



UNIVERSITÄT
BAYREUTH

Synthese von Glycoformen des humanen Erythropoietins

Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Simone Tamara Seeleithner

geboren in Günzburg

Bayreuth, 2018

Meinem Vater

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2014 bis Oktober 2018 in Bayreuth am Lehrstuhl für Bioorganische Chemie unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Carlo Unverzagt angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 29.10.2018

Zulassung durch die Promotionskommission: 15.11.2018

Wissenschaftliches Kolloquium: 24.04.2019

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Stefan Peiffer

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Carlo Unverzagt (Gutachter)

Prof. Dr. Rainer Schobert (Gutachter)

Prof. Dr. Peter Strohmriegl (Vorsitz)

Prof. Dr. Birgit Weber

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	8
1.1 Bedeutung und Darstellung von Glycoproteinen.....	8
1.2 Konvergente Glycopeptidsynthese	9
1.3 Synthese homogener Proteine und Glycoproteine.....	12
1.4 Humanes Erythropoietin	14
1.5 Bisherige Synthesen des humanen Erythropoietins.....	16
2 Ziel der Arbeit	24
3 Synthese eines Glycopeptidhydrazids des IgG1 Fc	25
4 Semisynthese von einfach glycosyliertem Erythropoietin.....	35
4.1 Synthese von EPO 1-28 Glycopeptidthioestern.....	35
4.2 Ligation und Rückfaltung der sialylierten EPO Glycoform A	43
5 Synthese von dreifach glycosyliertem Erythropoietin nach der Trt/Nvoc-Strategie	46
5.1 Synthese des <i>S</i> -tritylierten EPO 29-67 Glycopeptidhydrazids 29	47
5.2 Synthese von EPO 98-166 (STrt) 33	50
5.3 Ligation zu doppelt glycosyliertem EPO 29-166 36	54
6 Synthese von dreifach glycosyliertem Erythropoietin nach der AcM/TFAc-Strategie...	58
6.1 Synthese von AcM-geschützten EPO 29-67 Glycopeptiden.....	58
6.2 Synthese von EPO 68-97 (TFAc) Glycopeptidhydraziden.....	63
6.3 Synthese des doppelt glycosylierten EPO 29-97 Thioesters 48	67
6.4 Synthese von EPO 98-166 (SPhacm) 51 und EPO 98-166 (SAcM) 53	69
6.5 Synthese von doppelt glycosyliertem EPO 29-166 59	73
6.6 Ligation und Rückfaltung zu EPO (3xNona) D	76
7 Synthese von dreifach glycosyliertem Erythropoietin nach der AcM-Strategie	79
7.1 Synthese des EPO 68-97 Glycopeptidhydrazids F3	79
7.2 Synthese des doppelt glycosylierten EPO 29-97 Thioesters 61	80
7.3 Synthese von doppelt glycosyliertem EPO 29-166 (3xSH) 59	82
7.4 Ligation und Rückfaltung zu EPO (3xNona) D	84
8 Zusammenfassung	87
9 Summary	90
10 Experimenteller Teil.....	93

Inhaltsverzeichnis

10.1	Allgemeines	93
10.2	Versuche zu Kapitel 3	96
10.3	Versuche zu Kapitel 4.1	105
10.4	Versuche zu Kapitel 4.2	113
10.5	Versuche zu Kapitel 5.1	114
10.6	Versuche zu Kapitel 5.2	119
10.7	Versuche zu Kapitel 5.3	126
10.8	Versuche zu Kapitel 6.1	128
10.9	Versuche zu Kapitel 6.2	135
10.10	Versuche zu Kapitel 6.3	140
10.11	Versuche zu Kapitel 6.4	141
10.12	Versuche zu Kapitel 6.5	149
10.13	Versuche zu Kapitel 6.6	152
10.14	Versuche zu Kapitel 7.1	153
10.15	Versuche zu Kapitel 7.2	154
10.16	Versuche zu Kapitel 7.3	155
10.17	Versuche zu Kapitel 7.4	158
11	Danksagung	160
12	Literaturverzeichnis	162

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
Ac	Acetyl
Acm	Acetamidomethyl
Alk	Alkyl
All	Allyl
amu	<i>atomic mass unit</i>
Ar	Aryl
ber	berechnet
B _(H)	Beladungsgrad (eines Harzes)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	Circulardichroismus
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
Cl-HOBt	6-Chlor-1-hydroxybenzotriazol
CM	ChemMatrix
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CSPPS	<i>convergent solid phase peptide synthesis</i>
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCHT	[2-(Dicyclohexylphosphino)ethyl]trimethylammoniumchlorid
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
Dmb	2,4-Dimethoxybenzyl
Dmcp	Dimethylcyclopropylmethyl
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELSD	<i>electron light scattering detector</i>

Abkürzungsverzeichnis

ENGase	<i>endo</i> - β - <i>N</i> -Acetylglucosaminidase
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietin-Rezeptor
eq	Äquivalent(e)
ER	endoplasmatisches Reticulum
ESI-MS	<i>electrospray ionisation mass spectrometry</i>
Fab	<i>antigen binding fragment</i>
Fc	<i>crystallizable fragment</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fuc	L-Fucose
Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-Galactosamin
GdmCl	Guanidiniumchlorid
gef	gefunden
Glc	D-Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-Glucose
HATU	<i>N</i> -[(Dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-yl-methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HCTU	<i>N</i> -[(6-Chlor-1 <i>H</i> -benzo-1,2,3-triazol-1-yl)-(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
hEPO	humanes Erythropoietin
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorpropan-2-ol
HOAt	1- <i>N</i> -Hydroxy-7-azabenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR-MS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HV	Hochvakuum
Ig	Immunoglobulin
KCL	<i>kinetically controlled ligation</i>
LacNAc	D-Galactose- <i>N</i> -Acetyl-D-Glucose
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
Lev	Levulinoyl
Man	D-Mannose
mAU	<i>milli absorption unit</i>
MESNa	Natrium-2-sulfanylethansulfonat

Abkürzungsverzeichnis

MMBA	4-(Mercaptomethyl)benzoesäure
MPAA	2-(4-Mercaptophenyl)essigsäure
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
<i>n</i> Bu-3-McP	<i>n</i> -Butyl-3-mercaptopropionsäure
NCL	<i>native chemical ligation</i>
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Nvoc	6-Nitroveratryloxycarbonyl
p. a.	<i>pro analysi</i>
Pac	Phenacyl
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PG	<i>protecting group</i>
PGA	Penicillin G Acylase
Phacm	Phenylacetamidomethyl
PhiPr	2-Phenylisopropyl
Pic	Picolyl
PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1-yl- <i>N</i> -oxy)-tris-(pyrrolidino)-phosphoniumhexafluorophosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yl- <i>N</i> -oxy-tris-(pyrrolidino)-phosphoniumhexafluorophosphat
PyCloCk	6-Chlor-benzotriazol-1-yl- <i>N</i> -oxy-tris-(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
quant.	quantitativ
rel. Abs.	relative Absorption
rel. Int.	relative Intensität
R_f	Retentionsfaktor
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
(<i>R,R</i>)-DACH-Phenyl-Trost-Ligand	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-(+)-1,2-Diaminocyclohexan- <i>N,N'</i> -bis-(2-diphenylphosphino)benzoyl
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

Abkürzungsverzeichnis

SEP	<i>synthetic erythropoiesis protein</i>
SG	Schutzgruppe
Sia	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
SPGPS	<i>solid-phase glycopeptide synthesis</i>
SPPS	<i>solid-phase peptide synthesis</i>
ST6	α -2,6-Sialyltransferase
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TFAc	Trifluoracetyl
theo	theoretisch
Thz	1,3-Thiazolidin-4-carbonsäure
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Trt	Tryl
UHPLC	<i>ultra-high performance liquid chromatography</i>
UV	ultraviolett
VA-044	2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid
Xaa	beliebige Aminosäure
ψ pro	Pseudoprolin

1 Einleitung

1.1 Bedeutung und Darstellung von Glycoproteinen

Die meisten Proteine im menschlichen Körper tragen posttranslationale Modifikationen.^[1] Die häufigste Modifikation, die bei mehr als 50 % der humanen Proteine auftritt, ist eine Glycosylierung.^[2] Hierbei wird ein Kohlenhydrat *N*-, *O*- oder *C*-glycosidisch mit einem Protein verknüpft.^[3] Am häufigsten ist die *N*-Glycosylierung an der Seitenkette von Asparagin, gefolgt von der *O*-Glycosylierung an den Seitenketten von Serin, Threonin, Hydroxyprolin, Hydroxylysin oder Tyrosin.^[4] Es wird geschätzt, dass über 90 % der Glycoproteine *N*-glycosyliert vorliegen.^[5] Die verknüpften *N*-Glycane lassen sich in drei Haupttypen unterteilen: den mannosereichen, den komplexen und den Hybridtyp. Allen drei Typen ist das *Core*-Pentasaccharid gemeinsam (Abbildung 1).^[6]

