

Ein PEGyliertes, lichtspaltbares Auxiliar für die sequenzielle enzymatische Glykosylierung und native chemische Ligation von Peptiden**

Claudia Bello, Shuo Wang, Lu Meng, Kelley W. Moremen und Christian F. W. Becker*

Abstract: Unser Verständnis der spezifischen biologischen Funktion von Proteinglykosylierungsmustern würde sehr von zusätzlichen Methoden profitieren, die einen direkten Zugang zu homogenen Glykoproteinen ermöglichen. Hier wird die Entwicklung und Anwendung einer effizienten Methode für die Synthese komplexer, homogen glykosylierter Peptide, basierend auf einem multifunktionellen, lichtspaltbaren Auxiliar, beschrieben. Der Einbau eines PEG-Polymers ins Auxiliar ermöglicht die sequenzielle enzymatische Glykosylierung und einfache Isolierung in sehr guten Ausbeuten. Die modifizierten Peptide können mit Peptidthioestern, die durch direkte Hydrazinolyse und Oxidation der zugehörigen glykosylierten Peptidharze erhalten werden, direkt nativ chemisch ligiert werden. Die ligierten Glykopeptide lassen sich durch UV-Bestrahlung unter milden Bedingungen entschützen. Die Methode wird für die Synthese von Varianten des Tumormarkers MUC1 mit einem oder mehreren Tn-, T- oder Sialyl-T-Antigenen verwendet.

Posttranslationale Modifikationen (PTMs) beeinflussen die Faltung und Aktivität vieler Proteine. Ihre Fehlregulation ist oft an der Entstehung und dem Fortschreiten schwerer Krankheiten beteiligt.^[1] Obwohl sich unser Verständnis der Modifikation von Proteinen mit Kohlenhydraten in den letzten Jahren deutlich verbessert hat,^[2] wozu neue Synthesewege, sowohl mithilfe hochentwickelter chemischer Methoden^[3] als auch durch die Kombination präparativer und enzymatischer Ansätze,^[4] beigetragen haben, bleiben detaillierte Einblicke in diese Klasse der PTMs wegen ihrer Komplexität und Heterogenität weiterhin eine Herausforderung. Kürzlich haben wir eine effiziente Methode zur Herstellung von ortsspezifisch O-glykosylierten Mucin-1(MUC1)-Polypeptiden vorgestellt,^[5] wobei ein monodisperses PEG-Poly-

mer am N-Terminus der Peptide eine quantitative enzymatische Glykosylierung in Lösung und anschließende Gewinnung der modifizierten Peptide durch einfache Gelpermeationschromatographie (GPC), ohne aufwendige Reinigungsschritte, ermöglicht. Diese Methode liefert hohe Ausbeuten und ist vielseitig anwendbar. Durch die direkte Verbindung mit der nativen chemischen Ligation (NCL) können längere, ortsspezifisch modifizierte O-glykosylierte Peptide erhalten werden.

Jedoch verlangt dabei die proteolytische Entfernung des Polymers den Einbau einer aus sechs Aminosäuren bestehenden Proteaseschnittstelle sowie eines nichtnativen Cysteinrests zur Durchführung der NCL-Reaktion. Um diese Einschränkungen zu umgehen, kombinierten wir nun diese beiden Funktionalitäten (PEG-Einbau^[6] und Thiolgruppe für die NCL^[7]) in einem lichtspaltbaren Auxiliar, das auf einem 1-Nitrophenyl-2-sulfanylethyl-Gerüst beruht, wie es bereits von den Gruppen von Aimoto^[8] und Dawson^[9] beschrieben worden ist. Nach der photolytischen Entfernung des Auxiliars bleibt ein natives Glycin an der Ligationsstelle zurück. Die milden Entschützungsbedingungen, in Kombination mit dem häufigen Vorkommen von Glycin in Proteinen, haben bereits zu mehreren Anwendungen in Protein(semi)synthesen geführt.^[10] Im Folgenden stellen wir die Synthese und Anwendung eines lichtspaltbaren Auxiliars vor, das die Anbindung eines PEG-Polymers für effiziente enzymatische Glykosylierungen ermöglicht, die funktionellen Gruppen für NCL-Reaktionen bereitstellt und durch UV-Bestrahlung vollständig entfernt werden kann (Schema 1).

