

Der gewundene Pfad zum Erythropoietin entlang der Grenze von Chemie und Biologie**

Rebecca M. Wilson, Suwei Dong, Ping Wang und Samuel J. Danishefsky*

Aminosäuren · Erythropoietin · Glycoproteine ·
Synthesemethoden · Totalsynthese

Die Totalsynthese eines homogenen Erythropoietins (EPO), das die native Aminosäuresequenz aufweist und Chitobioseglycane an jeder der drei N-glycosylierten Wildtyp-Stellen trägt, wurde in unserem Laboratorium erzielt. Wir beschreiben in diesem Kurzaufsatz unsere ein Jahrzehnt dauernden Forschungsbemühungen um die Synthese dieser anspruchsvollen Zielverbindung. Entscheidend für den Erfolg war das Zusammenspiel zwischen Biologie und Chemie, den beiden Grundpfeilern der Naturwissenschaften.

1. Einführung

Unsere Arbeitsgruppe berichtete kürzlich über die erste Totalsynthese eines homogenen Glycoproteins des Wildtyp-Erythropoietins (EPO). In diesem Kurzaufsatz fassen wir einige Höhepunkte der ein Jahrzehnt dauernden Forschungsbemühungen zusammen, die in der Synthese dieser komplizierten Verbindung gipfelten. Indem wir dies tun, wollen wir das Projekt auch in einen breiteren Zusammenhang stellen und der fundamentalen Frage nachgehen, wie die chemische Synthese die scheinbar überwältigende Herausforderung zu meistern vermag, große Biomoleküle in zellfreiem Kontext und ohne enzymatische oder Nukleinsäure-vermittelte Reaktionsfolgen zu synthetisieren. Uns bot sich die EPO-Synthese als eine Gelegenheit, unsere Überzeugung auf den Prüfstand zu stellen, dass das Feld der chemischen Synthese soweit gereift ist, dass selbst ein Glycoprotein der Komplexität von EPO kein gänzlich unvernünftiges Synthesziel darstellt. Wir waren natürlich nicht davon ausgegangen, dass alle Teile des Puzzles bereits zur Verfügung stehen. Dennoch starteten wir mit der vielleicht naiven Hoffnung in das Projekt, uns die erforderlichen Teile aus mechanistischen Betrachtungen organischer Reaktionen ableiten zu können.

Überflüssig zu erwähnen, dass es im Feld der Proteinsynthese zahlreiche eindrucksvolle Fortschritte bei der Herstellung biologisch aktiver Glycoproteine und Glycopeptide gegeben hat.^[1–6] Wie wir sehen werden, sollte sich das hoch komplexe, mehrfach glycosylierte EPO-Glycoprotein dennoch als ein außergewöhnlich schwieriges Synthesziel erweisen.

Bevor wir uns dem EPO-Projekt widmen, ist es vielleicht angebracht, einige allgemeine Überlegungen über die Wechselbeziehungen zwischen Chemie und Biologie anzustellen. Tatsächlich tritt immer deutlicher zu Tage, dass viele der verlockendsten und anspruchsvollsten Probleme in der Wirkstoffentwicklung nur durch das Zusammenspiel verschiedener wissenschaftlicher Disziplinen zu lösen sind. Erste Bestrebungen, solche interdisziplinären Zusammenarbeiten anzustrengen, führten sehr rasch zu der Erkenntnis, dass die verschiedenartigen kulturellen Gepflogenheiten der Kern-disziplinen mit abweichenden sprachlichen Nuancen einhergehen. Solche Feinheiten müssen berücksichtigt werden, will man zu einer bestmöglichen Kommunikation zwischen den Disziplinen gelangen.

Betrachten wir z.B. die Schnittstelle zwischen Biologie und Chemie, die für uns von größtem Interesse ist, so sind viele der kulturellen Verschiedenheiten in den unterschiedlichen historischen Zielsetzungen der Kern-disziplinen verwurzelt. So hat sich die Biologie traditionell dadurch hervor getan, die Funktion biologischer Moleküle in außerordentlichem Detail zu beschreiben, oftmals auch in Abwesenheit klar definierter Strukturen oder gar homogener Substrate. Dagegen zielte die Chemie stets darauf ab, sich auf relativ begrenzte, aber wohldefinierte Probleme der Struktur zu fokussieren, während bedeutende Aspekte der Funktion (leider!) oft übersehen wurden.

Vor dem Hintergrund dieser historisch bedingten Fokussierung auf präzise Beschreibungen von Funktion (Biologie)

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

[**] Stephen Kent und Mitarbeitern für ihre Entdeckung der nativen chemischen Ligation gewidmet.

und Struktur (Chemie) ruft auch der Begriff des „Mechanismus“ unterschiedliche Assoziationen hervor. In Anbetracht des höheren Komplexitätsgrades der Biologie läuft dort die Beschreibung eines Mechanismus darauf hinaus, den Minimalbedarf der biologischen Komponenten anzugeben, die zur Herbeiführung einer funktionellen Wirkung nötig sind. Die erfolgreiche Demonstration des funktionellen Phänomens – selbst in zellfreier Umgebung – genügt, um den Mechanismus als gut gesichert anzusehen. In der Chemie hingegen ist eine Fragestellung typischerweise klar umrissen, und Mechanismen werden mit weit größerem Detail untersucht. In der Chemie betrachten wir, wie Substrate (und Reagentien) wechselwirken, um eine strukturelle Änderung auf kovalenter oder nichtkovalenter Ebene herbeizuführen. Im Prinzip will man in Erfahrung bringen, wie die strukturellen Gegebenheiten in der Umgebung der Stellen der Bindungsbildung oder -spaltung den chemischen Verlauf der Reaktion modulieren.

Ein Indiz dafür, dass man in der Chemie bezüglich eines Mechanismus auf der richtigen Fährte ist, ist die Fähigkeit, aus den gewonnenen Einsichten eine neue chemische Umwandlung zu erschaffen. Darum gibt es in der chemischen Synthese – und auch in der biologischen – eine fortwährende synergistische Wechselbeziehung mit dem mechanistischen Verständnis.

Die Bedeutungen des Begriffs der Synthese sind in der Biologie und Chemie hinsichtlich Auffassung und Geltungsbereich oft verschieden. Nach biologischem Verständnis umfasst eine Synthese ein relativ eingeschränktes Spektrum von Zielstrukturen, die durch enzymatische Wirkung unter globaler zellulärer Steuerung aufgebaut werden. Nicht selten bestehen die Zielstrukturen aus sich wiederholende Motiven (Polypeptide, Oligosaccharide oder Oligonukleotide). Insbesondere im Fall der Polypeptide und Oligonukleotide werden

diese Wiederholungseinheiten unter der Wirkung einer Matrix mit eindrucksvoller Qualitätskontrolle sowie (aus Sicht des Chemikers) beneidenswertem Katalysator-Turnover und exzellenter Ausbeute zusammengefügt.

Dagegen kommt in der Sprache der Chemie der Synthese eine breitere Begriffsbedeutung zu, insofern jede existenzfähige Struktur, zumindest im Prinzip, im Labor aufgebaut werden kann. Neu entwickelte Methoden ermöglichen den Entwurf gänzlich neuer Strategien, die quasi wie von selbst Zugänge zu neuen Zielstrukturen öffnen. Das Konzept, wonach die Leistungsfähigkeit der Synthese beim Aufbau neuartiger, auch hoch komplexer Zielstrukturen nur durch das Vorstellungsvermögen der Chemiker begrenzt wird, ist nach unserer Sicht eine spezifische Botschaft, die die Chemie der „Gedankenwelt“ vermittelt.

In diesem Kurzaufsatz geben wir einen Überblick über unsere Unternehmungen zur Synthese von EPO. Als gelernte Chemiker war unser Blick unweigerlich auf die strukturelle Ebene gerichtet, einschließlich der exakten Primärstruktur des natürlichen Glycoproteins. Zwar bildete die Synthese von Modellverbindungen einen beträchtlichen Bestandteil unserer Unternehmungen, am Ende gab es jedoch kein Vorbeikommen an der hoch konservierten Polypeptidstruktur des realen EPO. Zudem mussten all die hoch konservierten Glycosidierungsstellen über natürliche Verknüpfungsweisen mit Glycandomänen ausgestattet werden.

Was die glycosidischen Domänen selbst betrifft, wird das Problem sogar noch komplizierter – Grund ist die starke Inhomogenität der EPO-Struktur. Es musste ermittelt werden, wie wir mit einer Zielstruktur umgehen sollten, die zwar bezüglich ihrer primären Proteinstruktur und biologischen Funktion definierbar war, im chemischen Sinne jedoch einen konzeptionellen „Verschnitt“ hypothetischer individueller Strukturen darstellte, von denen keine zuvor in reiner Form



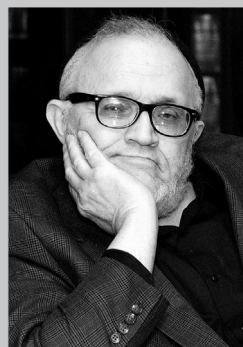
Rebecca M. Wilson studierte Biochemie an der Tufts University und absolvierte ihr Masterstudium an der University of California, Berkeley, sowie am Caltech bei Prof. David MacMillan. Im Anschluss forschte sie bei Amgen Pharmaceuticals an der Entwicklung niedermolekularer Verbindungen. 2004 schloss sie sich der Gruppe von Prof. Samuel Danishefsky am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center an, wo sie verschiedene konsultative und redaktionelle Aufgaben wahrnimmt.



Ping Wang promovierte 2005 am Shanghai Institute of Organic Chemistry bei Prof. Biao Yu. Nach einem Postdoktorat bei Prof. Peter H. Seeberger am Sanford-Burnham Medical Research Institute (2005–2008) schloss er sich der Gruppe von Samuel J. Danishefsky am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center an. Seine Forschungen konzentrieren sich auf die Synthese von Glycoproteinen.



Suwei Dong wurde 1981 in der Provinz Guizhou, China, geboren. Er studierte an der Peking University (B.S. 2005) und wechselte anschließend zur Boston University, wo er in der Gruppe von Prof. John A. Porco an der Totalsynthese von Naturstoffen forschte. Nach seiner Promotion 2010 ging er als Postdoc in die Gruppe von Prof. Samuel J. Danishefsky am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, wo er sich mit der chemischen Synthese von therapeutischen Polypeptiden und Glycoproteinen, einschließlich Erythropoietin befasst.



Samuel J. Danishefsky erwarb seinen B.S. an der Yeshiva University und promovierte bei Prof. Peter Yates. Er war Postdoc bei Prof. Gilbert Stork an der Columbia University (NIH Postdoctoral Associate) und begann 1963 als Assistant Professor an der University of Pittsburgh. 1980 wechselte er an die Yale University. 1993 ging er nach New York, wo er gegenwärtig Centennial Professor an der Columbia University sowie Eugene Kettering Chair und Leiter des Laboratoriums für bioorganische Chemie am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center ist.

charakterisiert wurde. In Anbetracht des uncharakteristisch „laxen“ Managements der Natur (z. B. Bildung in Eizellen des chinesischen Hamsters; CHO-Zellen) und der ebenso laxen Kontrolle des EPO-Zellexports, musste es der Chemie überlassen bleiben, eine strukturell definierte Einheit zu erzeugen und sicherzustellen, dass derartige EPO seinen funktionellen Zweck (die Erythropoiese) erfüllt. Dies war der Auftrag, mit dem wir an das Projekt der EPO-Synthese herangingen.

1.1. EPO: ein essenzielles Glycoproteinhormon

Der Schwerpunkt unserer Diskussion wird auf den technischen Herausforderungen liegen, die die Synthese eines Glycoproteins von der Komplexität von EPO mit sich bringt. Zuvor wollen wir aber einen kurzen Blick auf die biologische Funktion von EPO werfen. EPO ist ein aus 166 Aminosäuren aufgebautes Glycoprotein mit vier Glycosylierungsstellen (Abbildung 1). Es vermittelt eine Reihe zentraler, mecha-

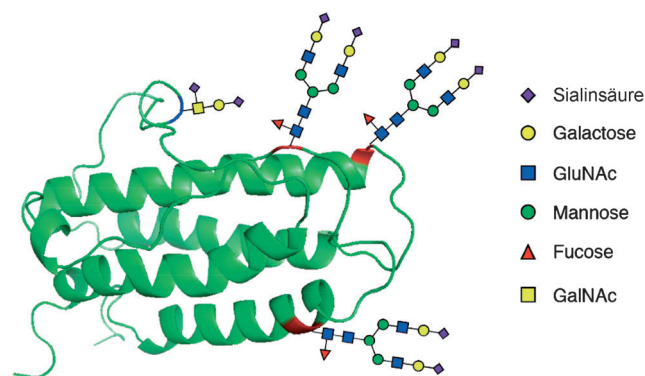


Abbildung 1. Bandstruktur von EPO mit einer Konsensussequenz von N- und O-verknüpften Kohlenhydratdomänen.

nistisch verschiedener biologischer Vorgänge, von der Erythropoiese (der Produktion roter Blutzellen) bis hin zur Zellprotektion.^[7] Die Rolle von EPO in der Erythropoiese ist gut verstanden. Beim Einsetzen von Hypoxie (Sauerstoffmangel) wird die Produktion von EPO in den Nieren stimuliert. Nach Freisetzung in den Blutkreislauf bindet EPO in niedriger Konzentration an den homodimeren EPO-Rezeptor (EPOR) und löst damit eine Kaskade von Ereignissen aus, die zur Hemmung der Apoptose roter Blutzellvorstufen und demzufolge verstärkter Erythropoiese führt. Damit eine wirksame Erythropoiese stattfinden kann, muss zumindest ein niedriger EPO-Spiegel über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Rekombinantes humanes EPO (rh-EPO) und Analoga mit erhöhter Plasmastabilität sind weit verbreitete Wirkstoffe zur Behandlung von EPO-defizienter Anämie.

Endogene und rekombinante Formen von EPO werden als komplexe und untrennbare Mischungen von Glycoformen hergestellt. Zwar ist bekannt, dass einzelne EPO-Glycoformen unterschiedliche biologische Aktivitäten und Biostabilitäten aufweisen,^[8] dennoch war es ohne Zugang zu homogenem Material bislang sehr schwierig, die relativen Aktivi-

täten einzelner Glycoformen präzise zu analysieren.^[9] Trotz der Tatsache, dass derzeit verfügbare Techniken keine homogenen Proben des Glycoproteins liefern können, sind nicht nur wir der Meinung, dass das aufkeimende Gebiet der präparativen Proteinchemie eine leistungsfähige Lösung für das lange verfolgte Ziel der Synthese reiner EPO-Glycoformen bereithalten könnte.

Tatsächlich hat sich das EPO-Glycoprotein basierend auf seiner historischen Bedeutung in der Biomedizin und seiner komplexen Struktur zu einem Prüfstein für die chemische Proteinsynthese herausgebildet. Im Verlauf der letzten 10 Jahre befassten sich mehrere herausragende Forschungsgruppen mit der Totalsynthese von homogenem EPO. Diese Studien führten zum einen zur Entwicklung bahnbrechender Synthesemethoden, zum anderen zeigten sie deutlich die Beschränkungen der modernen Proteinsyntheseverfahren auf.

1.2. EPO: ein Prüfstein für die Synthese biologischer Verbindungen

Bevor wir über unser eigenes langjähriges Forschungsprogramm zur EPO-Synthese berichten, soll nochmals betont werden, dass viele Forschungsgruppen eindrucksvolle Beiträge auf diesem Gebiet geleistet haben. Mehreren Gruppen gelang die Herstellung von synthetischen oder semisynthetischen EPO-Analoga, die Modifikationen innerhalb der nativen Peptidsequenz oder den Glycosylierungsstellen tragen. Einige dieser Produkte zeigen eindrucksvolle biologische Aktivitäten. Wir geben einen kurzen Überblick über einige bahnbrechende Fortschritte anderer Arbeitsgruppen auf dem Gebiet, die im Verlauf der letzten 12 Jahre erzielt wurden.