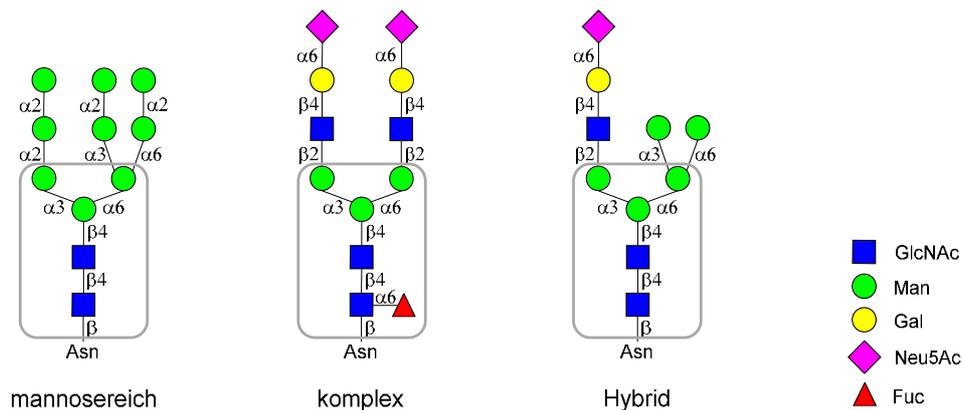


Abbildung 1: Darstellung der drei Haupttypen der *N*-Glycane mit gemeinsamem *Core*-Pentasaccharid (graue Box).^[6]

Die *N*-Glycosylierung findet während der Translation des Proteins im endoplasmatischen Reticulum (ER) statt. Hierbei überträgt das Transmembranenzym Oligosaccharyltransferase ein Tetradasaccharid auf die Seitenkette eines Asparagins in einer Asn-Xaa-Ser/Thr-Konsensussequenz, wobei Xaa für eine beliebige Aminosäure außer Prolin steht.^[7,8] Durch weitere Modifikationen des Glycananteils im Golgi-Apparat wird die Diversität der Glycoproteine und damit ihre Funktionalität enorm erhöht.^[9,10] Eine Glycosylierung hat Einfluss auf die Faltung, die proteolytische und thermische Stabilität, die Löslichkeit sowie die Halbwertszeit und die Aktivität von Proteinen.^[2,11,12] Glycoproteine sind von entscheidender Bedeutung für viele biologische Vorgänge wie dem Zellwachstum, der Zelladhäsion,

der Zelldifferenzierung und der Immunantwort.^[13,14] Eine veränderte Glycosylierung steht in Zusammenhang mit Krankheiten wie Entzündungen, Krebs oder Autoimmunkrankheiten.^[15,16] Zahlreiche Glycoproteine werden auch als Therapeutikum eingesetzt.^[17]

Die Glycosylierung von Proteinen ist nicht direkt genetisch kontrolliert.^[18] Während ein definiertes Peptidrückgrat vorliegt, variieren die einzelnen Glycoformen in der Struktur der gebundenen *N*-Glycane (Mikroheterogenität), wie auch in deren Anzahl und Position (Makroheterogenität).^[19,20] Dieses Gemisch verschiedener Glycoformen lässt sich zwar mit aufwendigen Methoden charakterisieren, jedoch nicht in ausreichender Menge und Reinheit trennen.^[21,22] Daher werden homogene und genau definierte Glycoformen durch geeignete Synthesemethoden aufgebaut, um Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen zu können.^[23,24]

Die Darstellung homogener Glycoproteine gelingt durch *Glycoprotein Remodeling* oder Peptid-Glycopeptid-Ligation.^[2] Beim *Glycoprotein Remodeling* handelt es sich um eine chemoenzymatische Semisynthese. Hierbei wird eine heterogene Mischung von Glycoformen rekombinant exprimiert und der Saccharidteil durch Endoglycosidasen (ENGasen) bis auf ein terminales GlcNAc abgebaut.^[25] Da diese Enzyme auch die Rückreaktion katalysieren, können sie anschließend für die Verknüpfung eines Oligosaccharidoxazolins auf das GlcNAc-Protein eingesetzt werden.^[26,27,28]

Bei der Peptid-Glycopeptid-Ligation werden definierte Peptide und Glycopeptide chemoselektiv verknüpft und danach zum Glycoprotein zurückgefaltet.^[29,30] Die benötigten Peptide können rekombinant durch Expression oder chemisch durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) gewonnen werden.^[31,32] Die Darstellung der Glycopeptide kann linear durch den Einbau von Glycosylaminosäuren, konvergent durch *Lansbury*-Aspartylierung oder enzymatisch erfolgen.^[26,33,34] Die Peptid-Glycopeptid-Ligation bietet eine hohe Flexibilität, da sie auch die Synthese nicht natürlich vorkommender Glycoformen und den einfachen Aufbau von Bibliotheken homogener Glycoproteine ermöglicht.^[35]

1.2 Konvergente Glycopeptidsynthese

Bei der linearen Glycopeptidsynthese findet der Einbau einer Glycosylaminosäure während der Festphasenpeptidsynthese (*solid-phase glycopeptide synthesis*, SPGPS) statt.^[33,36] Diese Methode birgt allerdings die Nachteile, dass bei ungeschützten Zuckern *O*-glycosidische Bindungen säurelabil sind und die Gefahr von Nebenreaktionen an freien Hydroxygruppen besteht.^[36,37,38] Acetylgeschützte Glycane hingegen können zu einem Abbruch des Peptidaufbaus führen.^[39,40] Eine konvergente Methode zur Synthese von Glycopeptiden stellt

die *Lansbury*-Aspartylierung dar^[34,41] Hierbei wird ein *N*-Glycan an ein durch Festphasenpeptidsynthese erhaltenes Peptid gekuppelt (Abbildung 2). Ein Vorteil der konvergenten Methode besteht darin, dass meist geringere Mengen an Oligosaccharid benötigt werden, was gerade bei synthetischen *N*-Glycanen wichtig ist.^[41] Durch die Möglichkeit die Zucker zu variieren und das Peptid beizubehalten, besitzt die konvergente Glycopeptidsynthese eine hohe Flexibilität, wodurch Glycoproteinbibliotheken einfacher aufgebaut werden können.^[35,42]

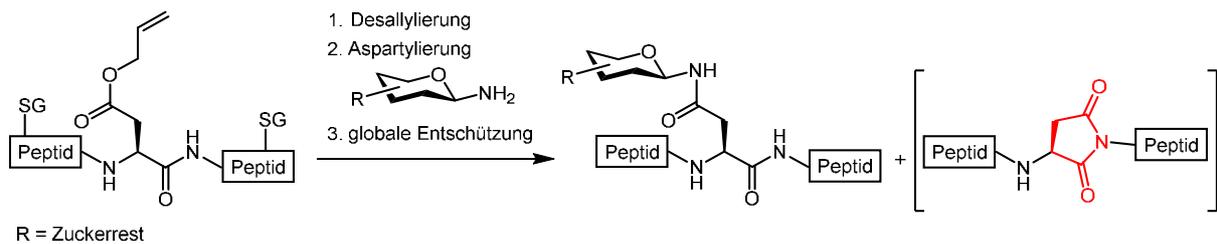


Abbildung 2: *Lansbury*-Aspartylierung mit Aspartimidnebenprodukt (rot).