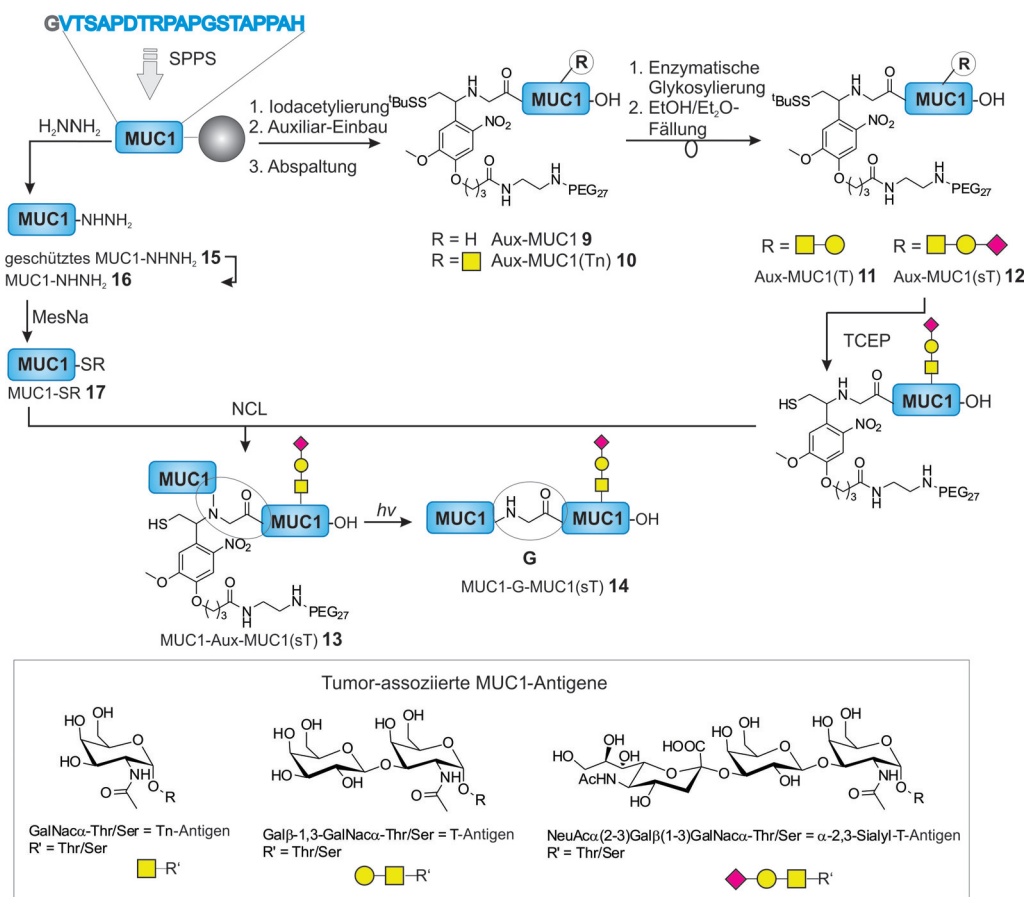
Die Synthese des Auxiliars (siehe Schema S1 in den Hintergrundinformationen, auch für die mit Nummern versehenen Verbindungen) nutzte zu Beginn die von Dawson et al. entwickelte Methode.^[9] Ausgehend von Vanillin (**1**) wurden die gewünschten Methylbutanoat-, Nitro- und Methylengruppen eingeführt (**2**). Die nachfolgend vorgesehene Sharpless-Aminohydroxylierung^[11] war, selbst unter verschiedensten Bedingungen, ineffizient. Daher wurde eine schrittweise Strategie entwickelt, die mit der Sharpless-Dihydroxylierung^[12] begann, um das Diol **3** zu erhalten, das dann in vier Schritten und mit 63% Ausbeute in den entsprechenden Aminoalkohol **4** umgewandelt wurde.^[13] Die Mitsunobu-Reaktion,^[14] gefolgt vom Schutzgruppentausch (Acetyl zu *tert*-Butylsulfanyl),^[15] generierte die für NCL-Reaktionen erforderliche geschützte Sulfanylaminoethylgruppe (**5**). Ein katalytischer Ester-Amid-Austausch^[16] führte die Verknüpfungsstelle für das PEG-Polymer – und potenziell für andere Modifikationen – ein (**6**). Abschließende PEGylierung des freien primären Amins, Entfernung der Boc-Gruppe und Reinigung lieferten das gewünschte Auxiliar **7** in 68% Ausbeute über die letzten zwei Schritte.

[*] Dr. C. Bello, Prof. Dr. C. F. W. Becker
Fakultät Chemie, Institut für Biologische Chemie
Universität Wien
Währinger Straße 38, 1090 Wien (Österreich)
E-Mail: christian.becker@univie.ac.at

Dr. S. Wang, Dr. L. Meng, Prof. Dr. K. W. Moremen
Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia,
Athens (USA)

[**] Wir danken K. Farbiarz und I. Saccone für Hilfe bei der Auxiliarsynthese, E. Giménez-Lopez und dem MS-Zentrum der Fakultät Chemie der Universität Wien für Hilfe bei der Analyse von Verbindungen sowie M. Arndt, L. Mairhofer und J. Cotter für Hilfe mit den Laser-Experimenten. C.B. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung und K.W.M. den National Institutes of Health für finanzielle Unterstützung (P41GM103390 und P01GM107012).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201501517> zu finden.