1.2.1. EPO als Syntheseziel: erste Studien

Im Jahr 2001 setzten Flitsch und Mitarbeiter semisynthetische Methoden ein, um Zugang zu homogenen EPO-Glycoformen zu erhalten, die Glycane an nichtnativen Cysteinthiolgruppen trugen.^[10] In dieser Studie wurden rekombinant hergestellte EPO-Mutationen (Asn→Cys) einer chemischen Glycosylierung mit Glycosyl-β-N-iodacetamid unterzogen. Dieser erste Erfolg – wenn auch mit rekombinantem Protein erzielt – legte den Grundstein für spätere Arbeiten zur EPO-Synthese. Nur wenig später synthetisierten Kent und Mitarbeiter ein stabiles und wirksames EPO-Aglycon mit modifizierter Aminosäurestruktur.^[11] Die Anbindung zweier Polymerdomänen am Protein diente einer deutlich erhöhten Zirkulationszeit in vivo. Die Arbeit von Kent et al. war ein Meilenstein und unterstrich die Leistungsfähigkeit der chemischen Synthese und des rationalen Designs für die Entwicklung verbesserter therapeutischer Leitstrukturen. In einer erst kürzlich erschienenen Studie berichteten Kent und Mitarbeiter über die Synthese des [Lys^{24,38,83}]EPO-Aglycons, in dem jeder der drei nativen, für die N-Glycosylierung vorhandenen Asn-Reste durch Mutation gegen ein Lys ersetzt wurde.^[12] Es zeigte sich, dass das synthetische Protein In-vitro-Aktivität aufweist. Die Gruppen um Kajihara und Macmillan verbuchten ebenfalls eindrucksvolle Fortschritte in der

EPO-Forschung. Richardson und Macmillan beschrieben die Herstellung eines semisynthetischen EPO mit mehreren Aminosäuremutationen sowie zwei Glycanen an sowohl natürlichen als auch nichtnatürlichen Glycosylierungsstellen.^[13] Dieser Ansatz ist besonders nützlich für die Ermittlung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen. In einem gemeinsamen Projekt kombinierten die Gruppen von Kajihara und Macmillan Verfahren der chemischen Synthese und der bakteriellen Expression, um ein EPO-Analogon mit mehreren Aminosäuremutationen zu erzeugen.^[14] Bemerkenswert ist, dass dieses EPO-Konstrukt zwei 11-mere Sialyloligosaccharide trägt, die ähnliche Strukturen aufweisen wie die natürlichen N-Glycane des EPO. Schließlich gelang Kajihara und Mitarbeitern kürzlich die elegante Synthese eines vollsynthetischen EPO-Analogons mit einem 11-meren Glycan an einer der nativen Glycosylierungsstellen (Asn83).^[15] Eine Zusammenfassung dieser Meilensteine auf dem Weg zu synthetischem EPO ist in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Meilensteine auf dem Weg zu synthetischem EPO.

Flitsch, 2001.

- semisynthetisches EPO-Analogon.
- ein Glycan an einem mutierten Cys.

Kent, 2003.

- vollsynthetisches EPO-Analogon.
- nichtnative Aminosäuresequenz.
- keine Kohlenhydratgruppen.
- Polymerdomänen → wirksame Aktivität in vivo.

Macmillan, 2008.

- semisynthetisches EPO-Analogon.
- keine Kohlenhydratgruppen.

Kajihara und Macmillan, 2009.

- semisynthetisches EPO-Analogon.
- nichtnative Aminosäuresequenz.
- zwei Kohlenhydratgruppen (11-meres Glycan).

Kent, 2012.

- vollsynthetisches EPO-Analogon.
- nichtnative Aminosäuresequenz.
- keine Kohlenhydratgruppen.
- Aktivität in vitro.

Kajihara, 2012.

- vollsynthetisches EPO-Analogon.
- nichtnative Aminosäuresequenz.
- eine Kohlenhydratgruppe (11-meres Glycan).

Danishefsky, 2012.

- ✓ vollsynthetisches EPO.
- ✓ native Aminosäuresequenz.
- ✓ Kohlenhydrate an allen nativen Stellen (Chitobiose).
- ✓ Aktivität in vitro.

Die vorangehende Diskussion beleuchtet, zu welchem Ausmaß EPO als Prüfstein für die chemische Synthese gedient hat. Mittels der Anwendung von Verfahren der rekombinanten Synthese, der ortsspezifischen Aminosäuremutation und der chemischen Synthese wurden eindrucksvolle Fortschritte erzielt, die zu verbesserten Kenntnissen von EPO sowie des breiteren Gebiets der Glycoproteinsynthese geführt haben. Dennoch kann es keinen Zweifel geben, dass vor unserem 2012 erschienen Bericht^[16] keine Totalsynthese von EPO erreicht wurde. Nach unseren oben definierten Kriterien muss eine Totalsynthese von EPO das Glycoprotein

mit der nativen Aminosäuresequenz und mit Kohlenhydratdomänen an allen nativen Glycosylierungsstellen erzeugen. 2012 erlangte unsere Arbeitsgruppe das erste homogene, vollsynthetische Wildtyp-EPO mit Glycosylierungen an allen vier nativen Stellen. Unser homogenes EPO-Glycoprotein war darüber hinaus gefaltet und zeigte erythropoietische Aktivität in vitro.

1.2.2. Einführung in das EPO-Programm der Arbeitsgruppe Danishefsky

Die erste Person, die uns über die wundersamen Eigenschaften von EPO erzählte, war Richard Lerner vom Scripps Research Institute. Dieses schicksalhafte Gespräch sollte unsere Arbeitsgruppe in eine aufregende neue Richtung lenken, unsere Forschungsschwerpunkte damit für die nächsten zehn Jahre signifikant beeinflussen und uns als Inspiration für die Entwicklung eines Spektrums einflussreicher methodischer Neuerungen auf dem Gebiet der Protein- und Glycoproteinsynthese dienen.^[17] Darüber hinaus führte uns die Beschäftigung mit der Glycoproteinsynthese zur Synthese therapeutisch nützlicher Glycoproteine und Proteine, darunter das Parathormon (PTH),^[18] das Parathormon-verwandte Protein (PTHrP)^[19] und das follikelstimulierende Hormon (FSH).^[20]

Zu Beginn unseres EPO-Programms wurde uns die Lückenhaftigkeit der zur Synthese mehrfach glycosylierter Proteine verfügbaren Methoden bisweilen schmerzhaft bewusst. Bevor wir einen ernsthaften Versuch zur Synthese von homogenem EPO überhaupt in Betracht ziehen konnten, mussten wir darum zuerst eine Reihe grundlegender präparativer Methoden entwerfen. Dabei stellte sich rasch heraus, dass die Techniken, die wir zunächst eigens im Rahmen der EPO-Synthese erfanden, für das gesamte Feld der Glycoprotein- und Proteinsynthese von Nutzen waren. Die Aussicht, Fortschritte in der Proteinsynthese erzielen zu können, war für uns besonders reizvoll, weil es ohnehin eine fest verankerte Zielsetzung unserer Arbeitsgruppe war, innovative und breit einsetzbare neue Syntheseverfahren für herausfordernde Zielmoleküle zu entwerfen. In der Tat wurden die unten beschriebenen Methoden im Kontext der EPO-Synthese entwickelt und von uns und anderen in der Synthese einer Reihe therapeutisch relevanter biologischer Moleküle breit angewendet.

Wir erkannten insbesondere, dass die Synthese des mehrfach glycosylierten EPO die Entwicklung von Methoden in drei Schlüsselbereichen erfordern würde. Als erstes mussten Verfahren für die konvergente Synthese von komplexen Kohlenhydratdomänen entwickelt werden.^[21] Als zweites benötigten wir ein Verfahren zur Konjugation von Kohlenhydrat- mit Peptidomänen, um Glycopeptidfragmente zu erzeugen. Als drittes mussten die einzelnen Glycopeptidfragmente zur Primärstruktur des Glycoproteins verknüpft werden. Hier interessierten uns vor allem Methoden für die reiterative Kupplung von Glycopeptidfragmenten und für die Kupplung von Glycopeptiden an verschiedene Aminosäurestellen.

Schlussendlich sollten diese Methoden für die Synthese von EPO, einem Glycoprotein von beispielloser Größe und

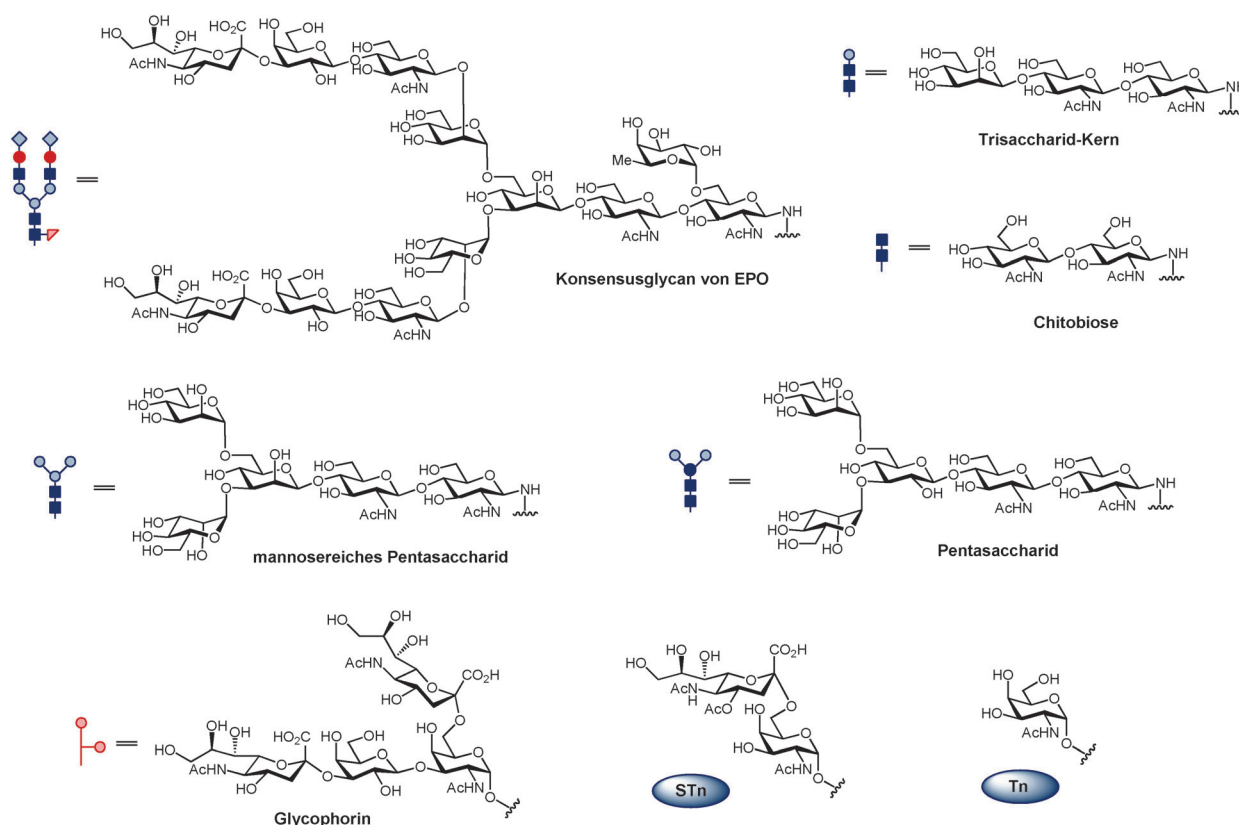
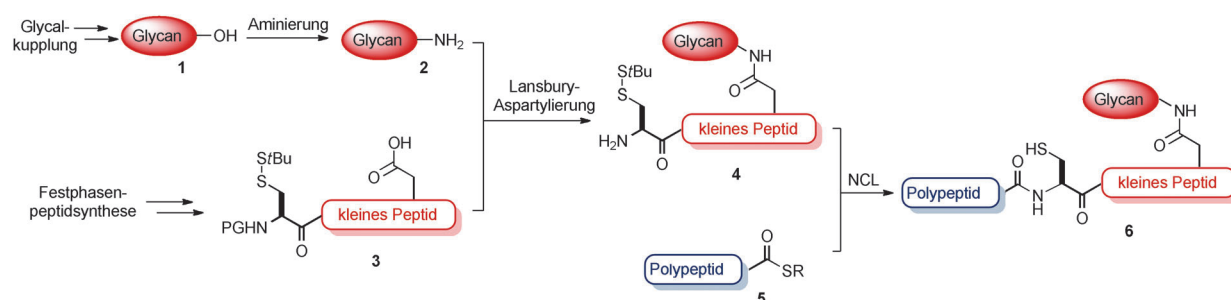


Abbildung 2. Strukturen von Oligosacchariden, die in diesem Kurzaufsatz vorkommen.



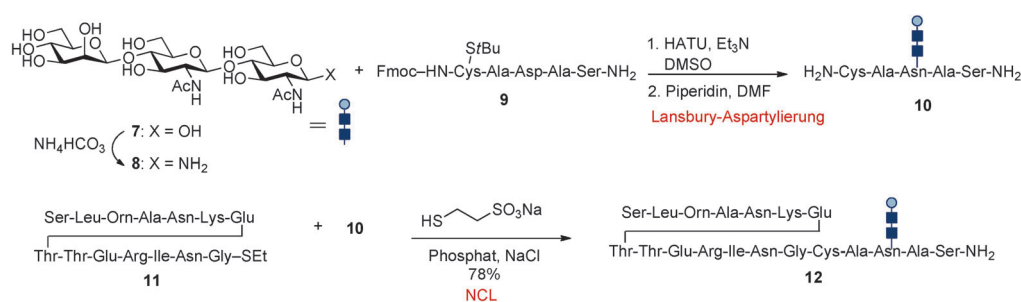
Schema 1. Strategie für die Glycopeptid-Peptid-Ligation. PG = Schutzgruppe.

Komplexität, verwendet werden. Diese zentrale Herausforderung würde einen beträchtlichen Prüfstein für unsere neu entwickelten Methoden darstellen. Wir geben im Folgenden einen ungefähr chronologischen Bericht unserer Forschungsaktivitäten, die schließlich in der ersten Totalsynthese von Wildtyp-EPO gipfelten. Beschreibungen zentraler methodischer Fortschritte und ihrer Anwendungen auf das EPO-Problem wechseln sich dabei ab. Die Strukturen der verschiedenen Oligosaccharide, die zum Einsatz kamen, sind in Abbildung 2 dargestellt.

2. Entwicklung von Methoden für die Synthese von Glycoproteinen

2.1. Eine Methode zur Synthese komplexer Glycopeptide aus Kohlenhydrat- und Peptidvorstufen

Am Beginn unseres Programms war eine Reihe von Methoden für den Zusammenbau kleiner Glycopeptide verfügbar. Allerdings würde unser Ziel, eine vollsynthetische Route zu komplexen Glycoproteinen zu etablieren, die Kupplung großer Glycodomänen an ausgedehnte Polypeptidgerüste erfordern. Unsere erste Aufgabe bestand nun darin, ein effizientes Protokoll entwickeln, mit dem wir kleine Glycopeptide wie z. B. **4** (Schema 1) aus geeigneten Oligosaccharid- (**2**) und Peptidomänen (**3**) aufbauen könnten.^[22] Das unge-



Scheme 2. Demonstration eines neuartigen Protokolls für die Glycopeptid-Peptid-Ligation. DMSO = Dimethylsulfoxid, HATU = *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat.