Die für die *Lansbury*-Aspartylierung benötigten Peptide können durch lineare Festphasenpeptidsynthese (*solid-phase peptide synthesis*, SPPS) dargestellt werden. Diese 1963 von *Merrifield* entwickelte Synthesemethode gehört zum Standardrepertoire in der Peptidchemie.^[32] Hierbei wird das Peptid über einen reversibel spaltbaren Linker an einer polymeren Harzmatrix aufgebaut.^[43,44,45] Die Peptidsynthese erfolgt vom C- zum N-Terminus durch repetitive Entschützungs- und Kupplungsschritte von N^α - und seitenkettengeschützten Aminosäuren. Dabei sind zwei Strategien üblich. Die Boc-Strategie, die sich nach der abgestuften Säurelabilität der Schutzgruppen richtet, und die Fmoc-Strategie, bei der die Schutzgruppen orthogonal zueinander sind.^[46] Da Reagenzienüberschüsse durch Waschschritte abgetrennt werden können, stellt die SPPS eine einfache und schnelle Möglichkeit der Peptidsynthese dar.^[32] Allerdings ist sie nur bis zu einer Länge von ca. 50 Aminosäuren geeignet, da sich bei längeren Peptiden chromatographisch nicht abtrennbare Fehlsequenzen anhäufen, die aus Aggregationen und Sekundärstrukturbildung resultieren.^[46,47,48] Um dem entgegenzuwirken und die Löslichkeit der wachsenden Peptidkette zu erhöhen, können *Backbone*-Schutzgruppen wie 2,4-Dimethoxybenzyl (Dmb) oder Pseudoproline (ψ pro) verwendet werden.^[49,50,51] Letztere sind als Oxazolidin oder Thiazolidin geschützte Serine oder Threonine bzw. Cysteine, die durch die bevorzugte *cis*-Konfiguration einen Knick im Peptidrückgrat erzeugen und so Aggregationen unterdrücken.^[51,52] Die Synthese längerer Peptide und Glycopeptide ist konvergent durch Festphasensegmentkondensation (*convergent*

solid-phase peptide synthesis, CSPPS) möglich, bei der eine aktivierte Peptidylsäure an ein harzgebundenes Peptid gekuppelt wird. Eine C-terminale Epimerisierung kann dabei durch Glycine, Proline oder Pseudoproline an der Schnittstelle vermieden werden.^[38,53]

Die konvergente Glycopeptidsynthese via *Lansbury*-Aspartylierung ist in Lösung oder an der Festphase möglich.^[41,42,54,55] Hierbei erfolgt die Kupplung eines Glycosylamins an die Seitenkette eines aktivierten Aspartats im Peptid, wodurch ein glycosyliertes Asparagin entsteht (Abbildung 2).^[34,41] Die durch SPPS aufgebauten Peptide müssen somit an der Glycosylierungsstelle ein Aspartat besitzen, das selektiv entschützt werden kann. Als Schutzgruppe wird häufig die orthogonale Allylgruppe (All) verwendet, die durch den Einsatz von löslichen oder festphasengebundenen Palladiumkatalysatoren entfernt werden kann.^[56,57,58,59] Eine andere Möglichkeit ist die Schützung als 2-Phenylisopropylester (PhiPr). Die PhiPr-Schutzgruppe kann aufgrund ihrer erhöhten Säurelabilität selektiv abgespalten werden. Die Vorteile sind eine leichte Reinigung und die Vermeidung von Schwermetallen.^[60,61,62,63] Außerdem wird durch den hohen sterischen Anspruch die Aspartimidbildung am Aspartat unterdrückt.^[55,64] Nachteilig ist, dass durch die Säurebehandlung auch andere säurelabile Schutzgruppen entfernt werden können.

Ein generelles Problem der *Lansbury*-Aspartylierung stellt die Aspartimidbildung dar, die aus einer Cyclisierung des aktivierten Aspartats resultiert. Diese säure- und basenkatalysierte Nebenreaktion ist sequenzabhängig und kann bereits während der SPPS auftreten.^[65,66,67] Effektiv kann die Aspartimidbildung durch den Einbau von sterisch anspruchsvollen Schutzgruppen wie Dmb oder PhiPr vermieden werden.^[50,54,55] Besonders Pseudoprolin-dipeptide neben der Glycosylierungsstelle eignen sich für die Aspartimidunterdrückung, da aufgrund der Asn-Xaa-Ser/Thr-Konsensussequenz ihr Einbau in die Synthese stets möglich ist.^[7,51] Die Pseudoprolin-vermittelte *Lansbury*-Aspartylierung in Lösung oder an der Festphase stellt somit die Methode der Wahl dar (Abbildung 3).^[68,69]

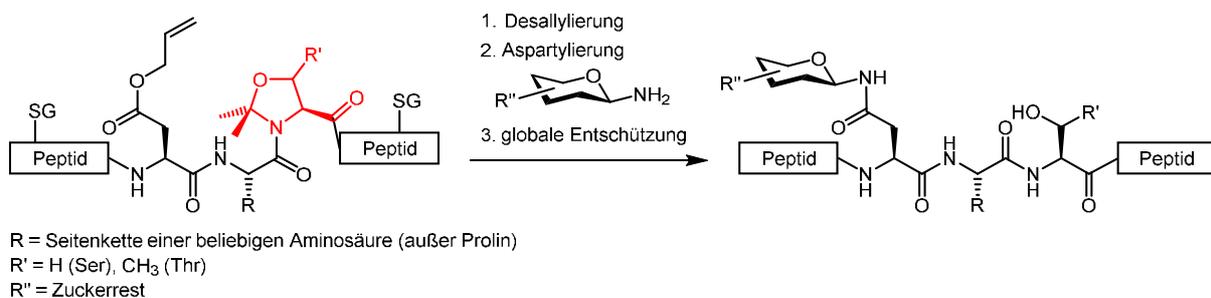


Abbildung 3: Pseudoprolin-vermittelte *Lansbury*-Aspartylierung.

1.3 Synthese homogener Proteine und Glycoproteine

Für die Darstellung homogener Proteine und Glycoproteine kommen chemoselektive Ligationsmethoden zum Einsatz.^[70] Große Bedeutung hat die von *Kent et al.* entwickelte native chemische Ligation (NCL) erlangt, da mit ihr die Verknüpfung von ungeschützten Peptiden und Glycopeptiden im wässrigen Medium unter milden Bedingungen möglich ist. Bei der NCL greift ein Peptid mit N-terminalem Cystein an einem C-terminalen Peptidthioester an. Dabei kommt es zunächst zu einem reversiblen Thiol-Thioesteraustausch. Durch den anschließenden irreversiblen intramolekularen *S,N*-Acylylshift wird die native Peptidbindung ausgebildet (Abbildung 4).^[71]

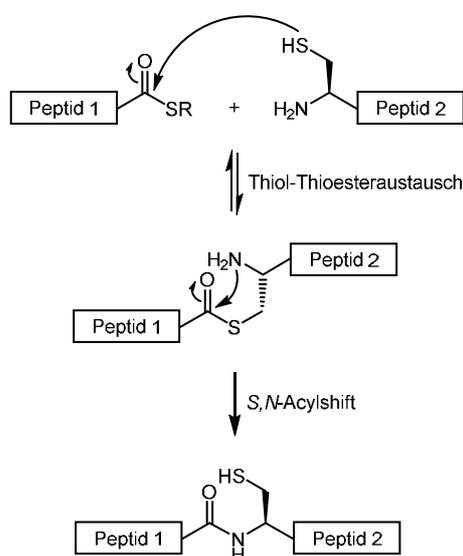


Abbildung 4: Mechanismus der nativen chemischen Ligation.^[71]

Da der Thiol-Thioesteraustausch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellt, beeinflussen die C-terminale Aminosäure des Thioesters und die Thiolabgangsgruppe die Reaktionsgeschwindigkeit. Bei Aminosäuren mit kleinen und unverzweigten Seitenketten verläuft die Ligation schneller.^[72] Generell kann durch Zugabe aromatischer Thiole wie 2-(4-Mercaptophenyl)essigsäure (MPAA) über eine Umesterung die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht werden.^[73,74]

Die direkte Synthese der für die NCL benötigten (Glyco-)Peptidthioester ist oftmals mit Schwierigkeiten verbunden. Die Fmoc-SPPS ist wegen der Basenlabilität von Thioestern ungeeignet und auch die Boc-SPPS scheidet für die Synthese von Glycopeptidthioestern aus, da *O*-glycosidische Bindungen durch die starken Säuren gespalten werden können.^[36,37,75,76] Diese Probleme können durch eine nachträgliche Einführung der Thioesterfunktion umgangen

werden.^[75,77,78,79] *Kajihara et al.* bauten dafür das Glycopeptid durch Fmoc-SPPS an einem säurelabilen Linker auf. Durch milde Acidolyse wurde die geschützte Peptidylsäure vom Harz abgespalten und bei -20 °C nach Aktivierung der Carboxyfunktion durch Zugabe eines Thiols zum Thioester umgesetzt.^[43,80] Um Löslichkeitsprobleme getrockneter Peptidylsäuren zu umgehen, optimierte *Flemer* diese Vorgehensweise, indem er die Thioveresterung *in situ* direkt in der Abspaltung durchführte.^[81] Eine weitere Möglichkeit der Thioestersynthese bietet sich durch latente Peptidthioester.^[77,82] Hierbei können Peptidylsäuren nach der Abspaltung vom Harz zu Peptidhydraziden umgesetzt werden.^[81,83,84,85] Hydrazide können auch direkt durch Hydrazinolyse vom Harz oder Verwendung von Hydrazin-Harzen erhalten werden.^[86,87,88,89,90] Peptidhydrazide besitzen die Vorteile, dass sie stabil gegenüber Basen sind und kaum zu Racemisierungen neigen.^[77,91] Peptidhydrazide können mit der Methode von *Liu et al.* durch Diazotierung und anschließende Zugabe eines Thiols in Thioester umgewandelt und für die NCL eingesetzt werden (Abbildung 5).^[92,93]