Schema 1. Die Auxiliar-vermittelte chemoenzymatische Glykosylierungsmethode. Die SPPS eines 20meren MUC1-Pepts mit einem PEGylierten Auxiliar ist die Basis für konsekutive Glykosylierungs- und Präzipitationsschritte (rechts). Die gleichen Peptidvorläufer können in Peptidhydrazide und nachfolgend in Peptidthioester umgewandelt werden (links). Beide Peptide werden in Ligationsreaktionen verwendet, um erweiterte glykosylierte MUC1-Repeats zu erhalten.

Als Nächstes untersuchten wir den Einbau des Auxiliars in das MUC1-Peptid durch Ersetzen des nativen N-terminalen Glycinrests (Schema 1). Das MUC1-Tandem-Repeat-Peptid wurde durch Fmoc-basierte Festphasensynthese (SPPS) hergestellt und der N-Terminus mit Iodessigsäure modifiziert (analytische Daten in Abbildung S3) und anschließend in einer S_N2-Reaktion mit dem Auxiliar 7 umgesetzt. Dabei wurde unter allen getesteten Bedingungen, inklusive Reaktionszeiten über mehrere Tage, nur wenig Produkt erhalten.

Um diesen kritischen Schritt zu verbessern, wurde die Synthese des MUC1-Pepts auf TentaGel-Harz wiederholt, wobei die niedrigere Peptidbeladung und die besseren Quelleigenschaften im Vergleich zum zuvor verwendeten Wang-PS-Harz vorteilhaft für die Kupplung des Auxiliars sein sollten. Eine mögliche sterische Hinderung durch die PEG-Kette während der Substitutionsreaktion wurde dadurch reduziert, dass das Auxiliar 8, das anders als 7 keine PEG-Seitenkette enthält, erst eingeführt und danach am Peptidharz PEGyliert wurde. Die Auxiliarsynthese wurde durch Einführen einer Fmoc-Schutzgruppe am primären Amin entsprechend modifiziert (Schritt m in Schema S1). Die S_N2-Reaktion des Auxiliars 8 mit iodacetyliertem MUC1-Peptid-

(Wang-TentaGel)-Harz verlief sehr gut (Abbildung S5), und die anschließende PEGylierung auf dem Harz war quantitativ. Nach Spaltung und Reinigung wurde das reine MUC1-Auxiliar-Konjugat Aux-MUC1 (9; Schema 1 und Abbildung S7) in 34 % Ausbeute erhalten.

Diese Strategie wurde für die Herstellung eines MUC1-Auxiliar-Konjugats mit dem Tn-Antigen (GalNAc α 1-O-Thr) an Position 14 (Aux-MUC1(Tn) (10)) genutzt. Der Fmoc-Thr(GalNAc-Ac₃)-OH-Baustein ermöglichte die genaue Kontrolle der O-Glykosylierungsstelle, wobei alternativ auch die *Drosophila*-Polypeptid-GalNAc-Transferase 1 (dGalNAcT1) zur ortsspezifischen Generierung des Tn-Antigens verwendet werden kann.^[5] Das Konjugat 10 (siehe auch Abbildung S8) wurde nach Iodacetylierung, Anbinden des Auxiliars, Spaltung vom Harz und Hydrazinolyse der Acetylenschutzgruppen des Zuckers in 4 % Gesamtausbeute (basierend auf dem Synthesemaßstab) erhalten.

Beim ersten Versuch, 10 zu synthetisieren, wurde das GalNAc-Entschützen am Harz über Nacht mit 5 % (v/v) Hydrazinmonohydrat in Methanol durchgeführt. Überraschenderweise wurden dabei nicht nur die Acetylgruppen abgespalten, sondern das Peptid wurde vollständig vom Wang-TentaGel-Harz abgelöst. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Hydrazin durch nukleophilen Angriff auf den Linker das geschützte Peptid unter Freisetzung eines Peptidhydrazids quantitativ vom Harz abspaltet.^[17,18] Diese auf den ersten Blick unerwünschte Reaktion bei der Herstellung von 10 ermöglichte durch Verknüpfung mit der effizienten Umwandlung von Peptidhydraziden in die entsprechenden Peptidthioester^[19] die Synthese größerer MUC1-Segmente durch sequenzielle NCL-Reaktionen mit Auxiliar- und Hydrazid-modifizierten MUC1-Peptiden. Um die Vorteile solcher difunktioneller MUC1-Peptide vollständig nutzen zu können, musste gezeigt werden, dass MUC1-NHNH₂ (16; Schema 1) effizient in den entsprechenden Thioester 17 umgewandelt werden kann und dass die chemoenzymatische Glykosylierung von Aux-MUC1(Tn)NHNH₂ (19; Abbil-

dung 2) funktioniert. Aus früheren Versuchen war bekannt, dass Peptidthioester unter den verwendeten Glykosylierungsbedingungen schnell hydrolysiert werden. Peptidhydrazide, die unter den Glykosylierungsbedingungen deutlich stabiler sind, als Vorläufer eines Peptidthioester sollten jedoch die sequenzielle enzymatische Glykosylierung und nachfolgende Verknüpfung glykosylierter Peptide mittels NCL ermöglichen. Darüber hinaus bietet damit das gleiche Peptidharz den Zugang zur Peptidsäure und zum Peptidhydrazid.