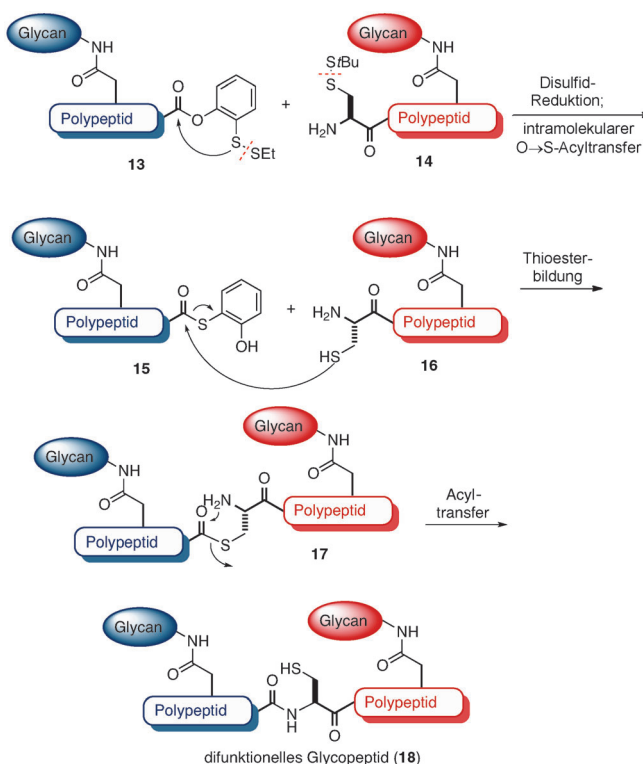
geschützte Oligosaccharid **1** – das wir mithilfe einer eigens entwickelten Glycalkupplungsstrategie erhielten – geht unter Kochetkov-Bedingungen^[23] eine anomere β -Aminierung ein und bildet das Glycosylamin **2**. Mithilfe des Aspartylierungsprotokolls nach Anisfeld und Lansbury^[24] wird **2** an den Aspartatrest von **3** gekuppelt und liefert ein kurzes Glycopeptidfragment. Diese Zwischenstufe wird dann durch native chemische Ligation (NCL)^[25] mit einer längeren Peptidomäne gekuppelt, um das gewünschte Glycopeptidaddukt **6** zu erhalten. Offensichtlich ist, dass eine optimal konvergente Route zu Glycopeptiden wie **6** die direkte Kupplung der Glycandomäne an das vollständige Polypeptidfragment umfassen würde. Versuche, Aspartylierungen an derartig großen Fragmenten durchzuführen, waren jedoch mit erheblichen Komplikationen verbunden, die die Anwendungen einer solchen Strategie ausschlossen. Wie wir beschreiben werden (Abschnitt 4.2), gelang es uns erst 2012, die mit der direkten Aspartylierung der großen Glycandomänen verbundenen Komplexitäten zu meistern. Vor dieser Entdeckung wurde die in Schema 1 dargestellte Methode routinemäßig zur Synthese von Glycopolypeptidfragmenten eingesetzt.

Die Reaktionsfolge aus Aspartylierung und nativer chemischer Ligation (NCL) ist in Schema 2 dargestellt.^[22] Das vollständig entschützte Trisaccharid **8** wurde unter Lansbury-Bedingungen mit dem Pentapeptid **9** gekuppelt. Das entstehende Glycopeptid **10** ging nach Entschützung eine bereitwillige NCL mit dem Polypeptidthioester **11** ein und lieferte das vollständig entschützte Glycopeptidaddukt **12**. Wichtig ist, dass ein einzelnes stereoisomeres Produkt isoliert wurde, das dem β -verknüpften Glycosylamid entsprach.

2.2. Eine Methode zur Synthese mehrfach glycosylierter Peptidomänen

Nachdem wir in der Lage waren, komplexe Glycopeptidfragmente mit einzelnen Glycandomänen zu synthetisieren, galt unser nächstes Ziel dem Aufbau mehrfach glycosylierter Peptide durch die Ligation von zwei synthetischen Glycopeptidfragmenten. Überlegungen bezüglich einer rein chemisch vermittelten Ligation von Peptiden führen naturgemäß zu dem klassischen Verfahren der nativen chemischen Ligation, das Kent und Mitarbeiter entwickelt haben.^[25] Allerdings befanden wir eine direkte Anwendung der Kent'schen NCL-Methode in dem oben beschriebenen Peptid-

Glycopeptid-Kupplungsprotokoll (Schema 1) als ungeeignet, da die Synthese eines vorab gebildeten Glycopeptidthioesters eine inhärente Schwierigkeit darstellen würde. 2004 beschrieb unsere Arbeitsgruppe das erste Protokoll für eine Glycopeptid-Glycopeptid-Ligation, das unsere neuartige *o*-Mercaptoarylesterumlagerung (OMER) beinhaltet. Das allgemeine Konzept ist in Schema 3 gezeigt. Ein inerter *ortho*-



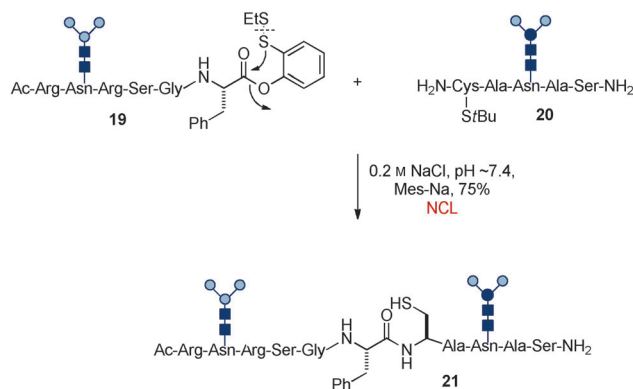
Scheme 3. Strategie für die Glycopeptid-Glycopeptid-Ligation.

Thiophenolester wird zunächst an das C-terminale Glycopeptid angefügt (**13**).^[26] Bei Reduktion des Disulfids geht die Phenolgruppe eine $O \rightarrow S$ -Wanderung ein und bildet in situ einen Thioester (**15**), der für einen intermolekularen Thioesteraustausch mit dem Cysteinrest des Glycopeptid-Kuppelpartners (**16**) aktiviert ist. Nach spontanem intramolekularem $S \rightarrow N$ -Acyltransfer (**17** → **18**) erhält man das zweidomänige Glycopeptidaddukt. Dieser Ansatz wurde von uns

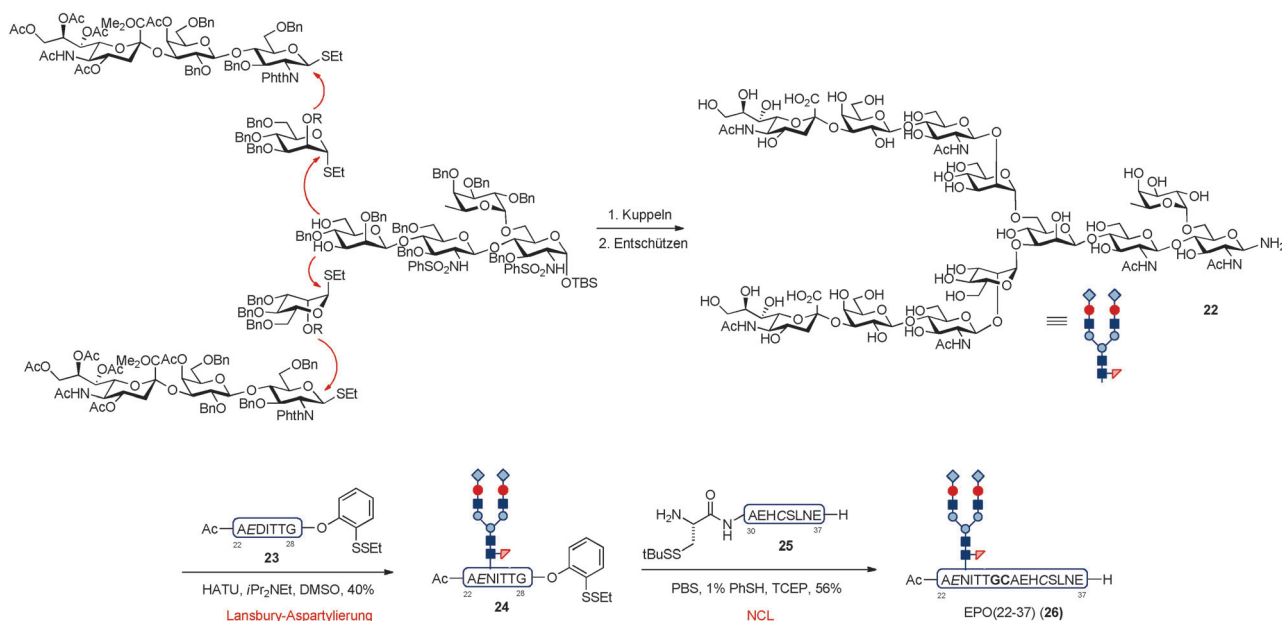
und anderen als eine effiziente Methode für die Ligation von Systemen genutzt, in denen das C-terminale Kupplungsfragment eine empfindliche Kohlenhydratdomäne trägt. Darüber hinaus wurde das OMER-Verfahren auch auf die Synthese von cyclischen Peptid- und Glycopeptidsystemen angewendet.^[27]

Am Beginn hatten wir die Existenz eines ungünstigen, aber dynamischen Gleichgewichts postuliert, in dem nur geringe Mengen einer hoch reaktiven Thioesterspezies (**15**) vorliegen. In einer mechanistischen Studie^[28] wurde später jedoch beobachtet, dass der Thioester bei den niedrigen pH-Werten dieser Ligationen die hauptsächliche Spezies ist. Wie wir sehen werden (Abschnitt 2.3), wurde dieser mechanistische Befund für die Entwicklung cysteinfreier NCL-Varianten ausgenutzt.

Ein Beispiel für das Synthesepotenzial der OMER-Methode ist in Schema 4 gegeben.^[26] Die Glycopeptidvorstufen **19** und **20** wurden durch Standardsynthesemethoden hergestellt. Nach Disulfidreduktion gingen die Substrate die er-



Schema 4. Demonstration eines Protokolls für die Glycopeptid-Glycopeptid-Ligation.



Schema 5. Synthese von EPO(22–37). PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

hoffte cysteinvermittelte Ligation ein und lieferten das difunktionelle Glycopeptid **21** mit zwei differenzierten Kohlenhydratsektoren.

2.2.1. Anwendung auf EPO: Synthese des Glycopeptidfragments 22–37

Mit den nun verfügbaren Methoden zur Synthese komplexer Glycopeptide versuchten wir die Synthese des EPO-Fragments 22–37, das eine Dodecasaccharidomäne trägt. Wir synthetisierten das vollständige biantennäre N-Glycan **22**, das die für die Stabilität und Aktivität von EPO als wichtig erachteten Fucose- und Sialinsäuremotive enthält. Die Synthese war weitgehend auf die konvergenten Glycalkupplungsmethoden gestützt, die in unserer Gruppe entwickelt wurden (Schema 5).^[29] Glycan **22** wurde unter Lansbury-Aspartylierungsbedingungen mit dem kleinen Peptid **23** verknüpft, das den benötigten C-terminalen *ortho*-Thiophenol-ester trägt. Das entstehende Glycopeptid **24** enthält die EPO(22–28)-Sequenz.^[30] Mittels cysteinbasierter NCL und OMER-Techniken kuppelten wir **24** mit dem Peptid **25** und erzeugten das EPO(22–37)-Fragment **26** mit dem komplexen Dodecasaccharid von EPO am nativen Asparaginrest.

2.3. Zwei auxiliariasierte Ansätze für die cysteinfreie Glycopeptidligation

Schon sehr früh in unserem Programm zur EPO-Total-synthese stießen wir auf ein großes Problem, mit dem wir uns auseinandersetzen mussten. Die Kent'sche NCL-Strategie zur Verknüpfung einzelner Glycopeptidfragmente benötigt einen Cysteinrest an jeder Ligationsstelle; dort werden die Peptide für die Kupplung aktiviert. Wie viele natürlich vorkommende Proteine und Glycoproteine verfügt EPO über

sehr relativ wenige Cysteinreste (deren vier), die sich zudem in für die Synthese ungünstigen Positionen im Peptidrückgrat befinden. Von Anfang an mussten wir daher einen Fokus auf die Entwicklung von breit einsetzbaren Ligationstechniken legen, die sich die Logik der NCL zu Nutze machen, aber kein Cystein an den vorgesehenen Ligationsstellen erfordern würden. Wie unten beschrieben, entwickelten wir tatsächlich mehrere auxiliarbasierte Ligungsstrategien, die mechanistisch von der eleganten Logik der NCL inspiriert waren. Wir wollen anmerken, dass schon vor unseren unten beschriebenen Studien die Arbeitsgruppen von Kent^[31] und Dawson^[32] bahnbrechende Beiträge zur Entwicklung absaltbarer Thiol-basierter Auxiliare für die NCL an cysteinfreien Stellen geleistet hatten.

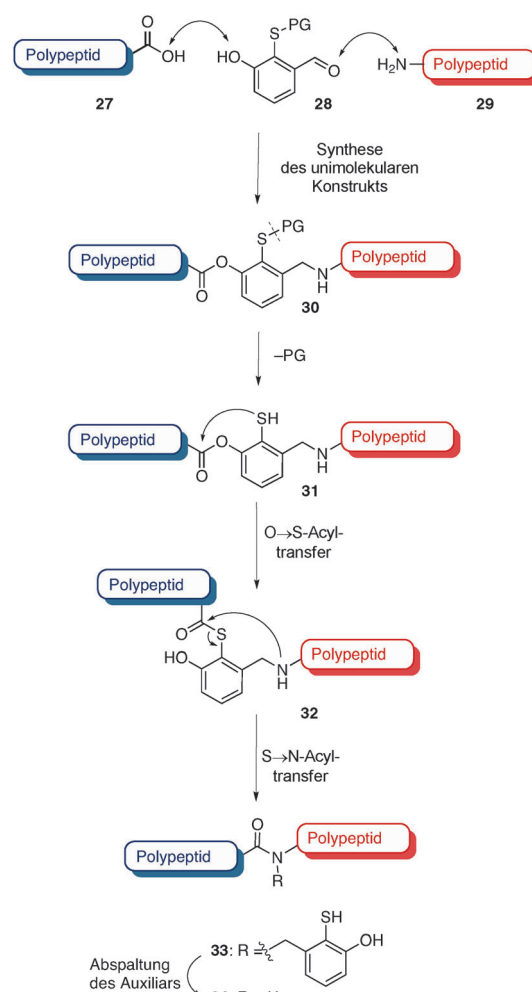
2.3.1. Auxiliarbasierte OMER-Verfahren

Wie oben beschrieben (Abschnitt 2.2), ergaben unsere mechanistischen Studien, dass – etwas überraschend – *ortho*-Thiophenolester einen leichten O→S-Acyltransfer eingehen und die Thioesterspezies bei niedrigen pH-Werten (2–4) dominiert. In Anbetracht dieses Belegs für die Existenz eines stöchiometrischen Thioester-Intermediats erschien es uns naheliegend, dass diese Reaktivität für die Entwicklung eines auxiliarbasierten cysteinfreien Ligungsprotokolls genutzt werden könnte. Die Idee, skizziert in Schema 6, ist erfreulich einfach:^[28] Zuerst werden die zwei Peptidfragmente durch Veresterungs- (27) und reduktive Aminierungsmethoden (29) in *meta*-Stellung an ein gemeinsames aromatisches Gerüst (28) geknüpft. Das aromatische Auxiliar ist mit einer geschützten Thiolgruppe in *ortho*-Stellung zwischen den beiden Peptidfragmenten ausgestattet. Unsere Vorstellung war, dass das Entfernen der Schutzgruppe am Thiol (30→31) eine Kaskadensequenz auslösen würde, bestehend aus dem O→S-Acyltransfer des C-terminalen Polypeptids (31→32) gefolgt vom S→N-Acyltransfer zum Amin des zweiten Glycopeptids (32→33). Die Abspaltung des Auxiliars würde schließlich die native Peptidsequenz ergeben (34).

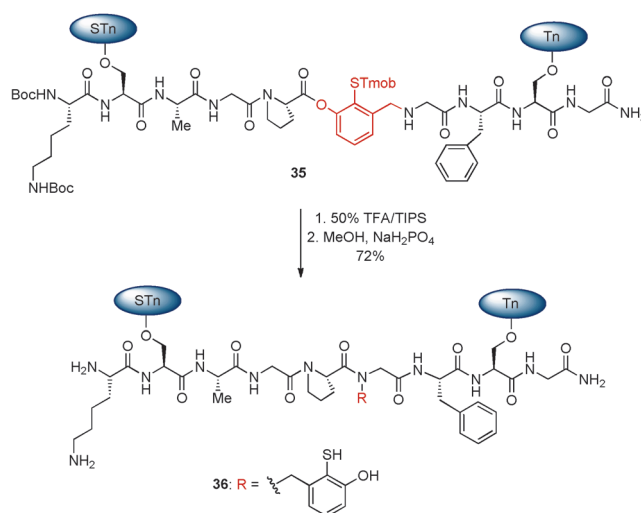
Diese allgemeine Strategie wurde unter verschiedenen Szenarien in die Praxis umgesetzt, unter anderem in der Synthese eines difunktionellen Glycopeptids (Schema 7). Bevor die Methode auf realistische Zielstrukturen angewendet werden kann, bedarf es derzeit jedoch der Entwicklung eines effizienten und milden Protokolls für die Abspaltung des Auxiliars.

