanes Erythropoietin (rhEPO), ein Multimilliarden-Dollar-Wirkstoff zur Behandlung von Anämie, ist ein aus 166 Aminosäuren aufgebautes Protein mit vier Glycosylierungsstellen: drei hoch variable N-verknüpfte Stellen (an Asn-24, Asn-38 und Asn-83) und eine stärker konservierte O-verknüpfte Stelle (an Ser-126). Als Folge seiner Produktion in Sägerzellen wird rhEPO als komplexe Mischung von Glycoformen vertrieben, und es ist unbekannt, welcher der Glycosylierungszustände von EPO die höchste Aktivität hat.

Wildtyp-EPO, in dem alle vier Glycosylierungsstellen mit Glycanen besetzt sind, ist das ultimative Ziel aller Synthese-bemühungen und war daher Gegenstand intensiver Forschungen. Es gibt eine Reihe eleganter Synthesen von EPO-Analoga.^[3] Kürzlich beschrieb die Arbeitsgruppe von Kajihara die Synthese von Volllängen-EPO [allerdings mit zwei Aminosäuremutationen (Glu21Ala und Gln78Ala) zur Erleichterung der Synthese] mit einem komplexen sialylierten biantennären Glycan.^[4] Der Zugang zu einer reinen Glycoform von EPO mit allen vier Glycanen war bislang verschlossen.

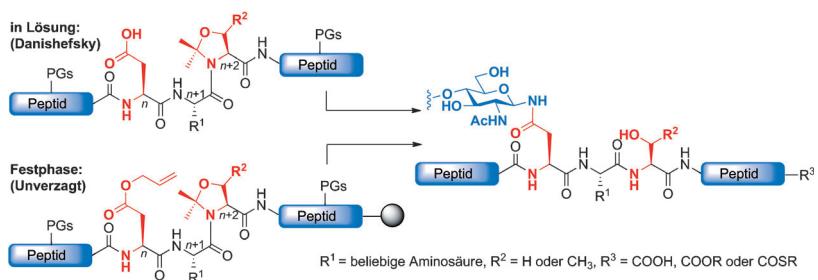
[*] Dr. R. J. Payne
School of Chemistry, The University of Sydney
NSW 2006 (Australia)
E-Mail: richard.payne@sydney.edu.au
Homepage: <http://sydney.edu.au/science/chemistry/~payne>

Im Prinzip sollte es einem großen Team von Synthesechemikern mittels derzeit verfügbarer Technologien gelingen können, einen Zugang auch zu einem derart komplexen Molekül wie EPO zu erreichen. Dies kann aber nicht das Ziel sein – vielmehr gilt es, wegbereitende Technologien zu entwickeln und einzusetzen, mit denen jede Art von Glycoprotein in reiner Form für biologische Studien hergestellt werden kann. Synthesemethoden wie Festphasenpeptidsynthese (SPPS) und native chemische Ligation erfüllen solche Kriterien und wurden für die chemische Synthese von hunderten von Proteinen eingesetzt. Das Fehlen robuster und operativ einfacher Methoden zur Anknüpfung von Glycanen an Peptide ist ein erhebliches Hemmnis für den raschen Aufbau von Glycoproteinen, und der Fortschritt in diesem Bereich hinkt der Entwicklung bei unglycosylierten Proteinen hinterher.

Kürzlich berichteten nun die Arbeitsgruppen von Danishefsky^[5] und Unverzagt^[6] unabhängig voneinander über eine neue Synthesestrategie für die einfache und effiziente Herstellung von N-verknüpften Glycopeptidfragmenten. Die Danishefsky-Gruppe benutzte diese Strategie anschließend in der ersten Totalsynthese von homogenem synthetischem EPO mit vier Glycanen.^[7] Dieses Highlight soll die neuen Methoden beleuchten und diesen Meilenstein in der Totalsynthese von Glycoproteinen würdigen.

Konventionell werden N-verknüpfte Glycopeptide durch zwei Methoden hergestellt: 1) linearer Einbau von vorab hergestellten Glycosylaminosäure-„Kassetten“ in das harzgebundene Peptid oder 2) konvergente Lösungs- oder Festphasen-Aspartylierung von Glycosylaminen durch spezifische Aspartinsäure(Asp)-Reste innerhalb einer Peptidsequenz.^[1] Die größten Nachteile der „Kassetten“-Strategie sind der hohe Aufwand an kostbaren glycosylierten Bausteinen in den iterativen Schritten und die aus sterischen Gründen verringerte Effizienz der Kupplungsreaktion bei größeren Glycanen. Der Hauptnachteil der Aspartylierungsmethode ist die erhebliche Bildung von Aspartimid-Nebenprodukten während der Aktivierung der Asp-Seitenkette, die, vor allem bei größeren Glycanen, oftmals schneller verläuft als die Bildung der gewünschten Amid-Verknüpfung. Die neue Strategie der Gruppen von Danishefsky und Unverzagt ist in ihrer Einfachheit elegant. Die Autoren demonstrieren, dass die Nutzung eines *gem*-Dimethyloxazolidinrings (auch bekannt als Pseudoprolin(Ψ Pro)-Rest) als konformativ einschränkende Gruppe von X-Serin(Ser)- und X-Threonin(Thr)-haltigen Dipeptideinheiten, wie sie innerhalb der in allen N-ver-