Um die Umwandlung von MUC1-NHNH₂ (**16**) in den MUC1-Thioester **17** zu testen, wurde das MUC1-Peptid-Harz über Nacht mit 5 % (v/v) Hydrazinmonohydrat in Methanol inkubiert. MUC1-NHNH₂ (**15**) wurde in 85 % Gesamtausbeute erhalten, und die Behandlung in Lösung mit einer TFA/TIS/H₂O-Mischung (92.5:5:2.5) führte zum gewünschten, vollständig entschützten **16** (Abbildung S9). Umsetzung mit NaNO₂ und anschließende Zugabe von MesNa lieferten den Thioester **17** (Abbildung S10), der nach HPLC-Reinigung in 14 % Gesamtausbeute erhalten wurde.

In einem nächsten Schritt konnten wir zeigen, dass das PEGylierte Auxiliar tatsächlich eine schnelle enzymatische Glykosylierung der MUC1-Peptide ermöglichte, ähnlich wie es schon für das N-terminal PEGylierte MUC1 beschrieben wurde.^[5] Die Glykosylierung von Aux-MUC1(Tn) (**10**) mit der humanen Transferase C1GalT1 ergab Aux-MUC1(T) (**11**) mit dem T-Antigen (Galβ1-3GalNAcα an Thr14) in exzellenter Ausbeute (Abbildung 1 und Abbildungen S12A,B). Inkubation mit einer Mischung aus Ethanol und Diethylether bei –80 °C induzierte das Ausfällen von **11**, das dann durch Zentrifugieren in 95 % Ausbeute gewonnen (Abbildung 1 und Abbildung S12B) und direkt für den nächsten Glykosylierungsschritt verwendet wurde. Die Inkubation von **11** mit CMP-Neu5Ac in Gegenwart der rekombinanten Transferase ST3Gal1 ermöglichte eine effiziente Verlängerung des Disaccharids zum Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcα-Trisaccharid und ergab Aux-MUC1(sT) (**12**) mit dem Sialyl-T-Antigen in 90 % Ausbeute (Abbildung 1 und Abbildung S12B). Mit ähnlichen Bedingungen für alle Glykosylierungsreaktionen, aber längerer Inkubation mit dem Ethanol/Ether-Gemisch bei –80 °C (6–12 h statt 4 h) gelang es, die sequenzielle Glykosylierung weiter zu vereinfachen, da auf die Spin-SäulengPC verzichtet werden konnte. Als Kontrollversuch wurde MUC1(Tn) ohne N-terminales Auxiliar und PEG eingesetzt. Dabei konnten nach der enzymatischen Glykosylierung nur 27 % an MUC1(T) isoliert werden, was die Vorteile der PEGylierung klar aufzeigt (Abbildung S12C).

Um alle Vorteile des Auxiliars zu demonstrieren, wurden die glykosylierten Peptidkonjugate mittels NCL mit MUC1-SR (**17**) verknüpft. Nichtglykosyliertes Aux-MUC1 (**9**) wurde verwendet, um optimale Ligationsbedingungen zu finden. Die Thiolgruppe des Auxiliars wurde vor der Zugabe von **17** durch 6 h Inkubation mit TCEP bei 24 °C entschützt. Die optimierten NCL-Bedingungen für MUC1-Peptide (65 % Umsatz zum Ligationsprodukt nach zwei Tagen) basieren auf einem NaPi-Puffer (pH 7.5) bei 30 °C mit Aux-MUC1 (**9**) in einer Konzentration von 8 mM und 2.5-fachem Überschuss an Thioester **17** (Abbildung S15A). Diese Bedingungen wurden für die Synthese des glykosylierten MUC1-Aux-MUC1(Tn)