2.3.2. Temporär gebundene Auxiliare

Als nächstes überlegten wir, ein temporär gebundenes Auxiliar für eine cysteinfreie Ligation zu nutzen. Der Ansatz bestand darin, beide Glycopeptidfragmente an eine N-terminale Thiobenzolgruppe^[33] zu binden (13 + 37→38), um so die Reaktanten in eine ausreichende Nähe für den entscheidenden S→N-Acyltransfer (38→39) zu bringen (Schema 8). Nach der Entfernung des Auxiliars mittels einer zweistufigen Sequenz würde man das native Glycopeptid 40 erhalten. Die Tauglichkeit dieser Strategie wurde demonstriert, allerdings besteht eine praktische Einschränkung darin, dass ein Glycin oder Alanin als C-terminale Aminosäure gefordert ist. In

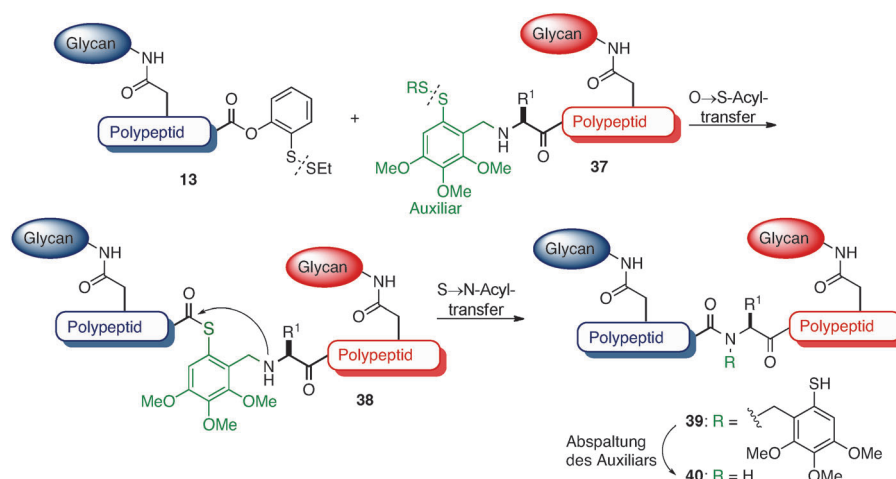


Schema 6. OMER-Strategie für die auxiliarbasierte cysteinfreie Ligation.



Schema 7. Demonstration eines OMER-basierten Auxiliar-Protokolls.

Fällen, in denen an beiden Ligationsstellen hoch verzweigte Aminosäuren vorliegen, werden stark verminderte Ausbeuten erhalten.



Schema 8. Tether-Strategie für die auxiliarbasierte cysteinefreie Ligation.

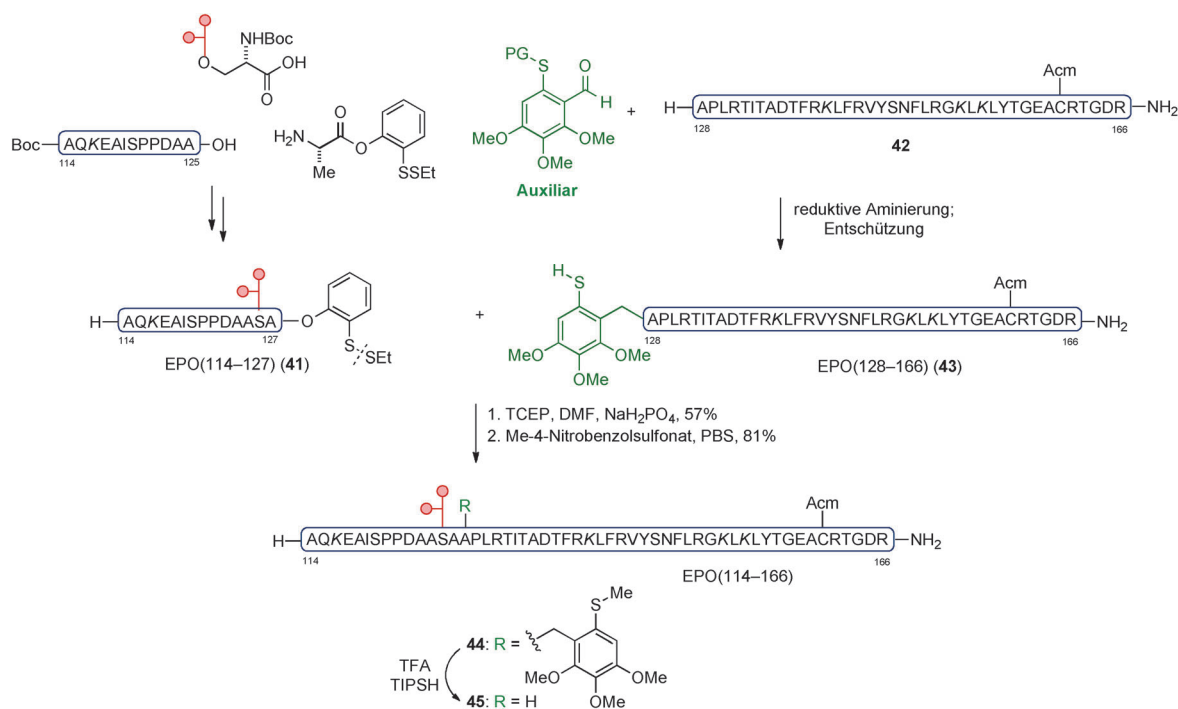
2.3.3. Anwendung auf EPO: Synthese des Fragments 114–166

Der präparative Nutzen unserer Strategie mit temporär gebundenem Auxiliar wurde in einer konvergenten Synthese des Glycopeptidfragments 114–166 von EPO (**45**) demonstriert (Schema 9).^[34] Das EPO(114–127)-Glycopeptid **41**, das das O-verknüpfte Glycophorin an Ser126 trägt, wurde nach Standardmethoden synthetisiert. Das Peptid **42** wurde am N-Terminus mit dem Thiobenzol-Auxiliar ausgestattet (**43**). Wie geplant, kuppelten **41** und **43** durch auxiliarvermittelte cysteinefreie Ligation zum EPO(114–166)-Fragment mit dem Auxiliar an Ala128. Die Benzylthiolgruppe wurde methyliert (**44**), und nach Einwirkung von Triisopropylsilan (TIPSH)

und Trifluoressigsäure (TFA) wurde das Auxiliar freigesetzt, um das native EPO(114–166)-Glycopeptid **45** zu erhalten.

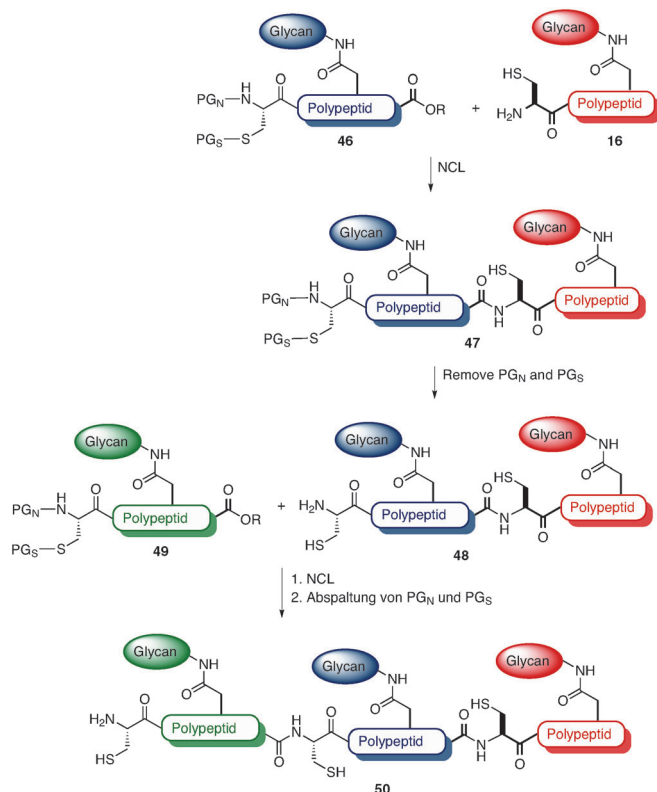
2.4. Eine Methode zur Synthese mehrfach glycosylierter Peptide durch reiterative Ligation

Wie oben genannt, enthält das EPO-Zielmolekül vier Glycosylierungsstellen. Unsere Synthesestrategie sah den Aufbau von vier individuellen Glycopeptidfragmenten vor, die dann über eine Abfolge von reiterativen Kupplungen zusammengefügt wurden. Strategien für die sequenzielle oder reiterative Peptidligation wurden von mehreren Arbeits-



Schema 9. Demonstration der Tether-Strategie: Synthese von EPO(114–166). Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, DMF = *N,N'*-Dimethylformamid, K = Lys(ivDde), TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphan.

gruppen mit Interesse an der Synthese komplexer Proteine untersucht.^[35] Wir wollten eine Methode entwickeln, mit der wir unterschiedlich glycosylierte multifunktionelle Peptide herstellen könnten. Die allgemeine Strategie ist in Schema 10 skizziert. Zwei Glycopeptidfragmente, **46** und **16**, werden im ersten Schritt durch OMER-vermittelte NCL gekuppelt. Das entstehende difunktionelle Glycopeptid **47** wird mit einem maskierten N-terminalen Cysteinrest ausgestattet, und nach Abspaltung der N- und S-Schutzgruppen wird das Addukt **48**



Schema 10. Reiterative Ligationsstrategie.

mit dem zweiten Glycopeptid (**49**) gekuppelt, sodass ein großes Glycopeptid mit drei unterschiedlichen Oligosaccharidomänen erzeugt wird.

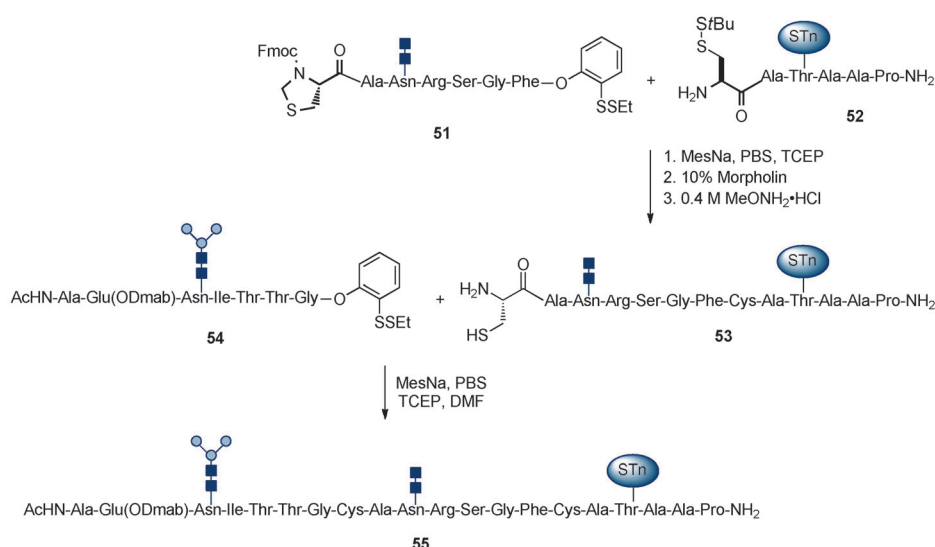
In der Praxis wählten wir die 1,3-Thiazolidin(Thz)-Gruppe zur Maskierung des Cysteins, da diese sich unter milden Reaktionsbedingungen leicht abspalten lässt.^[36] Wie in Schema 11 gezeigt, stellt die oben skizzierte Strategie der reiterativen Kupplung ein gangbares Verfahren zur Synthese trifunktioneller Peptidomänen dar. Die Fragmente **51**, **52** und **54** wurden durch reiterative NCL in guten Ausbeuten zur Zielsequenz **55** verknüpft.^[37]

2.5. Eine auxiliär- und cysteinfreie Kupplung von Glycopeptidfragmenten

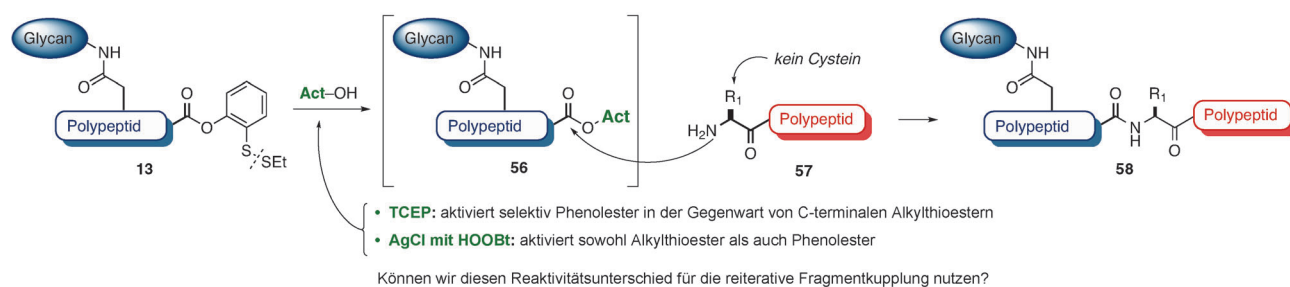
Wie oben erwähnt, war eines unserer Hauptziele die Entwicklung einer cysteinfreien Ligation. Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben wird, entwickelten wir zwei auxiliär-basierte cysteinfreie Methoden. Allerdings haben diese Ansätze eine Reihe wichtiger praktischer Einschränkungen. Erstens bereitet der S→N-Acytransfer Probleme, wenn sich verhältnismäßig sperrige Aminosäuren an den Ligationstellen befinden. Die Abspaltung des Auxiliars vom Peptidgerüst ist ebenfalls schwierig, insbesondere in Gegenwart empfindlicher glycosidischer Funktionalitäten. Vor diesem Hintergrund begannen wir über eine Strategie zur auxiliär- und cysteinfreien Fragmentkupplung nachzudenken.

In Anlehnung an die Silberionen-vermittelte Blake-Aimoto-Fragmentkondensationsreaktion^[38] wollten wir die charakteristischen Eigenschaften des C-terminalen *ortho*-Thiophenolesters **13** nutzen, um einen hochaktivierten Glycopeptidacyldonor (**56**) zu erzeugen, der vom N-Terminus eines zweiten Peptidsubstrats (**57**) angegriffen werden könnte (Schema 12). Die Hoffnung war natürlich, dass der N-terminale Rest von **57** kein Cystein sein müsste.

Wie in Schema 12 gezeigt ist, konnten wir zwei komplementäre Sätze von Reaktionsbedingungen identifizieren, die



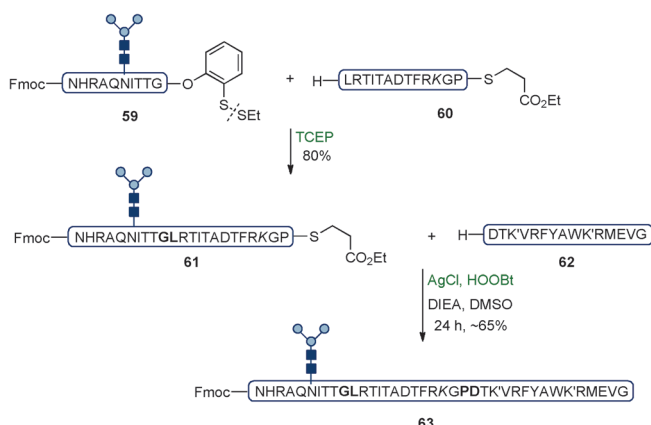
Schema 11. Demonstration der iterativen Ligation. Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl.