knüpften Glycoproteinen vorhandenen Asn-X-Ser/Thr-Konsensussequenz gefunden werden, die Bildung von Aspartimidinen durch die Reaktion einer Asp-Seitenkette mit einem Glycosylamin wirksam unterdrückt (Schema 1). Die Autoren



Schema 1. Konvergente Synthese von N-verknüpften Glycopeptiden durch ψ Pro-abgeleitete Peptide. PGs = Schutzgruppen.

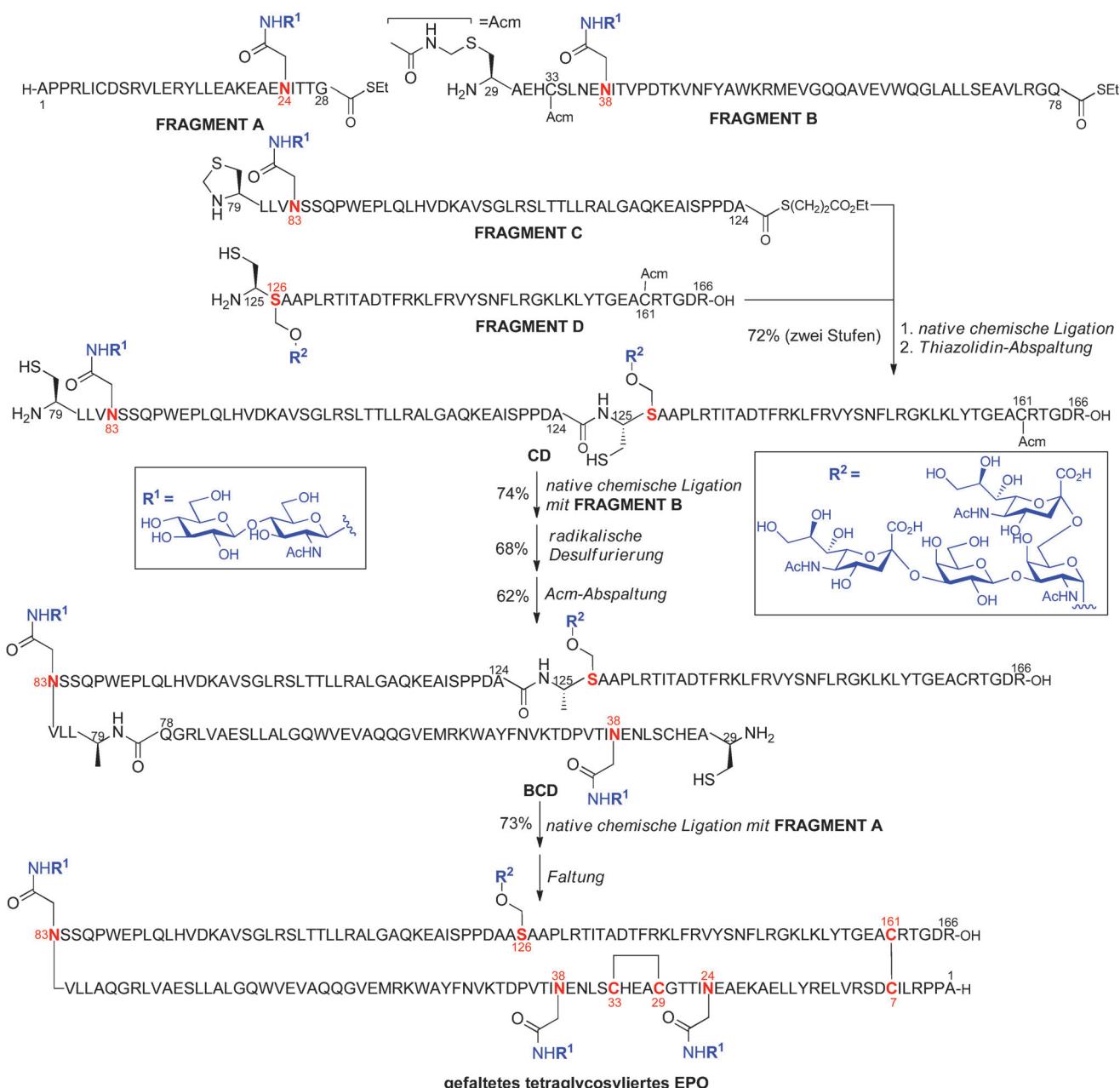
demonstrieren die Nützlichkeit dieser Methode anhand der Herstellung einer breiten Auswahl von Glycopeptiden und Glycopeptidthioestern (einschließlich mehrerer Fragmente von EPO) sowohl in Lösung als auch an fester Phase. Anzumerken ist, dass die Herstellung von Glycopeptidthioestern durch diese Strategie in Anbetracht der Verwendung dieser Bausteine als Acyclonoren in der Ligationschemie besonders nützlich ist. Die Gruppe von Danishefsky erzeugte Glycopeptide und Glycopeptidthioester in Lösung durch eine Kupplungsreaktion mit freien Asp-Seitenketten an ansonsten vollständig seitenkettengeschützten Peptiden mit ψ Pro-abgeleiteten Serin- oder Threoninresten in der $n+2$ -Stelle.^[5] Saure Entschüttung lieferte anschließend die gewünschten N-glycosylierten Zielstrukturen. Unter Verwendung einer Allylester-Schutzgruppe an der Asp-Seitenkette und eines ψ Pro-abgeleiteten Serin- oder Threoninrestes in der $n+2$ -Stelle erreichten Unverzagt und Mitarbeiter die selektive Demaskierung der Asp-Seitenkette, gefolgt von der Aspartylierung eines Glycosylamins am Harz.