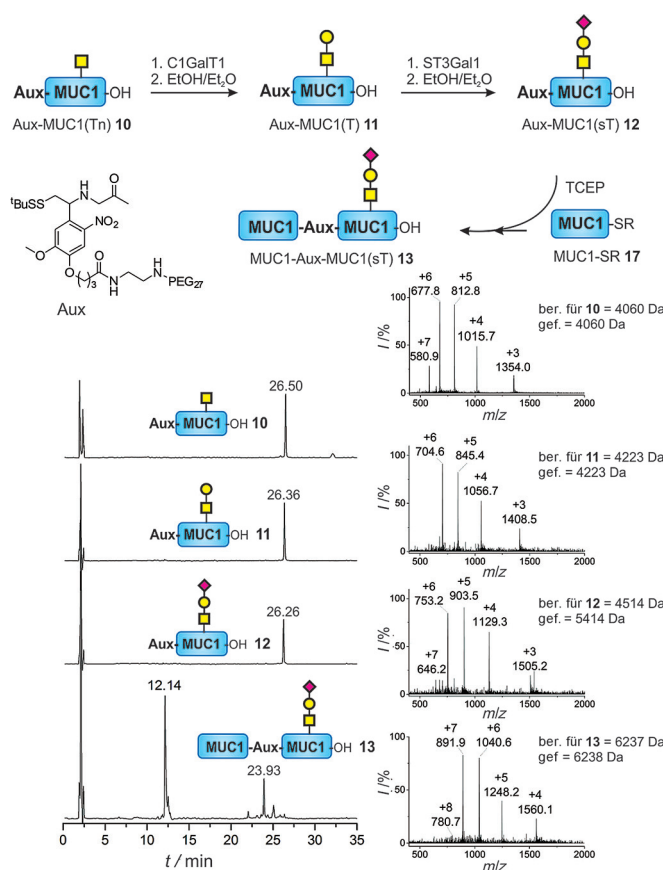


Abbildung 1. Oben: Sequenzielle enzymatische Glykosylierung von **10** zu **11** und **12** als Ausgangsverbindungen für NCL-Reaktionen mit **17**. MUC1: Tandem-Repeat-Sequenz des Mucins 1 VTSAPDTRPAGSTAPAH; die O-Glykane auf der Thr14-Seitenkette sind in Klammern angegeben. Tn: GalNAcα, T: Galβ1-3GalNAcα, sT: Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcα. Unten links: HPLC-Chromatogramme nach Präzipitation und der NCL-Reaktion nach 24 h. Injektionspeak bei 2 min; Peak bei 12.14 min: Peptidthioester **17**. Unten rechts: ESI-Massenspektren.

(**18**) verwendet, das ausgehend von **17** und **10** in 78 % Ausbeute nach 36 h Inkubation bei 30 °C erhalten wurde (Abbildung S15B).

Nachdem die einzelnen Funktionen des Auxiliars in MUC1-Peptiden gezeigt werden konnten, koppelten wir die Glykosylierungs- und die NCL-Reaktion in einer sequenziellen enzymatischen Glykosylierung von Aux-MUC1(Tn) (**10**) zum sialylierten core 1 enthaltenden Konjugat Aux-MUC1(sT) (**12**), das durch Präzipitation isoliert und direkt in einer Ligationsreaktion mit **17** verwendet wurde. In diesem Fall war mehrmals die Zugabe von TCEP erforderlich, um die *tert*-Butylsulfanylgruppe vollständig vom Auxiliar zu entfernen (Abbildung S15C). Die Zugabe von **17** und MesNa zur Ligationsmischung führte nach einem Tag in 70 % Ausbeute zum gewünschten Produkt **13** (Abbildung 1).

Schließlich wurde sowohl beim nichtglykosylierten MUC1-Aux-MUC1 als auch bei **13** und **18** das PEGylierte Auxiliar lichtinduziert abgespalten, und zwar durch UV-Bestrahlung des Ligationsgemischs in Wasser oder in einer Wasser/Acetonitril-Mischung. In allen Fällen wurde nach 30 Minuten Bestrahlung mit einer UV-A-Lampe kein Edukt

mehr detektiert. Gleichzeitig wurde das gewünschte Produkt gebildet, welches mittels HPLC isoliert wurde (Abbildungen S16–S18).

Wie bereits oben beschrieben sind Peptidhydrazide nützliche und unter den verwendeten Glykosylierungsbedingungen stabile Vorstufen für die selbst schnell hydrolysierenden Peptidthioester. Die hydrazininduzierte Spaltung des Aux-MUC1(Tn)-Peptidharzes lieferte geschütztes Aux-MUC1(Tn)-NHNH₂ (**19**; Abbildung S11A), das nach saurem Entschützen in Lösung erfolgreich in sequenziellen Glykosylierungsreaktionen verwendet wurde, wobei das entsprechende Hydrazid Aux-MUC1(sT)-NHNH₂ (**21**) in Ausbeuten ähnlich denen an **12** erhalten wurde (Abbildung 2).

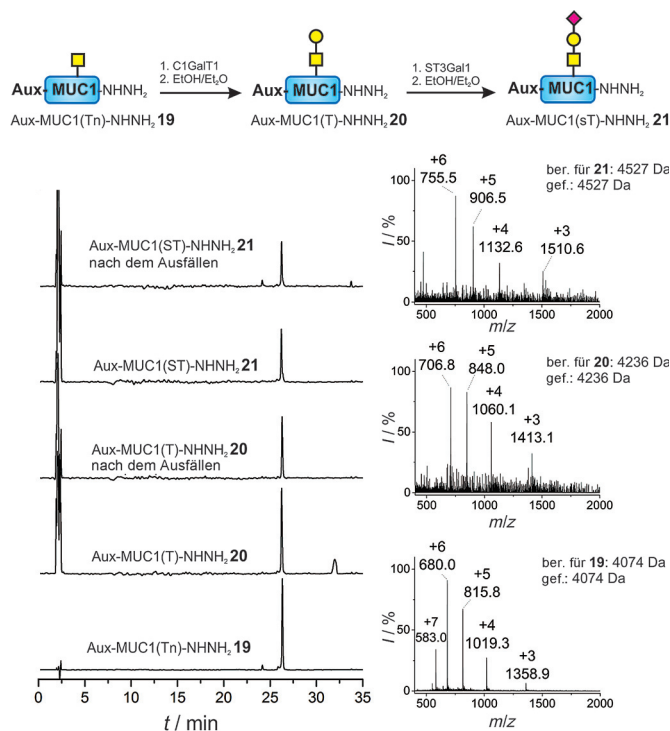


Abbildung 2. Sequenzielle enzymatische Glykosylierung von **19**, einer Vorstufe für glykosylierte Peptidthioester, und die entsprechenden ESI-Massenspektren.