Schema 12. Strategie der Glycopeptidfragmentkupplung.

die erhoffte cysteinfreie Fragmentkupplung ermöglichen.^[39] Wir fanden, dass TCEP selektiv Phenolester in Gegenwart C-terminaler Alkylthioester aktiviert, während Silberchlorid mit HOObt genügend leistungstark ist, um sowohl Alkylthioester als auch Phenolester zu aktivieren.

Aufgrund dieser Befunde begannen wir zu untersuchen, ob der beobachtete Reaktivitätsunterschied für reiterative Fragmentkupplungen genutzt werden könnte. Wie in Schema 13 skizziert ist, konnte die Strategie in die Praxis umgesetzt werden. Das Glycopeptid **59**, das einen *ortho*-Thiophe-



Schema 13. Demonstration der Glycopeptidfragmentkupplung. DIEA = Diisopropylethylamin.

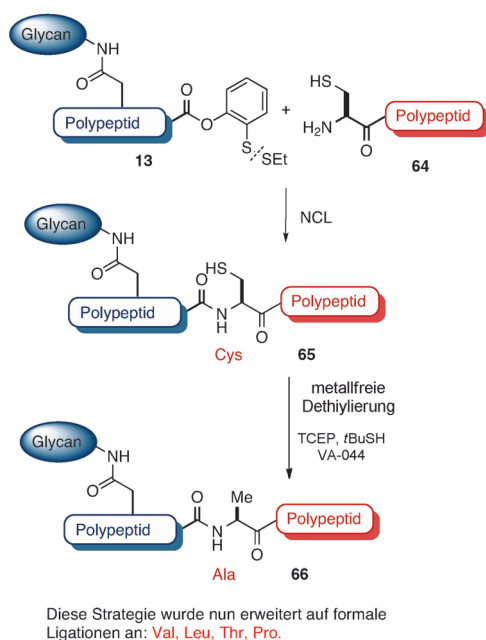
nolester trägt, reagierte in einer selektiven TCEP-vermittelten Fragmentkupplung mit dem Peptid **60**, das mit einem C-terminalen Thioester ausgestattet war; die Thioestergruppe ist unter diesen Reaktionsbedingungen inert. Das resultierende Addukt **61** reagierte in einer anschließenden AgCl/HOObt-vermittelten Fragmentkupplung leicht mit dem Peptid **62** und lieferte das erwünschte Glycopeptidfragment **63**. Trotz der beeindruckenden Reaktionseffizienz fanden wir, dass der C-terminale Aminosäurerest im Fragmentkupplungsschritt für eine Epimerisierung anfällig ist. Dieses potenzielle Problem könnte umgangen werden, indem man einen Prolin- oder Glycinrest an der Ligationsstelle platziert. Wie wir unten genauer ausführen, sollte diese allgemeine Strategie der cysteinfreien Fragmentkupplung breite An-

wendung in unseren ersten Bemühungen um die Synthese des EPO-Glycoproteins finden.

2.6. Eine leistungsfähige neue Strategie für die cysteinfreie Glycopeptidligation

2007 gelang uns ein großer methodischer Fortschritt auf dem Gebiet der cysteinfreien Ligation und, in Erweiterung davon, der Protein- und Glycoproteinsynthese.^[40] 2001 hatten Yan und Dawson eine zweistufige Alaninligationsstrategie vorgeschlagen und in die Praxis umgesetzt.^[41] Nach ihrem Protokoll werden zwei Peptidfragmente durch cysteinbasierte NCL verknüpft. Nach der Ligation wird der einstmalige Cysteinrest durch die Einwirkung von Raney-Nickel in ein Alanin umgewandelt. Die Dawson-Methode mag konzeptionell überzeugen, leidet aber unter erheblichen praktischen Beschränkungen, die von der Verwendung großer Mengen Raney-Nickel bei empfindlichen Substraten herrühren. In einem von uns und anderen^[4-6,42-45] als nützlich empfundenen Fortschritt entwickelten wir ein mildes, radikalisches Dethylierungsprotokoll für die Umwandlung von Cysteinresten in Alanine. Die Methode ist mit verschiedensten in Peptid- und Glycopeptidsubstraten anzutreffenden Strukturmotiven kompatibel.^[40] Es sei betont, dass die innere Logik hinter diesem Fortschritt nicht einem Verlangen nach einer erfolgreichen Synthese entsprang, sondern aus einer nach heutigen Standards obskuren Übung von Erzeugen und Abfangen freier Radikale hervorging. Abermals stellen wir fest, wie eine chemische Synthese in entscheidender Weise das Verstehen des Mechanismus voraussetzt.

In der Folge stellten wir mehrere Aminosäuresurrogate mit geeignet platzierten Thiolgruppen her. Diese Surrogate werden an den N-terminalen Fragmenten angebracht und gehen eine Thiol-unterstützte Ligation ein, um Addukte des in Schema 14 gezeigten Typs zu bilden. Unter den Standardbedingungen unserer metallfreien Dethylierung (MFD) lassen sich die einstmaligen Thiolgruppen leicht abspalten. Mit diesem Ansatz ist es uns bisher gelungen, Ligationen an Alanin,^[40] Valin,^[46] Threonin,^[47] Leucin^[48] und Prolinresten^[49] durchzuführen. Andere Arbeitsgruppen haben das allgemeine Konzept der Thioaminoäureligation mit nachfolgender Desulfurierung weiter ausgedehnt, einschließlich der Ligation von Phenylalanin,^[50] Lysin,^[51] Leucin,^[52] Glutamin^[53] und Argininresten.^[54] Mit Ausnahme der Phenylalaninligation nach Crich,^[50] die vor unserem Bericht er-

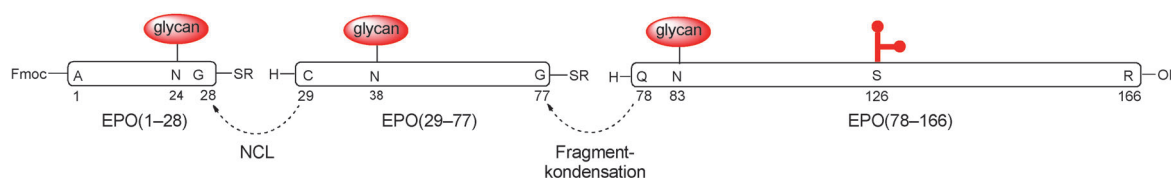


Schema 14. Auxiliarföe cysteinefreie Ligation: metallfreies Dethylierungsprotokoll.

schiene ist, setzt jede dieser Methoden MFD zur Abspaltung des nicht länger benötigten Thiolrestes ein. Wie wir sehen werden, erwies sich dieses MFD-Protokoll als entscheidend für den Erfolg der EPO-Synthese.

3. Eine erste Strategie für die Totalsynthese von EPO

Mit unseren verbesserten Methoden aus Abschnitt 2 machten wir uns an die Herstellung der drei Glycopeptid-domänen, die zusammengekommen das gesamte Glycopeptidrückgrat bilden würden. Die allgemeine Synthesestrategie, in Schema 15 skizziert, erforderte die Zusammenführung dreier Glycopeptidfragmente: EPO(1–28), EPO(29–77) und EPO(78–166). Wir konnten uns gut vorstellen, die beiden ersten Domänen durch cysteinbasierte NCL zu verknüpfen, während die Verknüpfung an 77/78 über eine cysteinefreie Fragmentkondensation erreicht werden sollte. Die Herstellung der drei einzelnen Glycopeptidfragmente wird im Folgenden beschrieben.



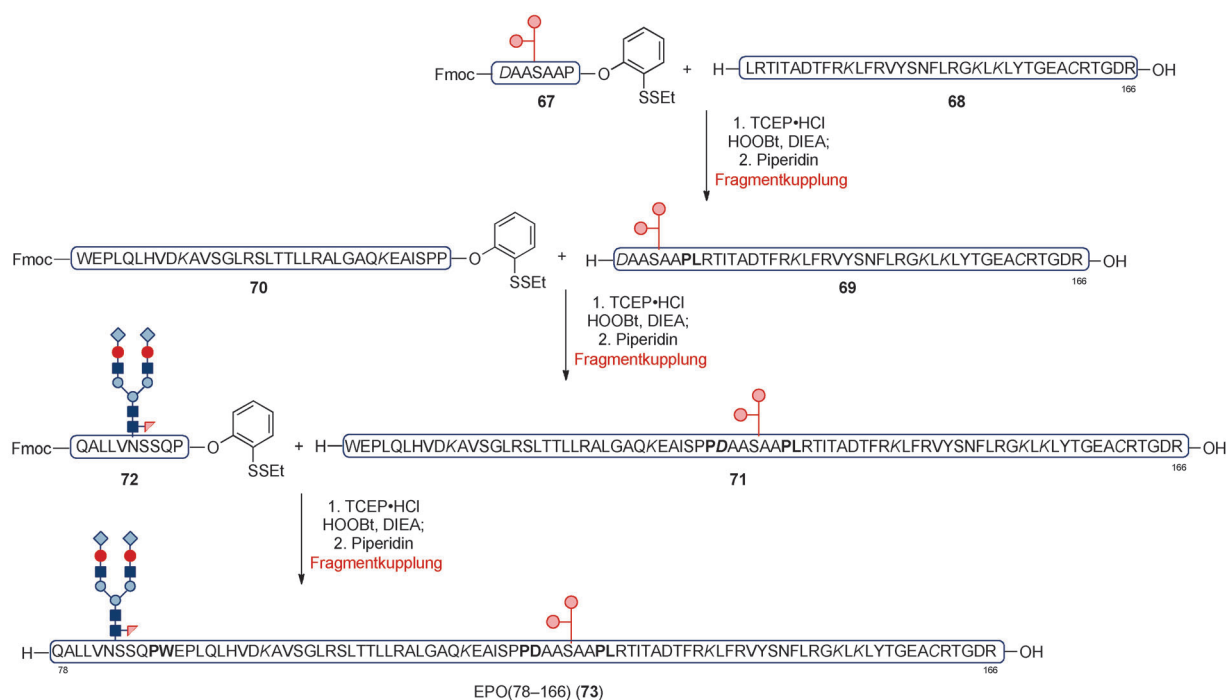
Schema 15. Synthesestrategie erster Generation für EPO.

3.1. Synthese des EPO-Fragments 78–166

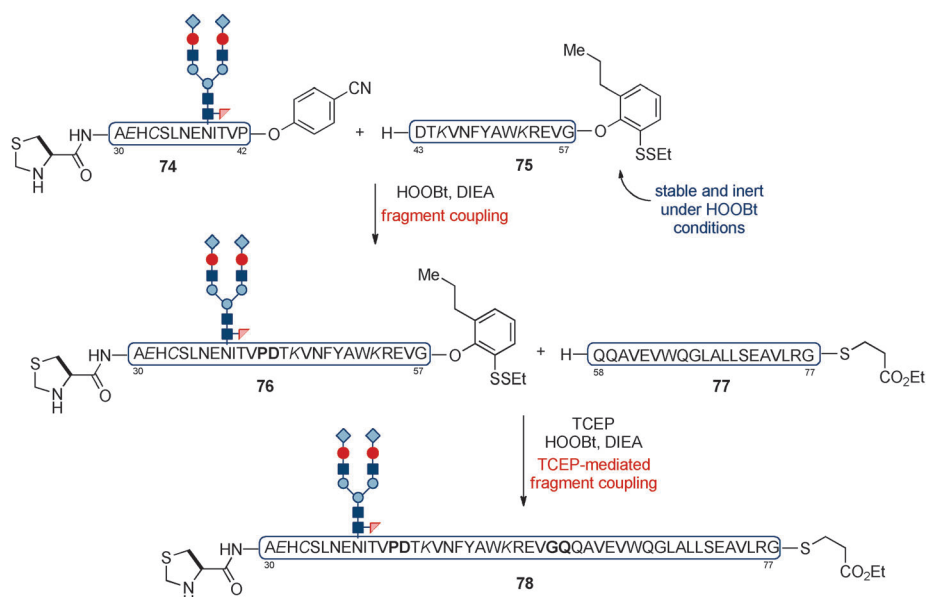
EPO(78–166), die längste der drei gesuchten Untereinheiten, enthält sowohl O- als auch N-verknüpfte Glycan-domänen. Beim Betrachten der cysteinarmen Peptidsequenz identifizierten wir mehrere gut gelegene Prolinreste, die geeignete Stellen für unser TCEP-vermitteltes Fragmentkondensationsprotokoll (Abschnitt 2.5) sein sollten. Als erstes synthetisierten wir die seitenkettengeschützten Polypeptidyl-(68 und 70) und Glycopeptidyl-Substrate (69 und 72) (Schema 16).^[55] Das kurze Glycopeptid 67, das einen C-terminalen *ortho*-Thiophenolester trägt, reagierte in einer TCEP-vermittelten Fragmentkupplung mit dem Polypeptid 68 zu der Glycopeptid-Zwischenstufe 69. Diese Zwischenstufe wurde anschließend durch Fragmentkupplung mit dem Polypeptid 70 verlängert. In der abschließenden Kupplung wurde das Glycopeptid 71, das den EPO(88–166)-Abschnitt darstellt, mit dem Glycopeptid 72 verbunden, um die EPO(78–166)-Domäne zu liefern. Die Anwendung dieser Fragmentkuppelungsstrategie bot den entscheidenden Vorteil, dass das wertvolle Glycopeptid 72, das die Dodecasaccharidgruppe trägt, als konzentrationslimitierendes Reagens eingesetzt werden konnte.

3.2. Synthese des EPO-Fragments 29–77

Die Synthese des EPO(29–77)-Glycopeptidfragments erwies sich als relativ anspruchsvoll.^[56] Unser ursprünglicher Plan sah die Verknüpfung der EPO(29–42)-Glycopeptid-untereinheit mit der EPO(43–77)-Peptiddomäne vor. Allerdings war die angedachte Kupplung aus verschiedenen Gründen problematisch. Geringe Reaktivität, falsche Polarität und schwerwiegende Substrataggregation vereitelten eine effiziente Reaktion. Um diese Probleme zu umgehen, entwickelten wir eine zweistufige Fragmentkuppelungsstrategie, mit der sich das EPO(29–42)-Glycopeptidfragment sequenziell in N→C-Richtung verlängern lassen sollte. Die erfolgreiche Anwendung dieser Strategie würde die Einführung geeignet aktivierter und differenzierter C-terminaler Funktionalitäten erfordern. Wie in Schema 17 gezeigt ist, wurde das Glycopeptid 74 mit einem hochreaktiven *p*-Cyanophenylester ausgestattet. Das Ziel war eine HOOBt-vermittelte Fragmentkupplung mit dem Peptid 75, das einen inerten *ortho*-Thiophenolester trägt. Unter den basischen Reaktionsbedingungen wurde unser gewöhnlicher *ortho*-Thiophenolester jedoch vollständig hydrolysiert. Infolgedessen entwarfen wir eine stabilere, *ortho*-substituierte Variante des OMER-Esters, die gegen nukleophilen Angriff inert sein sollte. Mit diesen Vorgaben kuppelte das EPO(43–57)-Peptid



Schema 16. Synthese von EPO(78–166).



Schema 17. Synthese von EPO(29–77).

75 mit **74** zur Zwischenstufe **76**, in der der maskierte Thioester intakt geblieben war. Das letzte Ziel wäre die Fragmentkupplung zwischen **76** und dem Peptid **77**, das eine reaktive C-terminale Alkylthioesterfunktion trägt. Wie erwartet (Abschnitt 2.5), kuppelte das Phenolester-substituierte Polypeptid **76** unter TCEP-vermittelten Bedingungen mit **77** und lieferte das angestrebte EPO(29–77)-Fragment **78**.