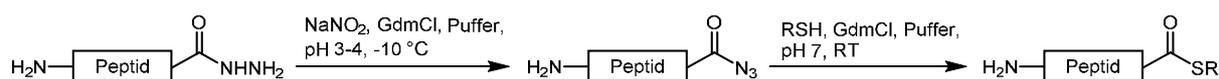


Abbildung 5: Thioveresterung von Peptidhydraziden nach *Liu et al.*^[92]

Die NCL kann auch sequentiell mit drei oder mehr Peptid- oder Glycopeptidfragmenten durchgeführt werden, um größere Glycoproteine zu synthetisieren. Die internen Fragmente müssen dabei bifunktional sein und sowohl N-terminal ein reversibel geschütztes Cystein besitzen sowie C-terminal als (latenter) Thioester vorliegen.^[82,94,95,96] Die sequentielle NCL gelingt nicht immer in beide Richtungen. Um Cyclisierungen und Polymerisierungen zu vermeiden, muss auf die Ligationsrichtung sowie auf die Schutzgruppen geachtet werden.^[82,96,97] Das N-terminale Cystein kann auf diverse Arten geschützt werden, z. B. als cyclische 1,3-Thiazolidin-4-carbonsäure (Thz).^[98] Die Entschützung kann bei Bedarf durch Methoxyamin oder Palladiumsalze erfolgen.^[95,99,100] Weiterhin kann die (Phenyl-)Acetamidomethylschutzgruppe (Phacm bzw. Acm) verwendet werden, deren Entfernung unter Disulfidbildung mit Iod oder Thalliumsalzen oder unter Freisetzung der Thiolgruppe mit Silber-, oder Quecksilbersalzen möglich ist.^[95,101,102,103,104] Allerdings kommen hier harsche Bedingungen zum Einsatz und aufgrund von Komplexierungen des Proteins kann die Wiederfindungsrate niedrig sein.^[85,96,105] Eine Entschützung ist auch metallfrei nach *Flemer et al.* möglich, was allerdings zur Bildung von Nebenprodukten führen kann.^[85,106,107] Gut geeignet für die Entfernung von Phacm- oder Acm-Gruppen sind die von *Brik et al.* verwendeten Palladium-

salze.^[108,109] Die Phacm-Schutzgruppe kann außerdem enzymatisch durch Penicillin G Acylase (PGA) entfernt werden.^[102,110]

Die Seltenheit von Cysteinen in eukaryotischen Sequenzen (1.7 %), erschwert die Synthese von Glycoproteinen durch native chemische Ligation.^[111] Eine Lösung dieses Problems bieten cysteinfreie Ligationsmethoden wie die von Dawson *et al.* entwickelte Alanin-Ligation.^[112,113] Hierbei erfolgt der Einbau eines Cysteins anstelle eines N-terminalen Alanins in die Peptidsequenz, wodurch eine Ligationsstelle generiert wird. Nach der NCL wird dann das Cystein zum nativen Alanin entschwefelt.^[113] Wichtig ist dabei die Verwendung orthogonaler Schutzgruppen für die nativen Cysteine, die bei der Entschwefelung stabil bleiben.^[114,115] Die Entschwefelung kann durch Pd/Al₂O₃ oder Nickel erfolgen.^[113] Um die Nachteile von Metallen, wie z. B. Proteinkomplexierung zu umgehen, wurde von Danishefsky *et al.* eine radikalische Entschwefelung mit Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) entwickelt.^[96,105,116] Der Radikalstarter 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid (VA-044) initiiert die Bildung eines Alkylthiylradikals, das mit TCEP zum Phosphoranylradikal reagiert. Durch anschließende Zersetzung dieses Intermediats entsteht ein Alkylradikal. Dieses reagiert mit einem Mercaptan unter Bildung der gewünschten Alkylgruppe und eines neuen Thiylradikals (Abbildung 6).^[116,117,118,119] Eine weitere, milde Möglichkeit stellt die P-B-Entschwefelung mit TCEP/NaBH₄ oder TCEP/LiBEt₃H dar.^[120] Die cysteinfreie Ligation durch thiolmodifizierte Aminosäuren konnte mit nahezu allen Aminosäuren gezeigt werden, der Favorit bleibt jedoch aufgrund der Einfachheit die Alanin-Ligation.^[24,121]

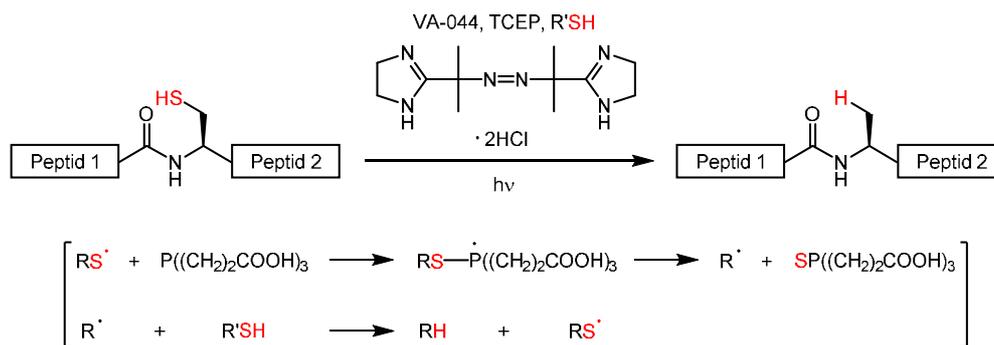


Abbildung 6: Mechanismus der radikalischen Entschwefelung mit TCEP.^[116]

1.4 Humanes Erythropoietin

Wegen seiner großen Bedeutung für die Medizin stellt das Cytokin Erythropoietin (EPO) eines der am besten erforschten Glycoproteine dar.^[122] Durch Stimulation der Erythrozyten-

produktion reguliert EPO die Sauerstoffhomöostase im Körper von Säugetieren.^[123,124,125] Hypoxie oder Anämie führen zur erhöhten Bildung von EPO in den Hepatozyten der Leber von Föten und Neugeborenen und in den interstitiellen peritubulären Zellen der Niere von Erwachsenen.^[126,127,128,129] Beim Menschen erfolgt die Biosynthese von EPO durch Expression des 193 Aminosäuren umfassenden EPO-Vorläuferglycoproteins. Nach der Reifung im Golgi-Apparat wird das Glycoproteinormon mit 166 Aminosäuren in die Blutbahn sezerniert.^[125,130] Im Knochenmark bindet EPO an den Erythropoietin-Rezeptor (EPOR), einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor auf erythroiden Vorläuferzellen. Durch Anregung der Proliferation und Differenzierung und Hemmung der Apoptose führt dies zu einer vermehrten Erythropoese.^[125,131,132] EPO wird zu 90 % in der adulten Niere gebildet.^[127,133] Der EPOR ist aber auch in endothelialen, neuralen, kardiovaskulären, muskulären und retinalen Zellen zu finden. Dort dient EPO der Zellprotektion und Proliferationsförderung.^[134,135,136,137,138] Rekombinantes humanes EPO (rhEPO) wird seit den 1980er Jahren aus CHO-Zellen gewonnen.^[139,140,141] Es wird seither als Medikament bei Anämie aufgrund von chronischer Niereninsuffizienz, Krebschemotherapie oder HIV/AIDS eingesetzt. Außerdem dient es zur Vermeidung von Bluttransfusionen und zur Vorbereitung der Eigenblutspende.^[133,142,143] Zu negativer Berühmtheit ist rhEPO durch die Verwendung als Blutdopingmittel beim Sport gelangt.^[144,145]

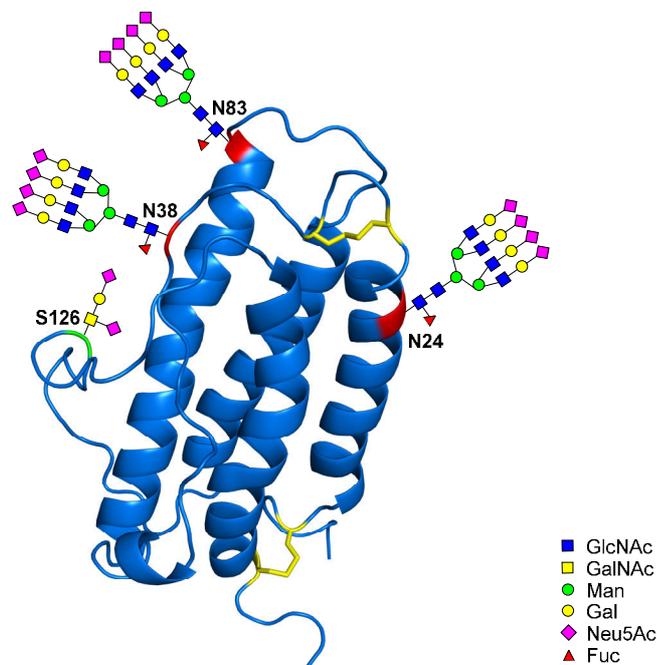


Abbildung 7: NMR-Struktur von hEPO (PDB: 1BUY) mit hinzugefügten N-Glycanen und O-Glycan.^[146]