Die Behandlung mit NaNO₂, Ascorbinsäure (um Nitrosaminbildung am Auxiliar zu unterdrücken) und MesNa führte zum gewünschten Thioester Aux-MUC1(sT)-SR (**22**) in 63 % Ausbeute (siehe die Hintergrundinformationen).

Um das Potenzial dieses Ansatzes weiter zu untersuchen, wurde ein völlig ungeschütztes Konjugat aus zwei glykosylierten MUC1-Peptiden synthetisiert (Abbildung 3). Dafür wurde ein MUC1-Peptid mit einem Tn-Antigen an Position 7 (**23**) hergestellt und in den entsprechenden Thioester überführt. Hydrazinspaltung, Entschützen, Behandlung mit NaNO₂ und MesNa lieferten reibungslos das gewünschte Peptid MUC1(Tn⁷)-SR (**24**; Abbildung S20) in 43 % Ausbeute. Dieses wurde in einer NCL-Reaktion mit **10** in 35 % Ausbeute zu **25** (Abbildung S21) umgesetzt.

Die Glykosylierung und Präzipitation von **25** führte zu MUC1(T⁷)-Aux-MUC1(T) (**26**; Abbildung 3 und S22), das aus zwei MUC1-Tandem-Repeats mit einem T-Antigen an verschiedenen Positionen besteht. Dieses viel längere Peptid mit nur einem Auxiliar in der Mitte wurde effizient durch Präzipitation unter ähnlichen Bedingungen wie oben beschrieben isoliert (80 %). Anschließend wurde es 6 min bei 365 nm bestrahlt, und das gewünschte **27** wurde in 53 % Ausbeute erhalten. Das Konjugat **26** wurde in einem weiteren Glykosylierungs-Präzipitations-Schritt in das sialylierte **28** überführt (68 % isoliert; Abbildung 3 und S23). UV-Bestrahlung entfernte das Auxiliar, und reines MUC1(sT⁷)-G-MUC1(sT) (**29**) wurde in 12 % Ausbeute nach HPLC-Reinigung erhalten (Abbildung 3). Die beschriebenen Ergebnisse zeigen die Möglichkeiten dieser Methode für die chemoenzymatische Synthese glykosylierter Peptide sowie das Potenzial zur Kombination mit NCL, um größere Polypeptide mit unterschiedlichen, aber spezifischen Glykosylierungsmustern zu erhalten.

Das hier vorgestellte PEGylierte Ligationsauxiliar ermöglicht die sequenzielle quantitative enzymatische Glykosylierung von Peptiden in Lösung ohne aufwendige chromatographische Reinigungsschritte, und es vermittelt spurlose NCL-Reaktionen. Die Auxiliar-modifizierten (und glykosylierten) Peptide können in NCL-Reaktionen mit anderen MUC1-Tandem-Repeat-Peptiden, die einen C-terminalen Thioester tragen, verwendet werden. Alle hier eingesetzten Peptidthioester wurden durch Hydrazinolyse und Oxidation der gebildeten Hydrazide erhalten. Die mit ihnen durchgeführten NCL-Reaktionen ergaben Ausbeuten > 65 %, und das Auxiliar ließ sich sauber von den Ligationsprodukten entfernen. Die lichtinduzierte Abspaltung des Auxiliars hinterlässt einen Glycinrest an der Ligationsstelle, was diese Methode auf die Verwendung an Positionen mit natürlichen Glycinresten, die glücklicherweise häufig in Proteinen vorkommen, beschränkt. Die Kombination des neuen PEGylierten Auxiliars mit der Synthese von Peptidthioestern durch Hydrazinolyse ermöglicht die direkte Herstellung ortsspezifisch O-glykosylierter Peptidthioester, wodurch sich neue Wege zur Synthese von Polypeptiden mit zwei oder mehr MUC1-Tandem-Repeats mit unterschiedlichen Glykosylierungsmustern eröffnen. Das Steuern der Bildung des Thioesters und des Entschützens der Thiolgruppe im Auxiliar ermöglicht auch die gezielte Verlängerung jedes Peptidbausteins in C- und N-terminale Richtung. Wir werden diese Methode nutzen, um eine Bibliothek ortsspezifisch O-glykosylierter MUC1-Varianten mit unterschiedlichen Glykosylierungsmustern zu synthetisieren, um diese für eine detaillierte Untersuchung dieser Muster in der MUC1-Funktion einzusetzen.