3.3. Synthese des EPO-Fragments 1–28

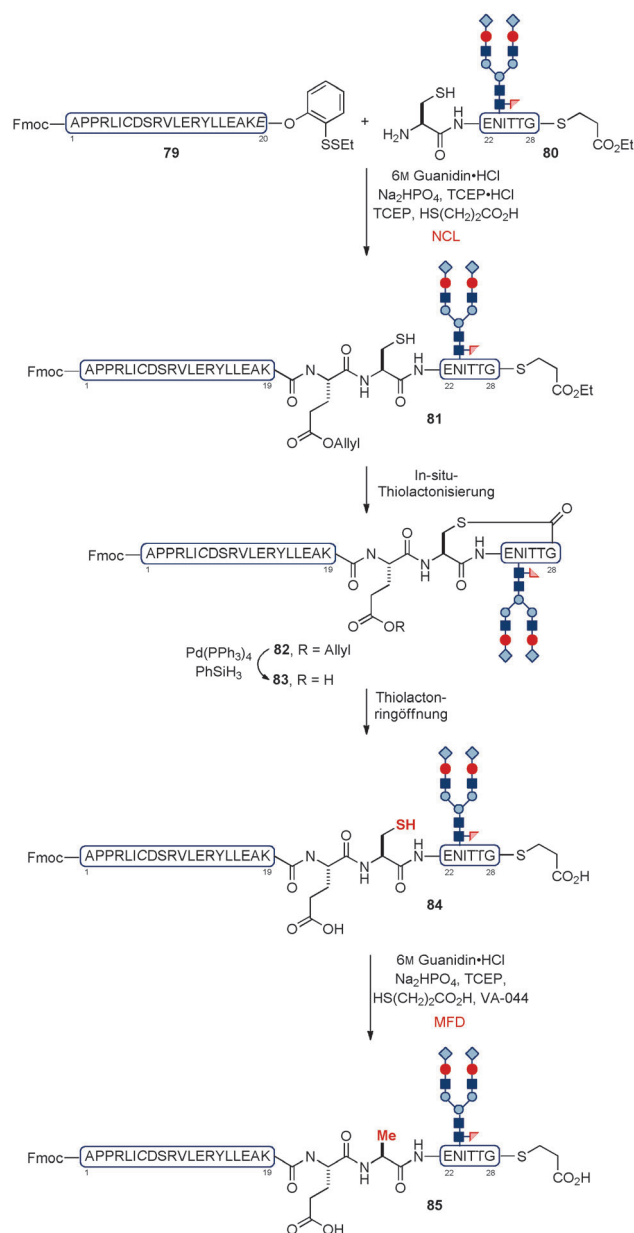
Obwohl es das kürzeste Fragment ist, stellte die Synthese der EPO(1–28)-Domäne letztlich eine besondere präparative Herausforderung dar, denn es befinden sich keine funktionellen Cystein-, Prolin- oder Glycinreste in der Peptidsequenz.^[57] Die Anwendung cysteinbasierter NCL- oder Fragmentkuppelungsstrategien war darum ausgeschlossen. Versuche einer direkten Lansbury-Aspartylierung des Do-

decasaccharidglycans mit dem vollständigen EPO(1–28)-Peptidsegment führten lediglich zur Bildung des Aspartimid-Nebenprodukts. Um die Synthese von EPO(1–28) zu erreichen, griffen wir auf eine cysteinfreie Ligationsstrategie zurück. Wir hatten kurz zuvor eine hoch effektive, metallfreie Cys→Ala-Dethylierung entwickelt (in Abschnitt 2.6 beschrieben), die unserer Meinung nach für die Synthese von EPO(1–28) in Frage kam. In diesem Zusammenhang identifizierten wir Ala21 als eine plausible Verknüpfungsstelle. Wir synthetisierten das Polypeptid **79** und das kürzere Peptidfragment **80**, das einen temporären N-terminalen Cys21-Rest trug. **79** und **80** wurden unter gewöhnlichen NCL-Bedingungen zum Glycopeptid **81** ligiert. Daneben entstand in situ das entsprechende Thiolacton **82** (Schema 18). Durch Behandlung des entschützten **83** mit Thiopropionsäure wurde der Thiolactonring geöffnet, und die Zwischenstufe **84** wurde gebildet. Das Molekül war nun geeignet vorbereitet, um die entscheidende Dethylierung zu versuchen. Erfreulicherweise fanden wir, dass **84** unter unseren milden MFD-Bedingungen die erhoffte Dethylierung zum EPO(1–28)-Segment **85** mit dem nativen Ala21-Rest an der Lignationsstelle einging.

Damit hatten wir die drei benötigten Glycopeptidfragmente zur Verfügung und wollten nun versuchen, sie nach der in Schema 15 skizzierten Strategie zu verknüpfen. Enttäuschenderweise blieben jedoch alle Bemühungen, die EPO-(29–77)- und EPO(78–166)-Glycopeptide durch Fragmentkupplung zu verbinden, erfolglos. Stattdessen traten eine starke Aggregation und Zersetzung der Glycopeptidvorstufen auf (Abbildung 3). Uns wurde am Ende klar, dass wir eine modifizierte Strategie benötigten.

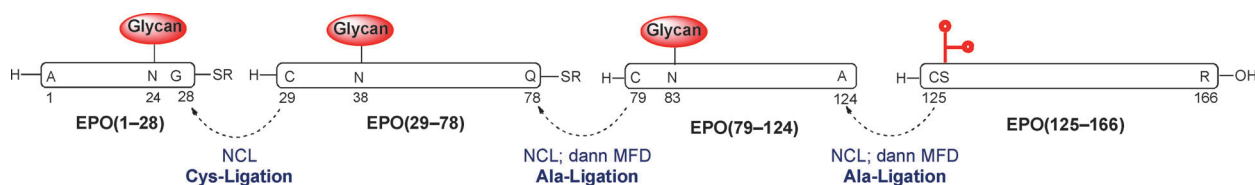
4. Eine zweite Strategie für die Totalsynthese von EPO

Als wir 2010 anfangen, über eine modifizierte Strategie für die EPO-Synthese nachzudenken, hatten wir die Vielseitigkeit und Effizienz unseres cysteinfreien NCL/MFD-Ansatzes bereits an einer Reihe von komplexen Polypeptid- und Glycopeptidsystemen demonstriert.^[40–48] Deshalb waren wir recht zuversichtlich, dass diese Ligationsstrategie auch im Kontext der EPO-Synthese erfolgreich eingesetzt werden könnte. Unsere modifizierte Strategie für die Synthese von EPO sah die iterative Verknüpfung von vier Glycopeptidfragmenten über eine cysteinbasierte NCL und zwei formale Alaninligationen vor. Wie in Schema 19 gezeigt, wurden temporäre Cysteinreste an den Positionen 79 und 125 angebracht. Im Anschluss an die NCL sollten die einstmaligen Thiofunktionalitäten durch MFD entfernt werden, um die nativen Alaninreste an diesen Stellen zu erhalten. In unseren ersten



Schema 18. Synthese von EPO(1–28).

Versuchen installierten wir weniger komplexe Chitobiosegruppen an allen für die N-Glycosylierung vorgesehenen Stellen. Wie wir zeigen werden, gelang uns mithilfe dieser allgemeinen Strategie die erste Totalsynthese eines glycosylierten Wildtyp-EPO mit Chitobioseglycanen.



Schema 19. Synthesestrategie zweiter Generation für EPO.

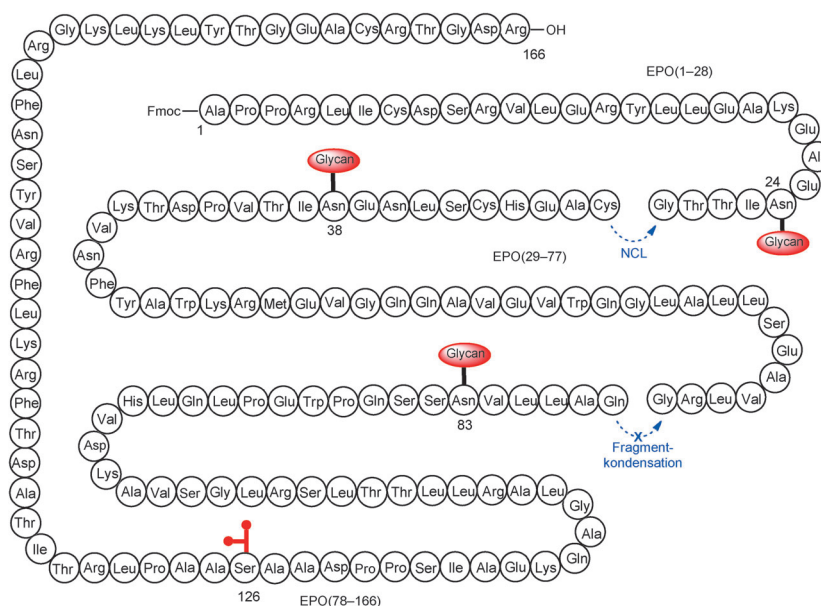
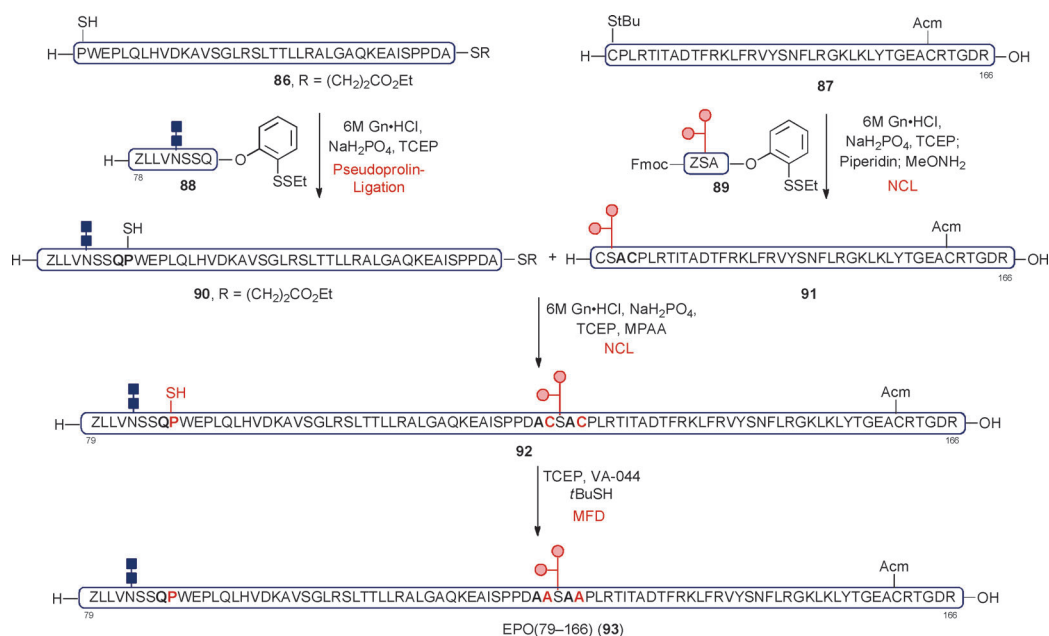


Abbildung 3. Strategie erster Generation für die EPO-Synthese.

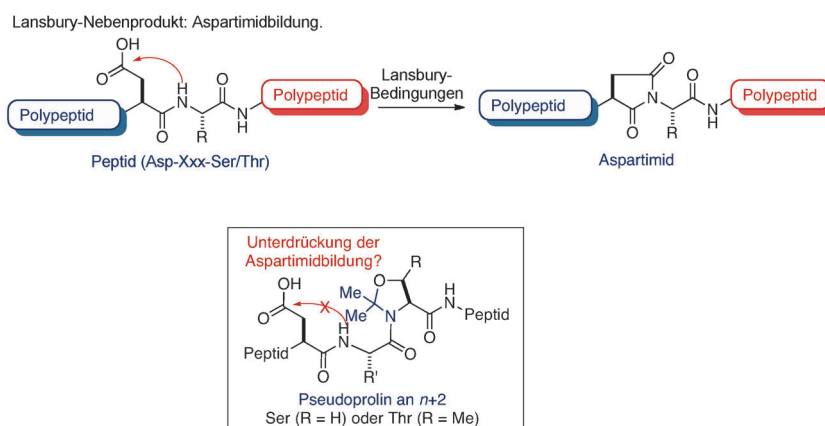
4.1. Eine Synthese des EPO(79–166)-Fragments

Ende 2011 waren wir in der Lage, eine konvergente Synthese des EPO(79–166)-Fragments durchzuführen.^[58] Die Synthese beruhte auf den NCL/MFD-Verfahren, die in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und optimiert wurden. Zwei lange Peptide (**86** und **87**) und zwei kürzere Glycopeptide (**88** und **89**) wurden nach unseren Standardmethoden hergestellt (Schema 20). Die Fragmente **86** und **88** wurden über unsere Pseudoprolinligation zu dem Glycopeptid **90** verknüpft, das

eine temporäre Thiolgruppe an Pro87 aufweist. In ähnlicher Weise lieferte die cysteinbasierte NCL von **87** und **89** das Glycopeptid **91** mit einem Cysteinrest an der Lignationsstelle. Die beiden Glycopeptidfragmente **90** und **91** wurden durch NCL zur Zwischenstufe **92** gekuppelt, die drei nicht länger benötigte Thiolgruppen an HS-Pro87, Cys125 und Cys128 trägt. Erfreulicherweise fanden wir, dass **92** unter unseren MFD-Bedingungen global dethyliert wurde und das erwünschte EPO(79–166)-Fragment bildete.



Schema 20. Synthese von EPO(79–166).



Schema 21. Vorgeschlagene Lösung für das Problem der Aspartimidbildung in der Lansbury-Aspartylierung.

4.2. Eine allgemeine Strategie für die Oligosaccharid-Aspartylierung

Wie oben angemerkt (Abschnitt 2.1), ist die Herstellung von N-verknüpften Glycopeptiden durch Lansbury-Aspartylierung oft bereits dann problematisch, wenn moderat große Polypeptidsubstrate im Glycosylierungsschritt eingesetzt werden, da es zu einer starken Bildung von Aspartimidpeptidyl-Nebenprodukten kommt.^[59] Für die Syntheseeffizienz bedeutet dies eine beträchtliche methodische Einschränkung. In Anbetracht einer fehlenden Methode für die direkte Verknüpfung von langen Polypeptidfragmenten mit Glycankupplungspartnern gingen wir (und andere) stattdessen üblicherweise so vor, dass wir kurze Glycopeptid- und längere Polypeptidfragmente herstellten und anschließend kuppelten. Diese strategische Anforderung hat beträchtliche Auswirkungen auf die Konvergenz und Ausbeute, wie in Abschnitt 3 illustriert wurde.

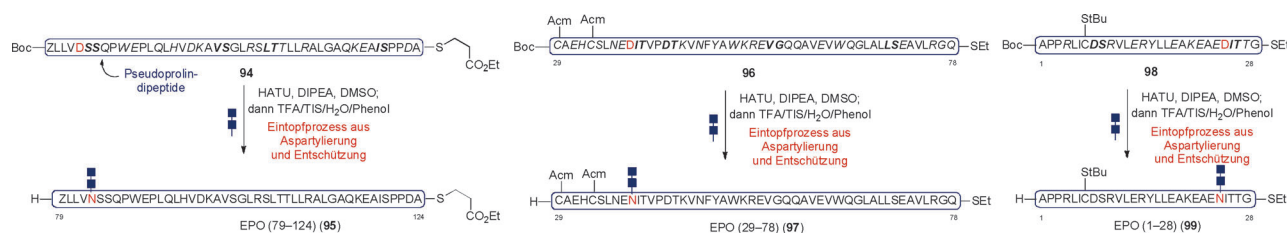
Im Rahmen unseres Glycoprotein-Totalsyntheseprogramms begannen wir nach einer Lösung für das lange bestehende Problem der Lansbury-Aspartylierung großer Peptidylsubstrate zu suchen. Wir erkannten, dass 1) Pseudoprolindipeptide, die von Ser oder Thr abgeleitet sind, in der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) anspruchsvoller Peptidsequenzen große Nutzen haben^[60] und 2) die generische Konsensussequenz für die N-Glycosylierung in nativen Proteinen Asn-Xaa-Ser/Thr ist. Wir fragten uns, ob die Einführung einer temporären Pseudoprolingruppe an der $(n+2)$ -Position relativ zum Asp-Rest die Aspartimid-Bildung unterdrücken könnte – vielleicht durch Veränderung der lokalen Struktur oder des elektronischen Charakters des Peptids an der Aspartylierungsstelle. Da ein Ser- oder Thr-Rest an der $(n+2)$ -Position universell lokalisiert ist, würde eine solche Strategie – falls erfolgreich – eine allgemeine Lösung für das sehr schwierige Problem der effizienten Peptid-Glycankupplung bieten.