Humanes EPO (hEPO) setzt sich aus 166 Aminosäuren zusammen und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 34 kDa. Es enthält vier Cysteine, die zwei Disulfidbrücken zwischen Cys-7 und 161 und zwischen Cys-29 und 33 ausbilden.^[147] Die Tertiärstruktur besteht vorwiegend aus vier α -Helices.^[146] Durch die Stabilisierung der Tertiärstruktur tragen die Disulfidbrücken zur Aktivität bei.^[148,149] hEPO weist *N*-Glycosylierungen an den Asparaginen 24, 38 und 83 und eine *O*-Glycosylierung an Ser-126 auf. Die gebundenen Oligosaccharide machen dabei ca. 40 % der Molekülmasse aus (Abbildung 7).^[147,150]

Durch die chromatographische Anreicherung bestimmter Glycoformen und einen anschließenden enzymatischen Abbau der Glycane kann deren Einfluss auf die Bioaktivität erforscht werden.^[12,151,152,153] Die Bindung von EPO an seinen Rezeptor *in vitro* ist weitgehend unabhängig von den Zuckern.^[148,149,152,154] Die angeknüpften Oligosaccharide beeinflussen jedoch die *in vivo*-Aktivität von EPO signifikant.^[149,152,155] Während das an Ser-126 gebundene *O*-Glycan vom sialylierten Mucin-Typ nicht notwendig für die biologische Aktivität von EPO ist, hängt diese stark von den *N*-Glycanen und deren Struktur ab.^[12,152,156,157] Die bei hEPO auftauchenden komplexen *N*-Glycane können zwei, drei oder vier Antennen besitzen. Die häufigste Glycoform enthält tetraantennäre, sialylierte und *core*-fucosylierte *N*-Glycane (Abbildung 7).^[158] Der Verzweigungsgrad und damit die Anzahl der Sialinsäuren beeinflusst die *in vivo*-Aktivität, da sie den Abbau in der Leber und Niere verhindern und so die Halbwertszeit erhöhen.^[12,150,151,158] Desialyliertes und deglycosyliertes hEPO binden stärker an den Rezeptor als natives hEPO, was zu einer höheren bzw. unveränderten *in vitro*-Aktivität führt, durch den wesentlich schnelleren metabolischen Abbau ist allerdings die *in vivo*-Aktivität deutlich reduziert.^[152,153,159,160] Diese Erkenntnisse wurden für die Entwicklung von Therapeutika genutzt. Z. B. wurden bei Darbepoetin alfa (Aranesp®) zusätzliche sialylierte *N*-Glycane eingebaut, was eine Steigerung der Plasmahalbwertszeit und der *in vivo*-Aktivität zur Folge hatte.^[161,162,163]

1.5 Bisherige Synthesen des humanen Erythropoietins

Aufgrund der Mikroheterogenität ist natürliches und rekombinantes hEPO für die genaue Erforschung von Struktur-Wirkungsbeziehungen ungeeignet. Hierfür werden homogene Glycoformen benötigt, die nur durch chemische und enzymatische Synthese zugänglich sind. Durch den Aufbau von Bibliotheken kann der spezifische Einfluss des Glycosylierungsmusters auf die Aktivität von EPO ermittelt werden.^[35,96,164] Kent *et al.* gelang bereits 2003 die Synthese von *synthetic erythropoiesis protein* (SEP), eines

Einleitung

homogenen EPO-Derivats, das statt der vier Glycane zwei kovalent gebundene verzweigte Präzisionspolymere aufweist. Der Aufbau erfolgte durch chemoselektive Ligationen von vier Peptidfragmenten und zwei monodispersen negativ geladenen Polymeren (Abbildung 8). Durch die negativen Ladungen werden Sialinsäuren nachgeahmt, die durch ihren großen hydrodynamischen Radius den Abbau von EPO in der Niere verlangsamen. Um Ligationsstellen zu generieren, wurden Substitutionen in der Aminosäuresequenz vorgenommen. An den Glycosylierungsstellen wurden Asn und Ser durch Lys ersetzt, wobei an Lys(N^ε-Levulinoyl)-24 und 126 das Polymer unter Oximbildung ligiert wurde.^[122,165]

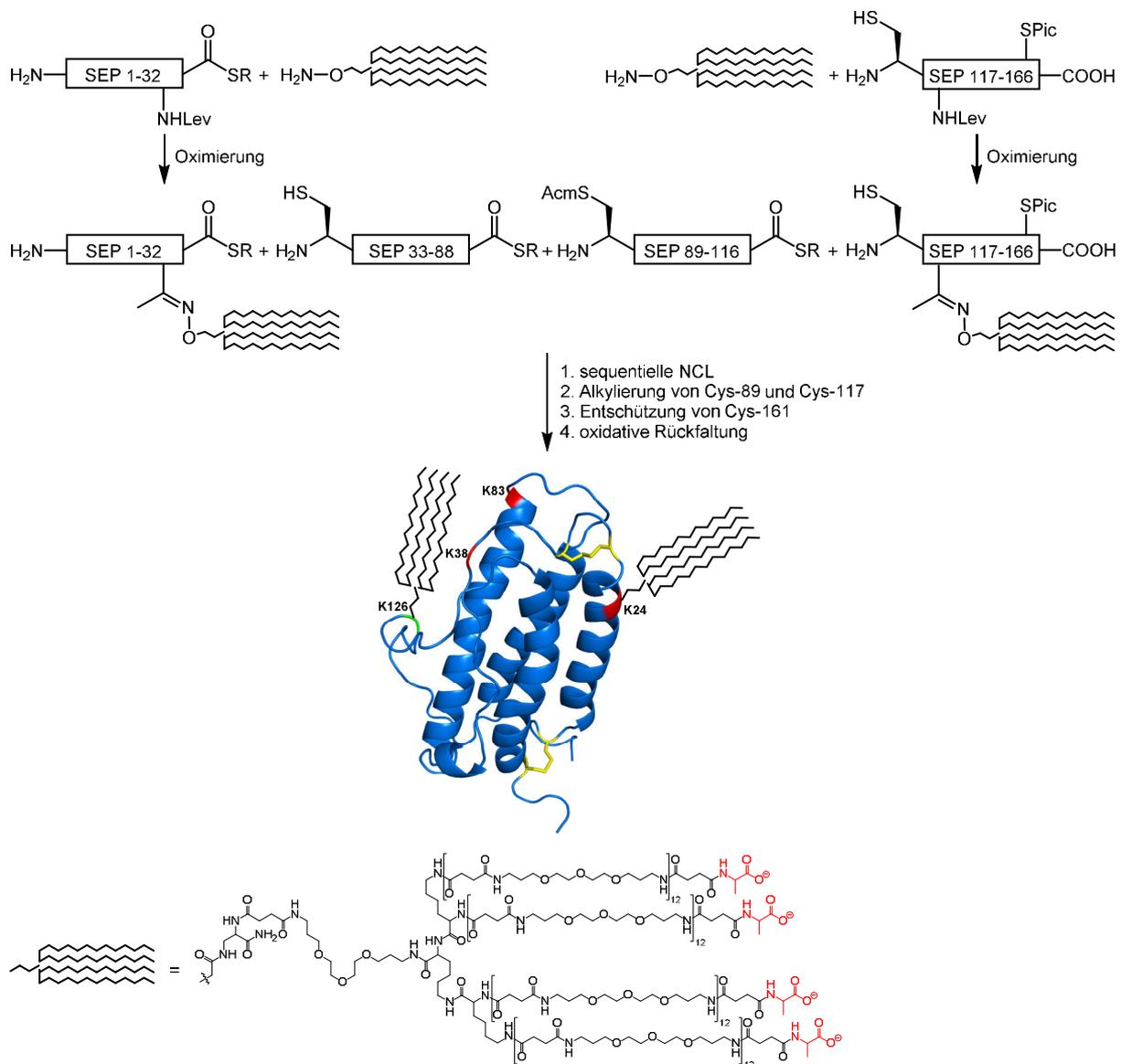


Abbildung 8: Synthese von SEP nach Kent et al.^[122,165]