^[6] Beide Arbeitsgruppen führten Glycosylamine in der Größe von Monosacchariden bis Dodecasacchariden ein, und obwohl die Ausbeuten für die größeren Oligosaccharide auf 20–30% sanken, wurden in allen Fällen wenige bis keine Aspartimide gebildet. Vermutlich führt die Umwandlung der normalerweise vorhandenen *trans*-X-Ser/Thr-Bindung in die *cisoid* Geometrie zu einer ungünstigen lokalen Konformation, die die Neigung des Rückgrat-Amids für nucleophile Angriffe an der aktivierte Seitenkette des Asp verhindert. Neben der Unterdrückung der Aspartimidbildung ist einer der enormen Vorteile dieser Methode, dass Ser- und Thr-abgeleitete ψ Pro-Dipeptide kommerziell verfügbar sind (Verwendung als spurlose Aggregationshemmer) und die Peptidvorläufer daher durch automatisierte Standard-SPPS-Techniken einfach hergestellt werden können. Darüber hinaus können Glycosylamine durch gut etablierte Prozesse direkt aus den entsprechenden reduzierenden Zuckern hergestellt werden, von denen viele ebenfalls kommerziell erhältlich sind. Die Methode ist so einfach, dass sie in der Forschung rasch und verbreitet angenommen werden dürfte.