2012 gelang uns die Umsetzung des Pseudoprolin-basierten Aspartylierungskonzepts, wie in Schema 21 gezeigt.^[61] Tatsächlich wurde die Methode ursprünglich entwickelt, um die Synthese der α - und β -Untereinheiten des FSH zu bewerkstelligen.^[20] Unter unseren optimierten Bedingungen der Eintopf-Aspartylierungs/Entschützung wurden vollständig

geschützte Polypeptidsequenzen beträchtlicher Länge der Lansbury-Aspartylierung mit Glycandomänen unterworfen, und nach Entschützung erhielten wir vollständig ausgearbeitete Glycopeptidfragmente. Wie unten beschrieben, ermöglichte die Entwicklung dieser leistungsfähigen Synthesemethode die Erlangung einer bemerkenswert raschen und konvergenten Totalsynthese des EPO-Glycoproteins. Interessanterweise konzipierte die Arbeitsgruppe von Unverzagt unabhängig von uns die gleiche Lösung für das Problem der Aspartimid-Bildung in der Lansbury-Aspartylierung. Ihre elegante Studie, die die Effekte der Einführung eines ähnlichen Pseudoprolindipeptid-Motivs an der $(n+2)$ -Position durch Festphasenglycopeptidsynthese beschreibt, wurde kurz vor Erscheinen unserer Arbeit in der *Angewandten Chemie* veröffentlicht.^[62]

4.3. Konvergente Synthese der EPO(79–124)-, EPO(29–78)- und EPO(1–28)-Fragmente

Alle drei N-verknüpften Glycopeptidfragmente, EPO(79–124), EPO(29–78) und EPO(1–28), wurde mithilfe der oben beschriebenen Eintopf-Aspartylierung/Entschützung hergestellt.^[16] Die geschützten Peptidvorstufen (**94**, **96** und **98**) mit den Pseudoprolindipeptidmotiven wurden durch SPPS synthetisiert (Schema 22). Unter Lansbury-Bedingungen kuppelte jedes Peptid bereitwillig mit Chitobioseglycan. Durch anschließende Zugabe eines TFA-Cocktails (TFA/TIPSH/H₂O/Phenol) wurden die Pseudoprolinfunktionalitäten demaskiert und die Peptidschutzgruppen entfernt, sodass die erwünschten Glycopeptidfragmente **95**, **97** und **99** mit den benötigten Cysteinschutzgruppen und C-terminaler Funktionalisierung erhalten wurden. Das vierte EPO-Fragment (**91**), das den EPO(125–166)-Sektor bildet, wurde nach unserer in Schema 20 skizzierten Route hergestellt.^[58] Die bemerkenswerten präparativen Vorzüge, die unsere neu entwickelte Aspartylierungsmethode bietet, lassen sich in diesem Szenario sehr gut beurteilen. Jedes der drei N-verknüpften Glycopeptidfragmente wurde in einem einzigen Schritt aus einer durch SPPS hergestellten Vorstufe erzeugt.



Schema 22. Demonstration des Aspartylierungsprotokolls: Synthese von EPO-Glycopeptidfragmenten.

4.4. Erste Totalsynthese der Primärstruktur von EPO

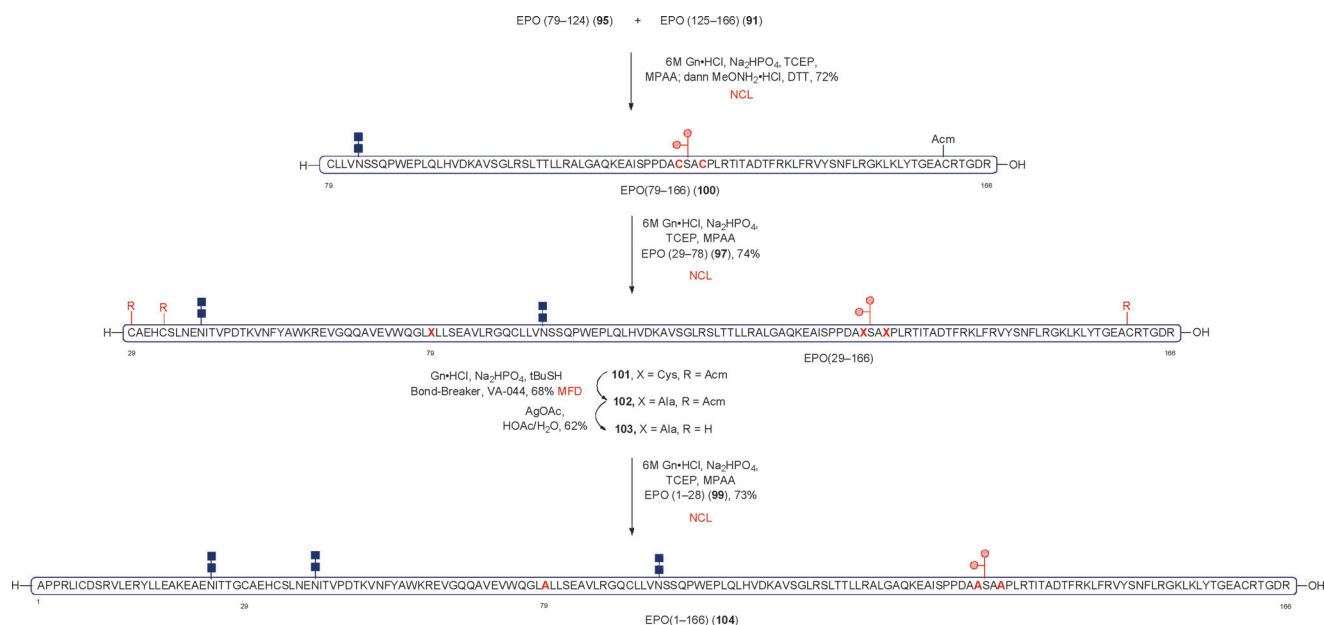
Da uns nun die vier EPO-Glycopeptidfragmente zur Verfügung standen, wollten wir als nächstes die in Schema 19 skizzierte Kupplungsstrategie austesten. Die Glycopeptide **95** und **91** wurden unter Standard-NCL-Bedingungen zu der Zwischenstufe **100** verknüpft, die der EPO(79–166)-Domäne entspricht (Schema 23). Dieses Konstrukt reagierte in einer zweiten cysteinbasierten NCL mit **97** zum EPO(29–166)-Fragment **101**. Die drei Cysteine wurden unter MFD-Bedingungen in die benötigten Alaninreste an den Positionen 79, 125 und 128 überführt. Nach Entfernung der Acm-Schutzgruppen^[63] wurde das Glycopeptid **103** erhalten. Im letzten Schritt lieferte eine cysteinbasierte NCL mit EPO(1–28) (**99**) die EPO(1–166)-Primärstruktur **104** mit der Wildtyp-Aminosäuresequenz und allen vier nativen Glycosylierungsstellen.

4.5. Totalsynthese des gefalteten EPO-Glycoproteins

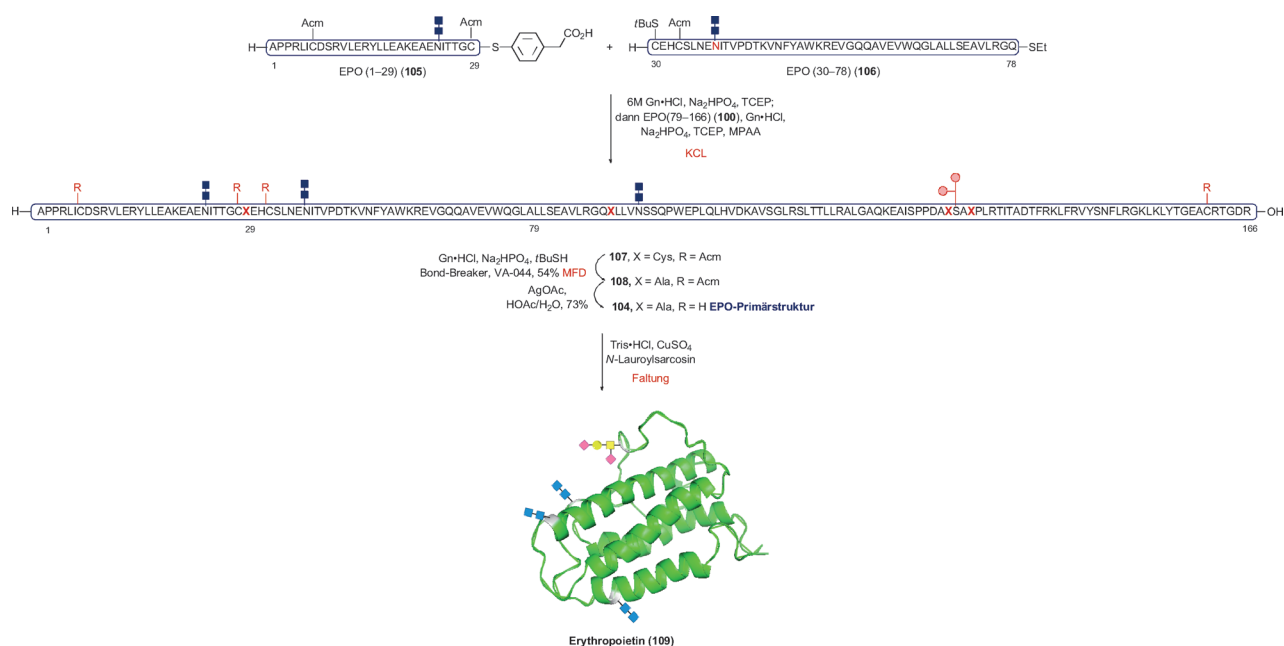
In einer parallelen Studie untersuchten wir eine alternative, kinetisch kontrollierte Ligation^[64] (KCL) als mögliche Syntheseroute für EPO. Das Ziel war eine Optimierung der

Synthesekonvergenz^[16] durch die Verknüpfung der drei EPO-Fragmente in einem Eintopfprozess. Unsere Überlegung war, die erste Verknüpfungsstelle von Gly28–Cys29 zu Cys29–Ala30 zu verschieben, wodurch es möglich sein sollte, eine Serie kinetisch kontrollierter cysteinbasierter Ligationen auszuführen (mithilfe eines temporären Cysteins anstelle des Alanins an Position 30), die die vollständige Glycopeptidsequenz mit nicht-nativen Cysteinresten an den Positionen 30, 79, 125 und 128 liefern würde. Eine einziger globaler MFD-Schritt gefolgt von Acm-Abspaltung sollte zur EPO-Primärstruktur führen.

Diese Strategie erwies sich als hoch effizient. Die modifizierten Glycopeptidfragmente **105** und **106**, die differenzierte C-terminale Thioesterfunktionalitäten aufweisen, wurden mithilfe der oben beschriebenen Eintopfmethodologie aus Aspartylierung und Entschützung hergestellt.^[61] KCL von **105** mit **106** und anschließende In-situ-Aktivierung des Gln-Alkylthioesters in der Gegenwart von **100** ergab das gewünschte Glycopeptid **107**. Durch Anwendung von MFD-Bedingungen wurde **108** erhalten, und anschließende Entschützung ergab die EPO(1–166)-Primärstruktur (**104**). Die Retentionszeiten im HPLC und die massenspektrometrischen Daten des Materials beider Routen (Schema 23 und 24) waren identisch.



Schema 23. Totalsynthese der EPO-Primärstruktur. DTT = Dithiothreitol, MPAA = 4-Mercaptophenyllessigsäure.



Schema 24. Totalsynthese von gefaltetem EPO.

Wir waren nun bereit, die Faltung einer vollständig synthetischen, geeignet glycosylierten EPO-Primärstruktur nach dem in der Literatur beschriebenen Protokoll für aus CHO-Zellen abgeleitetes inhomogenes EPO zu versuchen. Tatsächlich ergab die Behandlung von **104** mit CuSO_4 als Oxidationsmittel und N-Lauroylsarcosin als Additiv vollständig homogenes EPO-Glycoprotein. Der Leser mag sich unsere Freude (und Erleichterung) vorstellen, als die massenspektrometrische Analyse die Bildung des gefalteten Glycoproteins bestätigte.

4.6. Totalsynthese von nichtglycosyliertem gefaltetem EPO-Protein

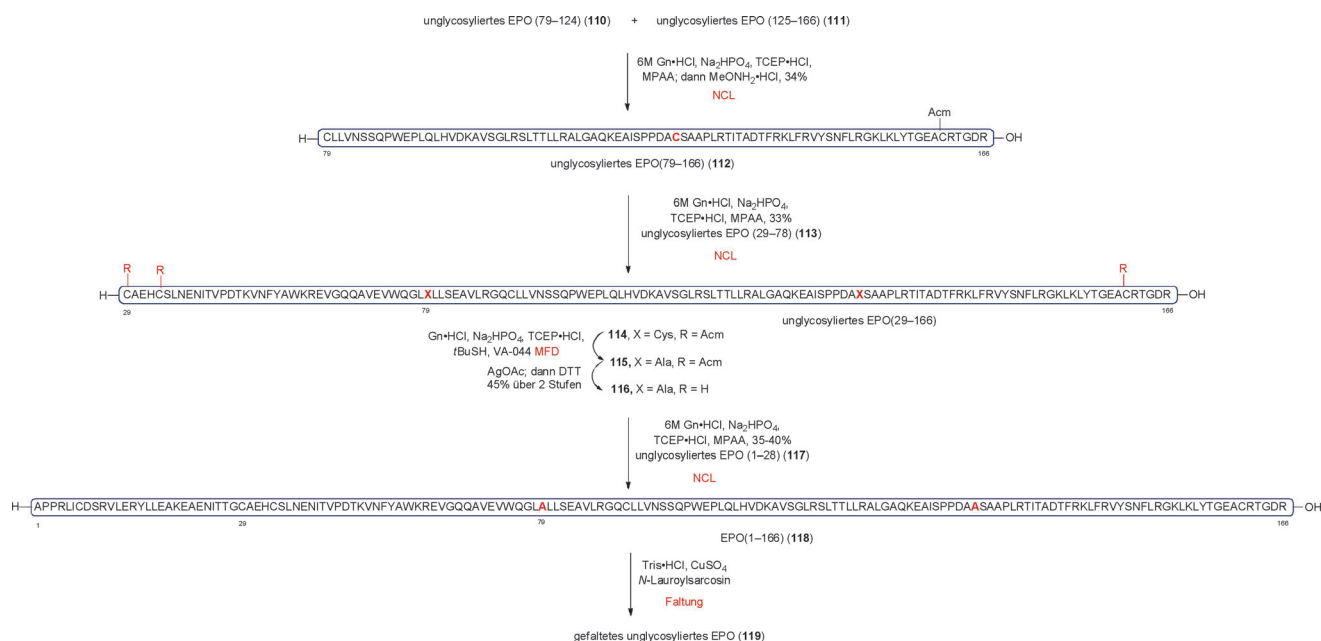
Um die Effekte der Proteinglycosylierung auf die physikalischen Eigenschaften von EPO zu erforschen, wendeten wir die in Abschnitt 4.4 beschriebene Synthesesequenz auf die Herstellung von nichtglycosyliertem EPO-Protein an. Unsere früheren Bemühungen zur Totalsynthese von nichtglycosyliertem EPO hatten mit Komplikationen aufgrund der sehr niedrigen Löslichkeit der vollständig aufgebauten, nichtglycosylierten Peptidkette zu kämpfen.^[65] Hier bot nun die in Abschnitt 4.4 eingesetzte Route den bedeutenden Vorteil, dass der Aufbau der vollständigen Peptidsequenz den letzten Syntheseschritt vor der Proteinfaltung darstellt (Schema 25). Unsere Versuche zur Synthese und Faltung von nichtglycosyliertem EPO-Protein waren in der Tat erfolgreich, obwohl Aggregations- und Löslichkeitsprobleme die Aufnahme qualitativ hochwertiger massenspektrometrischer Daten sehr erschwerten. Diese Studien fungierten als eine Bestätigung für den Befund, dass CHO-Zellen ihr naszierendes EPO selbst in einer horrenden Mischung von Glycoformen mit bewundernswerter Selektivität glycosylieren.