Für die Verknüpfung der Peptidfragmente wurden an den Positionen 89 und 117 nicht-native Cysteine eingebaut, die nach der NCL zu Pseudoglutamaten alkyliert wurden. Während der Alkylierung wurde der Schutz des nativen Cys-161 durch die orthogonale Picolylgruppe gewährleistet. Die oxidative Rückfaltung des polymermodifizierten Proteins unter Bildung der zwei nativen Disulfidbrücken wurde mithilfe eines Redox-*Shuffles* erreicht. SEP besitzt eine mit rhEPO vergleichbare spezifische *in vitro*-Aktivität und durch die längere Halbwertszeit eine erhöhte *in vivo*-Aktivität.^[122,165]

2012 leisteten *Kent et al.* einen weiteren Beitrag zur Darstellung homogener Glycoformen und EPO-Analoga durch die konvergente Totalsynthese von [Lys-24,38,83] EPO. Hierbei handelte es sich um nicht-glycosyliertes EPO, mit dem der Einfluss der Proteinstruktur auf die biologische Aktivität erforscht werden kann. Zur Aggregationsvermeidung wurden an den *N*-Glycosylierungsstellen Lysine eingebaut. Die Darstellung erfolgte ausgehend von fünf Peptidfragmenten, deren Verknüpfung mithilfe der kinetisch kontrollierten Ligation (KCL) und der sequentiellen NCL stattfand (Abbildung 9).^[154]

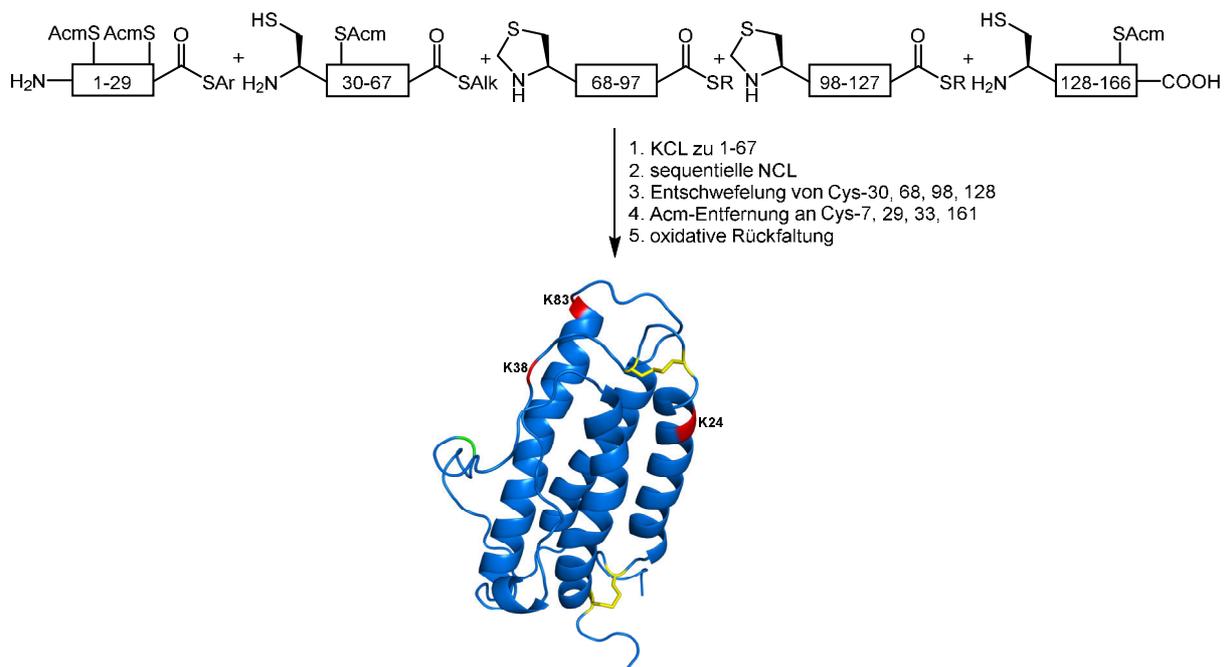


Abbildung 9: Totalsynthese von [Lys-24,38,83] EPO nach *Kent et al.*^[154]

Die KCL beruht auf der unterschiedlichen Reaktivität von Thioestern. Es erfolgt dabei die Kupplung des reaktiveren Peptidthioarylesters an das N-terminale Cystein eines Thioalkylesters.^[97,154] Um Ligationsstellen zu generieren, wurden Cysteine eingebaut, die nach der Verknüpfung der Fragmente durch metallfreie Entschwefelung in die nativen Alanine

umgewandelt wurden. Native Cysteine waren mit einer Acm-Schutzgruppe versehen, die vor der Rückfaltung durch Silberacetat entfernt wurde. Durch ein Cystein/Cystin-Redox-System gelang die Faltung von [Lys-24,38,83] EPO, das *in vitro* aktiv war.^[154]

2012 entwickelten *Danishefsky et al.* einen Weg zur Synthese von glycosyliertem EPO und stellten so zunächst eine homogene Glycoform mit drei Chitobiose-Disacchariden an den *N*-Glycosylierungsstellen und dem *O*-Glycan an Ser-126 dar. Weiterhin konnte nicht-glycosyliertes EPO dadurch erhalten werden.^[166] Ausgehend von dieser Strategie erfolgte dann schließlich 2013 die Darstellung einer homogenen Glycoform von EPO, die drei sialylierte biantennäre *core*-fucosylierte *N*-Glycane und das *O*-Glycan besaß.^[115] Die Synthese basierte auf der sequentiellen NCL von fünf Fragmenten, wobei die benötigten Thioester durch *Sakakibara*-Elongation erhalten wurden (Abbildung 10).^[115,167]

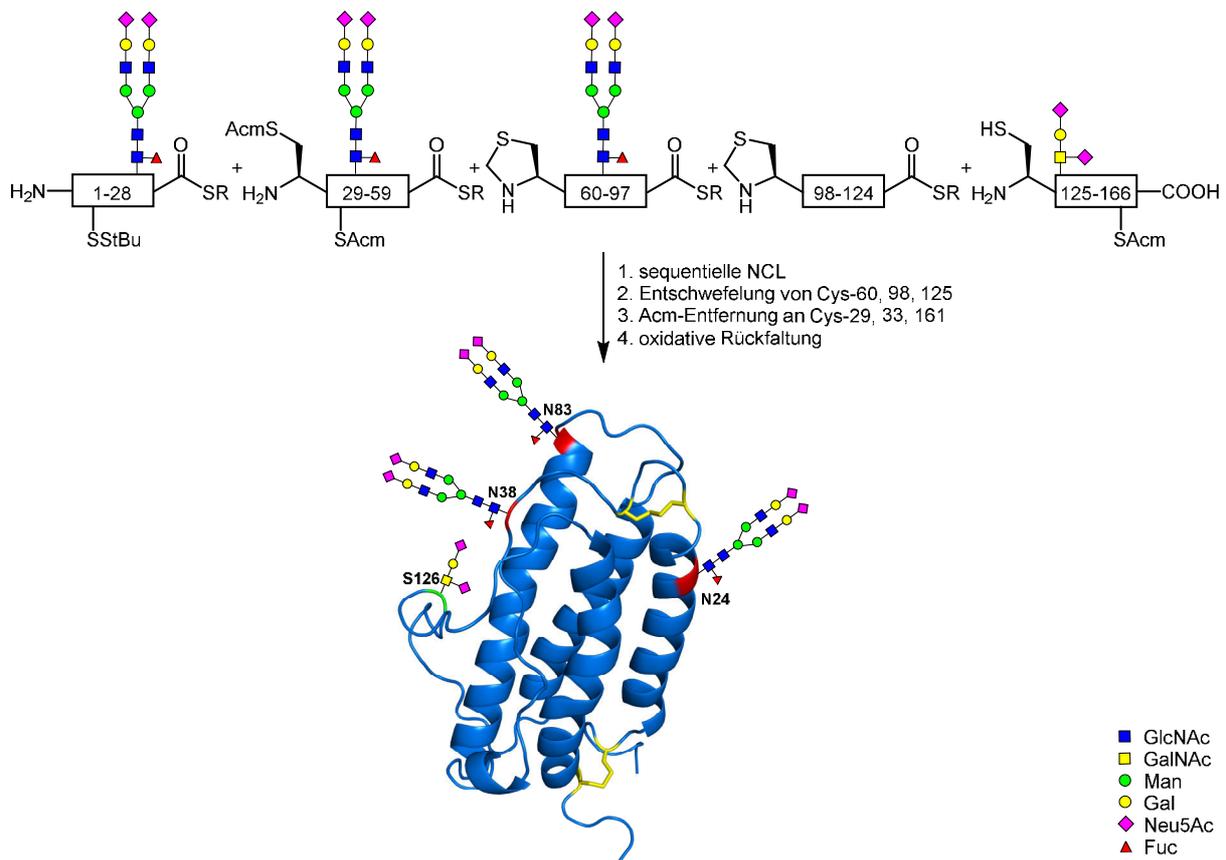


Abbildung 10: Totalsynthese von EPO mit natürlich vorkommenden *N*-Glycanen und *O*-Glycan nach *Danishefsky et al.*^[115]