Danishefsky und Mitarbeiter bewiesen die Nützlichkeit der Methode mit der Synthese von drei N-verknüpften Gly-

copeptidfragmenten von EPO, die anschließend zum Wildtyp-EPO mit vier Glycanmodifikationen konjugiert wurden.^[7] Der verwendete Ansatz der chemischen Zerlegung erforderte lediglich Methoden der klassischen nativen chemischen Ligation.^[8]

Die Autoren fanden, dass die nativen Cys-Reste in EPO (an den Positionen 7, 29, 33 und 161) für den Zusammenbau der linearen Struktur nicht ideal platziert waren, weshalb sie nichtnatürliche Cys-Reste in die Sequenz einführten. Dabei bedienten sie sich der von Yan und Dawson beschriebenen Abfolge aus nativer chemischer Ligation und Desulfurierung, mit der Cys-Reste im Anschluss an das Ligationseignis zu Alanin(Ala)-Resten desulfuriert werden können.^[9] Die Gegenwart von 18 Ala-Resten in EPO bot genügend Zerlegungsstellen. Die

Autoren spalteten die lineare Sequenz zwischen Gly-28 und Cys-29, Gln-78 und Ala-79 sowie Ala-124 und Ala-125 und erhielten dadurch die vier Zielfragmente **A–D**, die dann in C-zu-N-terminaler Richtung durch drei sequentielle native chemische Ligationseignisse zusammengebaut wurden (Schema 2). Das native Ala-79 in Fragment **C** wurde durch einen Thiazolidinrest ersetzt, während Ala-125 in Fragment **D** durch einen Cys-Rest ersetzt wurde. Cys-33 und Cys-161 wurden mit Acetamidomethyl(Acm)-Gruppen geschützt, um mit der von Wan und Danishefsky entwickelten Methode der metallfreien Dethiylierung (MFD),^[10] eine selektive Desulfurierung der nichtnatürlichen Cys-Reste zu erreichen. Die Fragmente **A–C**, von denen jedes eine N-verknüpfte Glycosylierungsstelle besitzt, wurden durch konvergente Aspartylierung in Lösung aus ψ Pro-abgeleiteten Peptiden hergestellt. Die Autoren bauten das vereinfachte Chitobiose-Disaccharid anstelle des komplexen Glycans ein, das normalerweise in endogenem EPO oder rhEPO verliegt. Bei diesem schrittweisen, linearen Aufbau wurden zuerst die Fragmente **C** und **D** unter Standardbedingungen der nativen chemischen Ligation ligiert, gefolgt von der Demaskierung der Thiazolidineinheit zur Bildung des Glycopeptids **CD**. Nachfolgende Ligation von **CD** mit dem Glycopeptidthioester **B**, Desulfurierung der freien Cys-Reste (an den Positionen 79 und 125) und Abspaltung der Acm-Schutzgruppe lieferten **BCD**. Zum Abschluss ergab die Ligation von **BCD** mit dem Glycopeptidthioester **A** die vollständige entfaltete lineare Sequenz von EPO (**ABCD**) mit drei N-verknüpften Chitobiose-Einheiten und einer O-verknüpften Tetrasaccharid-Einheit. Eine elegante Erweiterung dieser Arbeit war die anschließende Herstellung von EPO durch eine kinetisch kontrollierte Ein-Topf-Ligation, dieses Mal in N-zu-C-terminaler Richtung. In diesem Fall wurden modifizierte Varianten der Glycopeptidthioesterfragmente **A** und **B** hergestellt und ligiert, wobei eine C-terminale Ethylthioester-Einheit an Gln-78 zurückblieb, die mit Fragment **CD** in hoher Ausbeute direkt zu Vollängen-EPO umgesetzt werden konnte. Desulfurierung und Abspaltung der Acm-Schutzgruppe ergaben dann entfaltetes EPO, und das Vollängen-Glycoprotein wurde erfolgreich gefaltet. Für dieses synthetische tetraglycosyierte EPO wurde gefunden, dass es Erythrocytenbildung *in vitro* hervorruft und höhere Aktivitäten als ein synthet-



Schema 2. Totalsynthese von EPO mit vier Glycanen durch native chemische Ligation.

sches EPO-Aglycon aufweist (welches durch linearen Aufbau erzeugt wurde). Noch ist nicht klar, wie sich die Aktivität dieser einzelnen EPO-Glycoform im Vergleich zu rhEPO mit mehreren komplexen N-verknüpften Glycanen gestaltet; dies wird aber ohne Frage Gegenstand zukünftiger Studien sein, wo nun die Herausforderung der Gewinnung einer einzelnen glycosylierten Form gemeistert wurde.

Zusammengefasst sollte die konvergente Aspartylie-
rungsstrategie, die von den Arbeitsgruppen von Danishefsky und Unverzagt entwickelt wurde, einen verbesserten Zugang zu N-verknüpften Glycopeptiden bieten, so wie es mit der chemischen Totalsynthese von EPO bereits demonstriert wurde. Die Methode sollte breite Anwendung als Werkzeug für die Synthese vielfältiger Glycoproteine für detaillierte

biologische Studien finden. Dies umfasst auch den Zugang zu dem sehnsüchtig erwarteten Wildtyp-EPO mit drei komplexen biantennären oder triantennären N-verknüpften Glycanen, deren Synthese ohne Zweifel der nächste Meilenstein in der Glycoproteinsynthese sein wird.

Eingegangen am 1. Oktober 2012
Online veröffentlicht am 23. November 2012

[1] a) D. P. Gamblin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131–163; b) R. J. Payne, C. H. Wong, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 21–43.

[2] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.

[3] a) G. G. Kochendoerfer et al., *Science* **2003**, *299*, 884–887; b) S. H. Liu, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1017–1023; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 993–999; c) K. Hirano, D. Macmillan, K. Tezuka, T. Tsuji, Y. Kajihara, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9721–9724; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9557–9560.

[4] M. Murakami, R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3627–3632; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3567–3572.

[5] P. Wang, B. Aussedat, Y. Vohra, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11739–11743; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11571–11575.

[6] V. Ullmann, M. Rädisch, I. Boos, J. Freund, C. Pöhner, S. Schwarzinger, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11734–11738; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11566–11570.

[7] P. Wang, S. Dong, J. A. Brailsford, K. Iyer, S. D. Townsend, Q. Zhang, R. C. Hendrickson, J. Shieh, M. A. S. Moore, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11744–11752; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11576–11584.

[8] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.

[9] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526–533.

[10] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9408–9412; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252.