Die Methode ist nicht auf die Synthese glykosylierter MUC1-Analoga beschränkt, sondern sie kann auch für die Synthese vieler größerer, posttranslational modifizierter Proteine verwendet werden. Einschränkungen ergeben sich nur durch die Identifizierung eines passenden Glycinrests für die Positionierung des Auxiliars und die Verfügbarkeit passender Chemie oder Enzyme für die Einführung der gewünschten PTMs.

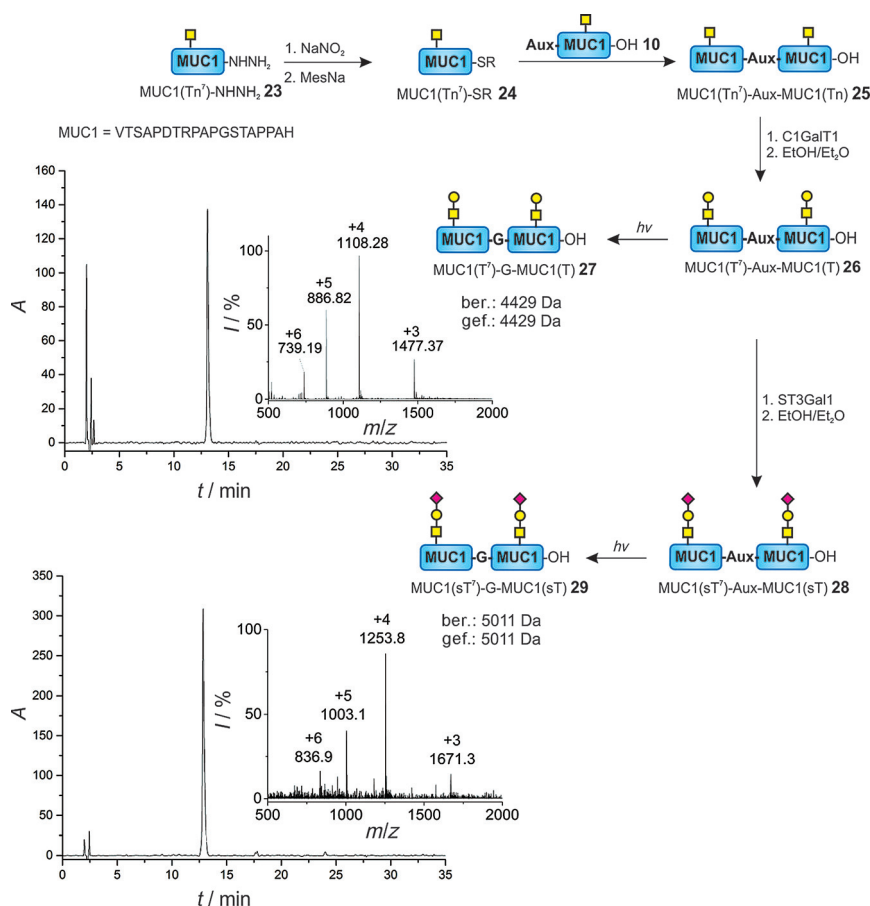


Abbildung 3. Synthese der ungeschützten glykosylierten Peptide **27** und **29** durch NCL, Glykosylierung und UV-Bestrahlung und ihre HPLC-Chromatogramme und Massenspektren.

Stichwörter: Bioorganische Chemie ·

Chemoenzymatische Glykosylierungen · PEGylierungen ·
Photospaltbare Ligationsauxiliare · Proteinmodifikationen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7711–7715
Angew. Chem. **2015**, *127*, 7823–7828

- [1] C. J. Vidal, *Post-Translational Modifications in Health and Disease*, Springer, Heidelberg, **2010**.
- [2] a) C. I. Crucho, P. Correia-da-Silva, K. T. Petrova, M. T. Barros, *Carbohydr. Res.* **2015**, *402C*, 124–132; b) R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 92–99; c) L. X. Wang, M. N. Amin, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 51–66; d) D. C. Kennedy, D. Gruenstein, C.-H. Lai, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 3794–3800; e) U. Westerlind, H. Kunz, *Amino Acids Pept. Proteins Org. Chem.* **2011**, *4*, 321–358; f) Y. Yuan, J. Chen, Q. Wan, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Biopolymers* **2010**, *94*, 373–384; g) G. J. Bernardes, B. Castagner, P. H. Seeberger, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 703–713; h) L. X. Wang, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1509–1522; i) M. J. Grogan, M. R. Pratt, L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 593–634; j) B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579–602.
- [3] a) M. Hurevich, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1851–1853; b) G. V. M. Sharma, K. Rajender, G. Sridhar, P. S. Reddy, M. Kanakaraju, *Carbohydr. Res.* **2014**, *388*, 8–18; c) C. Li, Z. Zhang, Q. Duan, X. Li, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3008–3011; d) A. Reif, S. Siebenhaar, A. Tröster, M. Schmälzlein, C. Lech-