Die Einführung der an Asn-24, 38 und 83 gebundenen komplexen *N*-Glycane erfolgte durch Pseudoprolin-vermittelte *Lansbury*-Aspartylierung mit anschließender *in situ*-Entschützung der Glycopeptidfragmente. Das *O*-Glycan an Ser-126 wurde als Glycosylaminosäure während

der SPPS eingebaut. Um Ligationsstellen zu generieren, wurden nicht-native Cysteine eingesetzt und nach der sequentiellen NCL zu EPO 29-166 zu den nativen Alaninen entschweifelt. Zum Erhalt der nativen Cysteine wurden Acm-Schutzgruppen verwendet, die vor der letzten Ligation durch Silberacetat entfernt wurden. Die Faltung des Volllängenglycoproteins wurde mithilfe eines Cystein/Cystin-Redox-*Shuffles* durchgeführt. Das erhaltene EPO konnte nicht durch MS charakterisiert werden, wies aber verglichen mit rhEPO (Prokrit) eine ähnliche *in vitro*-Aktivität und eine etwas geringere *in vivo*-Aktivität auf.^[115]

2012 veröffentlichten *Kajihara et al.* die Totalsynthese von EPO mit einem komplexen Undecasaccharid an Asn-83.^[37] Analog dazu folgten 2016 die Totalsynthesen von homogenen EPO-Glycoformen mit unterschiedlichen *N*-Glycosylierungsmustern. Die Synthesestrategie beinhaltete sechs Fragmente, die durch sequentielle NCL miteinander verbunden wurden (Abbildung 11).^[96]

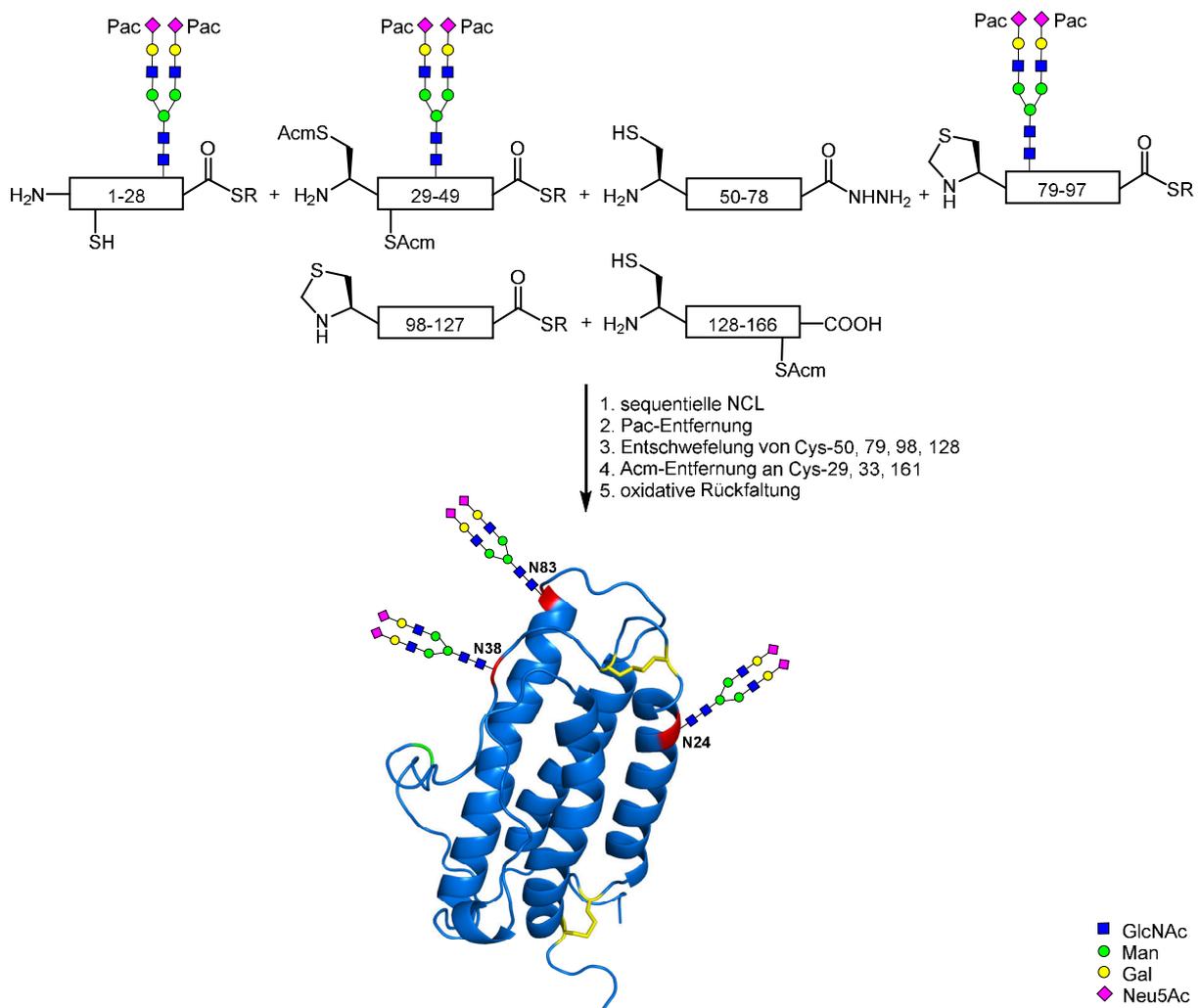


Abbildung 11: Totalsynthese von EPO mit drei sialylierten biantennären *N*-Glycanen nach *Kajihara et al.*^[96]

Die Einführung von komplexen sialylierten biantennären *N*-Glycanen erfolgte als Glycosylaminosäure über Boc-SPPS. Durch die Verwendung der basenlabilen Phenacylgruppe (Pac) gelang der Schutz der Sialinsäuren. Das Fragment 50-78 wurde als latenter Thioester synthetisiert, an dem das native Gln-78 durch Ala ersetzt wurde, um einer C-terminalen Cyclisierung vorzubeugen. Nach sequentieller NCL zu EPO 29-166 wurden die nicht-nativen Cysteine radikalisch zu nativen Alaninen entschweifelt. Die zum Schutz der nativen Cysteine verwendeten Acm-Gruppen wurden vor der letzten NCL entfernt, da sich der Verdacht ergab, dass eine Acm-Abspaltung am Vollängen-EPO zur Absorption des Glycoproteins in das verwendete Silberacetat führte und die Aggregation beschleunigte. Die Proteinfaltung wurde durch graduelle Dialyse unter Verwendung eines Cystein/Cystin-Redox-Systems erreicht. Dadurch konnte EPO mit drei sialylierten biantennären *N*-Glycanen dargestellt werden. Durch zusätzliche Variation von Anzahl und Position der Zucker konnten vier weitere Glycoformen aufgebaut werden. Dreifach-glycosyliertes EPO besaß dabei verglichen mit rhEPO (EPOGIN) eine leicht erhöhte *in vitro*- und leicht verminderte *in vivo*-Aktivität. Generell führte eine höhere Anzahl an *N*-Glycanen zu einer längeren Halbwertszeit und somit höheren *in vivo*-Aktivität. Außerdem wurde beobachtet, dass die Glycosylierung an Asn-38 die Proteinfaltung positiv beeinflusst und der an Asn-83 gebundene Zucker die Löslichkeit erhöht. Es zeigte sich eine stärkere Abhängigkeit der *in vivo*-Aktivität von den *N*-Glycanen an Asn-38 und 83 als vom *N*-Glycan an Position 24. Bemerkenswerterweise war selbst fehlgefaltetes EPO *in vivo* aktiv.^[96]

Dass der Zugang zu homogenem EPO auch enzymatisch durch *Glycan Remodeling* möglich ist, zeigten 2017 erstmals Wang *et al.* Die Vorgehensweise beruhte auf der Deglycosylierung von rekombinant gewonnenem EPO und der anschließenden Transglycosylierung zum homogenen Glycoprotein (Abbildung 12).^[164]