4.7. Vollsynthetisches gefaltetes EPO-Glycoprotein besitzt erythropoietische Aktivität

Letztlich konnten wir die erythropoietische Aktivität der ungefalteten EPO-Primärsequenz (**104**) sowie von unglycosyliertem EPO-Protein (**119**) und gefaltetem EPO-Glycoprotein (**109**) ermitteln. Während ungefaltetes EPO (1-166) keine nachweisbare Aktivität zeigte, waren gefaltetes EPO-Glycoprotein (**109**) und gefaltetes unglycosyliertes EPO (**119**) biologisch aktiv. In In-vitro-Zellproliferationsstudien vermittelten sowohl **109** als auch **119** die Bildung von Erythroidkolonien aus CD34⁺-Progenitorzellen. Glycosyliertes EPO zeigte eine sehr viel höhere Aktivität als nichtglycosyliertes, was vermutlich an der geringen Stabilität des nichtglycosylierten EPO liegt (Abbildung 4).

5. Schlussfolgerungen

Wie haben hier einen Überblick über die Strapazen, Rückschläge und Fortschritte bei der Vervollständigung unseres zehn Jahre anhaltenden Projekts zur Synthese eines funktionellen EPO gegeben. Glücklicherweise waren wir in der Lage, die vollständige Primärstruktur zu erzeugen, ohne Eingeständnisse zur Vereinfachung des Problems machen zu müssen. Darüber hinaus ist es uns gelungen, Glycosylierungen an jeder der nativen Stellen einzuführen. Es wurde gezeigt, dass ungefaltetes EPO biologisch unfunktionell ist, während gefaltetes EPO tatsächlich Erythropoiese induzierte. Wir hoffen, dass nunmehr die Voraussetzungen geschaffen sind, um noch tiefere Einblicke in die komplexen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) zu gewinnen, die die Effekte der Glycosylierung auf die Aktivität von EPO bestimmen. Um diesem anspruchsvollen Ziel am Ende gerecht zu werden,



Schema 25. Totalsynthese von gefaltetem nichtglycosyliertem EPO.

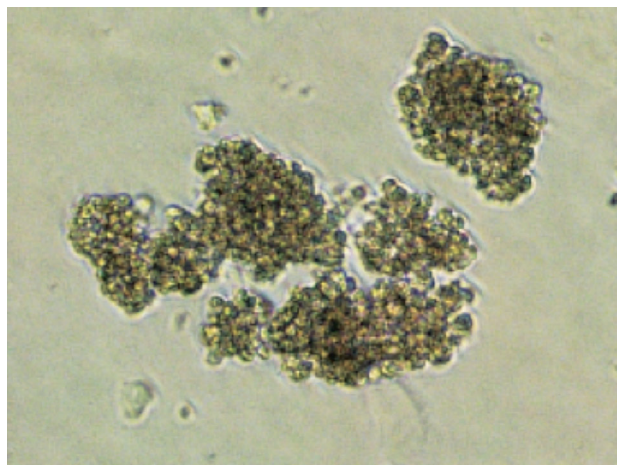


Abbildung 4. Bild einer humanen BFU-E-Kolonie (Erythroid Burst Forming Unit). 60 ng mL⁻¹ synthetisches gefaltetes EPO (109) und 20 ng mL⁻¹ rhKL stimulieren aufgereinigte CD34-Zellen aus Nabelschnurblut, und nach 2 Wochen ist die BFU-E-Kolonie gebildet.

wird es erforderlich sein, eine Bandbreite von N-glycosylierten Derivaten mit variabler Komplexität an den nativen Asparaginstellen zu erzeugen. Drei überaus interessante Fragen könnten sich hierdurch beantworten lassen: Erstens hoffen wir, verlässlichere Informationen über die Auswirkungen einer Glycosylierung auf die EPO-Faltung gewinnen zu können. Zweitens planen wir, die Beziehung zwischen EPO-Glycosylierung und erythropoietischer Aktivität ermitteln zu können. Drittens wollen wir, auch in höheren Organismen, die Auswirkungen von Glycosylierungen auf das Verhalten in vivo untersuchen. Um solche Ziele zu erreichen, wird es nötig sein, unsere Chemie auf anspruchsvollere Glycodomänen auszudehnen. Die Entwicklung in diesem Bereich schreitet voran, und wir sind zuversichtlich, dass sich die oben

vorgestellte Chemie auf komplexere Szenarien erweitern lässt. Trotz der verbleibenden Herausforderungen darf einstweilen gesagt werden, dass schon vieles gelernt wurde.

An dieser Stelle wollen wir das relativ sichere Terrain der Berichterstattung verlassen und uns in die riskantere Dimension der Vorhersage begeben. Aus den oben beschriebenen Synthese-Übungen ziehen wir die Zuversicht, dass die chemische Synthese ein Leistungsniveau erreicht hat, das es ihr ermöglicht, hoch komplexe Strukturen zugänglich zu machen, von denen man bisher glaubte, sie wären nur durch rein biologische Verfahren zugänglich. Für ernsthafte Erwägungen, klassische biologische Verfahren durch chemische Synthesen in kommerziellen Anwendungen abzulösen, ist es aber sicher zu früh. Erstens müssen die Allgemeingültigkeit und Beschränkungen dieser im Rahmen des EPO-Projekts gemachten Fortschritte etabliert werden. Eine Anwendung auf andere komplexe biologische Systeme (Zytokine, Vakzine) wird helfen, die methodischen Beschränkungen abzustechen. Ferner werden sicher Probleme bei der Synthese biologischer Spezies auftauchen, die sich am besten durch eine Kombination beider Herangehensweisen lösen lassen. Zum Beispiel könnte die enzymatisch vermittelte Synthese von Oligosacchariden mit der Aspartylierung und MFD-gestützten NCL kombiniert werden, um homogene, aktivitätsoptimierte Glycopolypeptide zu gewinnen. Die kontinuierliche Erprobung und Verbesserung dieser Methoden wird vernünftige Vorhersagen bezüglich ihrer Kommerzialisierung zulassen.

Wir schließen mit dem Gedanken, dass eine stärkere Beschäftigung mit sprachlichen Aspekten eine verbesserte Synergie zwischen den beiden Grundwissenschaften der Biologie und Chemie bewirken könnte. Beide Kerndisziplinen täten gut daran, sich für die sprachlichen Eigenarten der jeweils anderen Disziplin zu sensibilisieren. Wir hoffen, dass diese Bestandsaufnahme unserer Rückschläge und Erfolge in

der Synthese von EPO^[66] seinen Teil zu diesem Vorhaben beiträgt.

Diese Forschung wurde von den National Institutes of Health (HL25848 an S.J.D.) unterstützt.

Eingegangen am 26. Februar 2013

Online veröffentlicht am 17. Juni 2013

Übersetzt von Dr. Frank Maaß, Weinheim

- [1] Erstes Beispiel einer NCL in der Glycopeptidsynthese: Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684.
- [2] Synthese von Aylmphotactin, einem glycosylierten Chemokin mit C-terminaler Mucin-artiger Domäne: L. A. Marcaurelle, L. S. Mizoue, J. Wilken, L. Oldham, S. B. H. Kent, T. M. Handel, C. R. Bertozzi, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1129.
- [3] Synthese des 76 Aminosäuren langen Chemokins monozytisches chemotaktisches Protein-3: N. Yamamoto, Y. Tanabe, R. Okamoto, P. E. Dawson, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 501.
- [4] Synthese von Ribonuklease C: a) C. Piontek, P. Ring, O. Harjes, C. Heinlein, S. Mezzato, N. Lombana, C. Pöhner, M. Püttner, D. V. Silva, A. Martin, F. X. Schmid, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1968; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1936; b) C. Piontek, D. V. Silva, C. Heinlein, C. Pöhner, S. Mezzato, P. Ring, A. Martin, F. X. Schmid, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1974; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1941.
- [5] Synthese von Gefrierschutzproteinen: B. L. Wilkinson, R. S. Stone, C. J. Capicciotti, M. Thaysen-Andersen, J. M. Matthews, N. H. Packer, R. N. Ben, R. J. Payne, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3666; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3606.
- [6] Synthese von Interferon- β : I. Sakamoto, K. Tezuka, K. Fukae, K. Ishii, K. Taduru, M. Maeda, M. Ouchi, K. Yoshida, Y. Nambu, J. Igarashi, N. Hayashi, T. Tsuji, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5428.
- [7] Allgemeine Übersichten zu EPO: a) S. Elliott, M. A. Foote, G. Molineux, *Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis*, 2nd ed., Birkhäuser, Boston, **2009**; b) A. J. Sytkowski, *Erythropoietin*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**; c) J. Szenajch, G. Wcislo, J.-Y. Jeong, C. Szczalik, L. Feldman, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2010**, *1806*, 82.
- [8] a) M. Higuchi, M. Oh-eda, H. Kuboniwa, K. Tomonoh, Y. Shimomaka, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 7703; b) J. C. Egrie, J. R. Grant, D. K. Gillies, K. H. Aoki, T. W. Strickland, *Glycoconjugate J.* **1993**, *10*, 263.
- [9] a) R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631; b) J. Roth, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 285; c) P. M. Rudd, R. A. Dwek, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *32*, 1.
- [10] D. Macmillan, R. M. Bill, K. A. Sage, D. Fern, S. L. Flitsch, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 133.
- [11] G. G. Kochendoerfer, S.-Y. Chen, F. Mao, S. Cressman, S. Traviglia, H. Shao, C. L. Hunter, D. W. Low, E. N. Cagle, M. Carnevali, V. Gueriguan, P. J. Keogh, H. Porter, S. M. Stratton, M. C. Wiedeke, J. Wilken, J. Tang, J. J. Levy, L. P. Miranda, M. M. Crnogorac, S. Kalbag, P. Botti, J. Schindler-Horvat, L. Savatski, J. W. Adamson, A. Kung, S. B. H. Kent, J. A. Bradburne, *Science* **2003**, *299*, 884.
- [12] S. Liu, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1017; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 993.
- [13] J. P. Richardson, D. Macmillan, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3977.
- [14] K. Hirano, D. Macmillan, K. Tezuka, T. Tsuji, Y. Kajihara, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9721; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9557.
- [15] M. Murakami, R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3627; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3567.
- [16] P. Wang, S. Dong, J. A. Brailsford, K. Iyer, S. D. Townsend, Q. Zhang, R. C. Hendrickson, J. H. Shieh, M. A. S. Moore, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11744; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11576.
- [17] C. Kan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 9047.
- [18] a) S. Shang, Z. Tan, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4297; b) S. Dong, S. Shang, J. Li, Z. Tan, T. Dean, A. Maeda, T. J. Gardella, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15122.
- [19] J. Li, S. Dong, S. D. Townsend, T. Dean, T. J. Gardella, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12429; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12263.
- [20] a) P. Nagorny, N. Sane, B. Fasching, B. Aussedat, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 999; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 975; b) B. Aussedat, B. Fasching, E. Johnston, N. Sane, P. Nagorny, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3532.
- [21] S. J. Danishefsky, M. T. Bilodeau, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1482; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1380.
- [22] J. S. Miller, V. Y. Dudkin, G. J. Lyon, T. W. Muir, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 447; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 431.
- [23] L. M. Likhoshervstov, O. S. Novikova, V. A. Derevitskaja, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* **1986**, *146*, C1.
- [24] a) S. T. Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5560; b) S. T. Cohen-Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10531.
- [25] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.
- [26] J. D. Warren, J. S. Miller, S. J. Keding, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6576.
- [27] J. Chen, J. D. Warren, B. Wu, G. Chen, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1969.
- [28] G. Chen, J. D. Warren, J. Chen, B. Wu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7460.
- [29] B. Wu, Z. Hua, J. D. Warren, K. Ranganathan, Q. Wan, G. Chen, Z. Tan, J. Chen, A. Endo, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5577.
- [30] B. Wu, Z. Tan, G. Chen, J. Chen, Z. Hua, Q. Wan, K. Ranganathan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8009.
- [31] a) L. E. Canne, S. J. Bark, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5891; b) D. W. Low, M. G. Hill, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, P. Botti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6554.
- [32] J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4642.
- [33] 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.
- [34] J. Chen, G. Chen, B. Wu, Q. Wan, Z. Tan, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8013.
- [35] Ein neuerer Übersichtsartikel: L. Raibaut, N. Ollivier, O. Melnyk, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7001.
- [36] D. Bang, S. B. Kent, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2588; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534.
- [37] B. Wu, J. D. Warren, J. Chen, G. Chen, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5219.
- [38] a) J. Blake, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1981**, *17*, 273–274; b) S. Aimoto, N. Mizoguchi, H. Hojo, S. Yoshimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 524–531; c) S. Aimoto, *Biopolymers* **1999**, *51*, 247–265.
- [39] G. Chen, Q. Wan, Z. Tan, C. Kan, Z. Hua, K. Ranganathan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7527; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7383.
- [40] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248.
- [41] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526.

- [42] C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6912; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6807.
- [43] K. S. Ajish Kumar, M. Haj-Yahya, D. Olschewski, H. A. Lashuel, A. Brik, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8234; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8090.
- [44] S. N. Bavikar, L. Spasser, M. Haj-Yahya, S. V. Karthikeyan, T. Moyal, K. S. A. Kumar, A. Brik, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 782; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 758.
- [45] B. Fierz, S. Kilic, A. R. Hieb, K. Luger, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19548.
- [46] J. Chen, Q. Wan, Y. Yuan, J. L. Zhu, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8649; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8521.
- [47] J. Chen, P. Wang, J. Zhu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2009**, *66*, 2277.
- [48] Z. Tan, S. Shang, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9690; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9500.
- [49] S. Shang, Z. Tan, S. Dong, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10784.
- [50] D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10064.
- [51] R. Yang, K. K. Pasunooti, F. Li, X.-W. Liu, C.-F. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13592.
- [52] Z. Harpaz, P. Siman, K. S. A. Kumar, A. Brik, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1232.
- [53] P. Siman, S. V. Karthikeyan, A. Brik, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1520.
- [54] L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 559.
- [55] Z. Tan, S. Shang, T. Halkina, Y. Yuan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5424.
- [56] Y. Yuan, J. Chen, Q. Wan, Z. Tan, G. Chen, C. Kan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5432.
- [57] C. Kan, J. D. Trzupke, B. Wu, Q. Wan, G. Chen, Z. Tan, Y. Yuan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5438.
- [58] S. Dong, S. Shang, Z. Tan, S. J. Danishefsky, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 968.
- [59] a) M. Bodanszky, J. C. Tolle, S. S. Deshmane, A. Bodanszky, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *12*, 57; b) M. Bodanszky, G. F. Sigler, A. Bodanszky, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2352.
- [60] F. García-Martín, P. White, R. Steinauer, S. Côté, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Biopolymers* **2006**, *84*, 566.
- [61] P. Wang, B. Aussedat, Y. Vohra, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11739; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11571.
- [62] V. Ullmann, M. Radisch, I. Boos, J. Freund, C. Pohner, S. Schwarzing, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11734; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11566.
- [63] D. Bang, N. Chopra, S. B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1377.
- [64] a) D. Bang, B. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4089; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3985; mechanistische Studien: b) E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640.
- [65] J. A. Brailsford, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 7196.
- [66] Natürlich entwickelten wir während unserer Studien auch großes Interesse an einer Klasse kleiner Moleküle, den Epothilonen. Um Verwechslungen möglichst zu vermeiden, verwendeten wir die unterschiedlichen Kürzel EPO und Epo. Die Arbeiten an dieser Verbindungsklasse führten schließlich zu den nichtnatürlichen Molekülen Fludelon und Isofludelon. Letzteres befindet sich gegenwärtig in klinisch-onkologischen Test. Siehe: a) A. Rivkin, T.-C. Chou, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2898; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2838; b) 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.