- ner, P. Velisetty, K. Gottwald, C. Pöhner, I. Boos, V. Schubert, S. Rose-John, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12125–12131; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12321–12327; e) O. Calin, S. Eller, H. S. Hahm, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 3995–4002; f) J. Etchebarria, S. Serna, A. Belouqui, M. Martin-Lomas, N.-C. Reichardt, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4776–4785; g) F. Wojcik, A. G. O'Brien, S. Goetze, P. H. Seeberger, L. Hartmann, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 3090–3098; h) L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 559–563; i) F. J. Lopez-Jaramillo, M. Ortega-Muñoz, A. Megia-Fernandez, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 846–855; j) O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, M. Fernández-González, D. C. Anthony, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1432–1436; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1461–1465; k) P. Wang, S. Dong, J. A. Brailsford, K. Iyer, S. D. Townsend, Q. Zhang, R. C. Hendrickson, J. Shieh, M. A. Moore, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11576–11584; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11744–11752; l) S.-H. Yu, M. Boyce, A. M. Wands, M. R. Bond, C. R. Bertozzi, J. J. Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 4834–4839; m) J. E. Hudak, H. H. Yu, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16127–16135; n) K. Godula, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9963–9965; o) C. Piontek, D. Varon Silva, C. Heinlein, C. Pöhner, S. Mezzato, P. Ring, A. Martin, F. X. Schmid, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1941–1945; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1974–1978.
- [4] a) X. Li, T. Fang, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7179–7182; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7307–7310; b) J. Orwenyo, W. Huang, L.-X. Wang, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4768–4777; c) N. E. Mbua, X. Li, H. R. Flanagan-Steet, L. Meng, K. Aoki, K. W. Moremen, M. A. Wolfert, R. Steet, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13012–13015; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 13250–13253; d) R. Sardzik, A. P. Green, N. Laurent, P. Both, C. Fontana, J. Voglmeir, M. J. Weissenborn, R. Haddoub, P. Grassi, S. M. Haslam, G. Widmalm, S. L. Flitsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4521–4524; e) F. Schwarz, W. Huang, C. Li, B. L. Schulz, C. Lizak, A. Palumbo, S. Numao, D. Neri, M. Aebi, L. X. Wang, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 264–266.
 - [5] a) C. Bello, K. Farbiarz, J. F. Moeller, C. F. W. Becker, T. Schwientek, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1634–1641; b) C. Becker, T. Schwientek, WO 2012139777 (A1), **2012**.
 - [6] a) C. C. Tzschucke, C. Markert, W. Bannwarth, S. Roller, A. Hebel, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3964–4000; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4136–4173; b) T. J. Dickerson, N. N. Reed, K. D. Janda, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3325–3343; c) M. Hori, K. D. Janda, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 889–894; d) X.-y. Zhao, W. A. Metz, F. Sieber, K. D. Janda, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8433–8436; e) H. Han, M. M. Wolfe, S. Brenner, K. D. Janda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6419–6423; f) F.-S. Tjoeng, E. K. Tong, R. S. Hodges, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4190–4194; g) E. Bayer, M. Mutter, *Nature* **1972**, *237*, 512–513.
 - [7] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.

- [8] T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 6059–6061.
- [9] C. Marinzi, J. Offer, R. Longhi, P. E. Dawson, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 2749–2757.
- [10] a) J. Offer, *Biopolymers* **2010**, 94, 530–541; b) C. Chatterjee, R. K. McGinty, J. P. Pellois, T. W. Muir, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2814; *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2872–2876; c) J. P. Pellois, T. W. Muir, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5713–5717; *Angew. Chem.* **2005**, 117, 5859–5863.
- [11] K. L. Reddy, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1207–1217.
- [12] G. Li, H.-T. Chang, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 451–454; *Angew. Chem.* **1996**, 108, 449–452.
- [13] C. Xiong, W. Wang, C. Cai, V. J. Hruby, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 1399–1402.
- [14] O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, 40, 2380–2380.
- [15] a) E. Wünsch, L. Moroder, S. Romani, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1982**, 363, 1461–1464; b) H. Bock, J. Kroner, *Chem. Ber. Recl.* **1966**, 99, 2039–2051.
- [16] C. Han, J. P. Lee, E. Lobkovsky, J. A. Porco, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10039–10044.
- [17] C. Bello, F. Kikul, C. F. W. Becker, *J. Pept. Sci.* **2015**, 21, 201–207.
- [18] a) „Acid azides“: J. Lutz, H.-J. Musiol, L. Moroder in *Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Vol. E22a*, Georg Thieme, Stuttgart, **2002**; b) J. K. Chang, M. Shimizu, S.-S. Wang, *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 3255–3258; c) S.-S. Wang, I. D. Kulesha, *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 1227–1234.
- [19] G. M. Fang, Y. M. Li, F. Shen, Y. C. Huang, J. B. Li, Y. Lin, H. K. Cui, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7645–7649; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 7787–7791.

Eingegangen am 16. Februar 2015

Online veröffentlicht am 15. Mai 2015