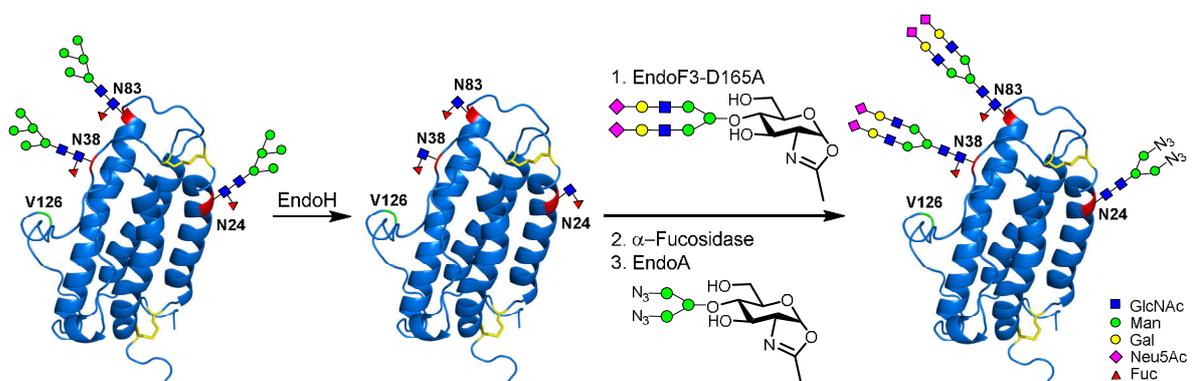


Abbildung 12: Enzymatische Synthese von dreifach *N*-glycosyliertem EPO durch Glycan Remodeling nach Wang *et al.*^[164]

Die Expression von EPO in der HEK293S GnT I⁻FUT8⁺-Zelllinie lieferte fast ausschließlich eine ungewöhnliche mannosereiche *core*-fucosylierte Glycoform, wobei zur Vermeidung der *O*-Glycosylierung Ser-126 durch Val ersetzt wurde. Die *Core*-Fucose war für die Vollständigkeit des enzymatischen Abbaus durch EndoH essentiell. An das resultierende EPO mit drei fucosylierten GlcNAc-Resten wurde ein sialyliertes biantennäres Oxazolin mithilfe der Glycosynthase EndoF3-D165A gekuppelt. Dabei wurde eine Selektivität für die Positionen 38 und 83 festgestellt. Diese wurde genutzt, um an Position 24 nach selektiver Defucosylierung ein mannosereiches Glycanoxazolin mit Azidgruppen durch EndoA zu kuppeln.^[164]

Gottwald konnte durch Semisynthese einige an Asn-24 monoglycosylierte EPO-Formen darstellen. Hierfür verknüpfte sie einen durch chemische Synthese erhaltenen EPO 1-28 Glycopeptidthioester mit dem in *E. coli* exprimierten Proteinfragment 29-166. Nach der NCL erfolgte eine oxidative Rückfaltung durch graduelle Dialyse unter Verwendung eines Cystein/Cystin-Redox-Systems. Auf diese Weise konnten bereits sieben homogene EPO-Glycoformen mit GlcNAc und nicht-sialylierten bi- und tetraantennären *N*-Glycanen an Asn-24 generiert werden, die eine hohe *in vitro*-Aktivität aufwiesen (Abbildung 13).^[168]

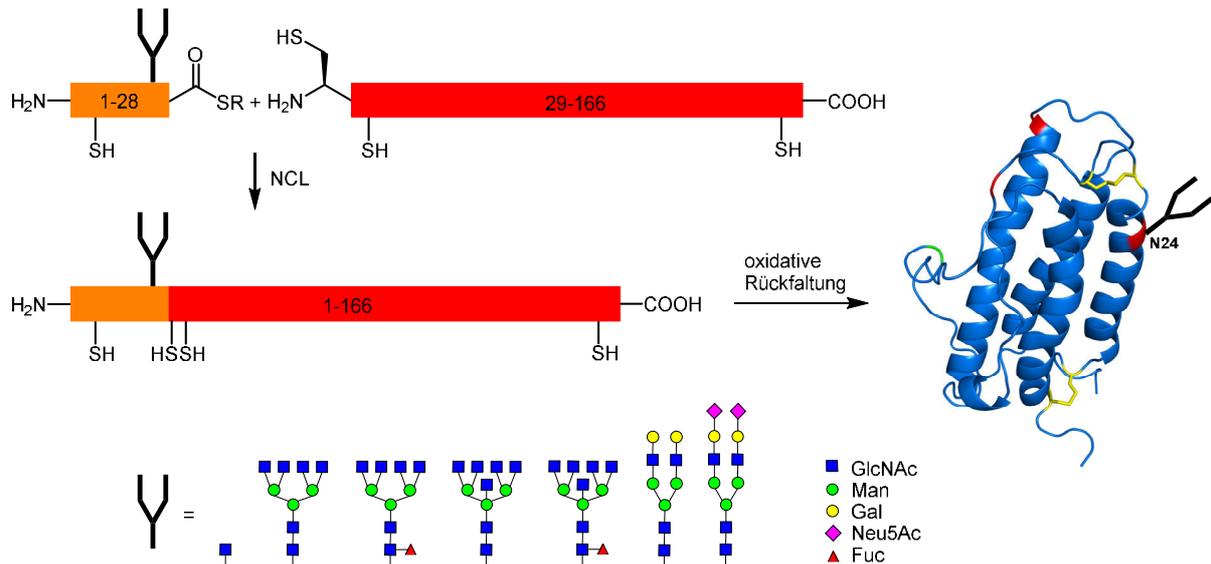


Abbildung 13: Semisynthese von Asn-24-EPO-Glycoformen.^[168]

Das Hauptaugenmerk liegt allerdings auf der Totalsynthese von dreifach *N*-glycosyliertem EPO, wozu *Gross* wichtige Beiträge leistete. Ausgehend von fünf Fragmenten sollten EPO-Glycoformen durch sequentielle NCL dargestellt werden (Abbildung 14). Die Glycopeptide wurden durch Pseudoprolin-vermittelte *Lansbury*-Aspartylierung erhalten. Freies Lys-97

erwies sich aufgrund einer ϵ -Caprolactambildung bei der Thioveresterung als problematisch.^[85] Durch die Verwendung der photolabilen Nvoc-Schutzgruppe konnte *Rozanski* diese Nebenreaktion verhindern.^[169] Der Schutz der nativen Cysteine wurde zunächst durch Acm gewährleistet. Hierbei beobachtete *Gross* eine teilweise Entfernung der Schutzgruppe bei der Desallylierung unter Palladiumkatalyse.^[85] Die Verwendung von Phacm- anstelle von Acm-Schutzgruppen vermied diese Nebenreaktion.^[83,85] Die Entfernung der (Phenyl-)Acetamidomethylgruppen gelang jedoch nur unvollständig, wodurch die letzte NCL nur zu Spuren des Volllängen-EPOs führte.^[83,85] Eine reproduzierbare Strategie für die konvergente Synthese homogener Glycoformen des humanen Erythropoietins muss somit noch gefunden werden.

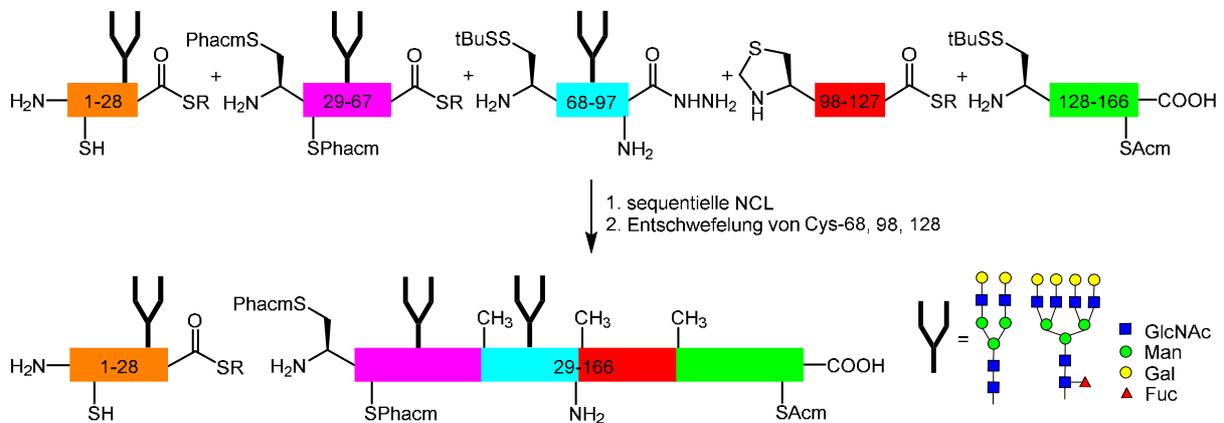


Abbildung 14: Beiträge von *Gross* zur Totalsynthese von dreifach N-glycosyliertem EPO.^[85]

2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Synthese von Glycoformen des humanen Erythropoietins mit komplexen *N*-Glycanen. Neben der Synthese von monoglycosyliertem EPO sollte die Totalsynthese von homogenem dreifach *N*-glycosylierten EPO durch sequentielle NCL untersucht werden (Abbildung 15). Dabei sollten geeignete Schutzgruppen für die nativen Cysteine und das C-terminale Lys-97 gefunden werden.

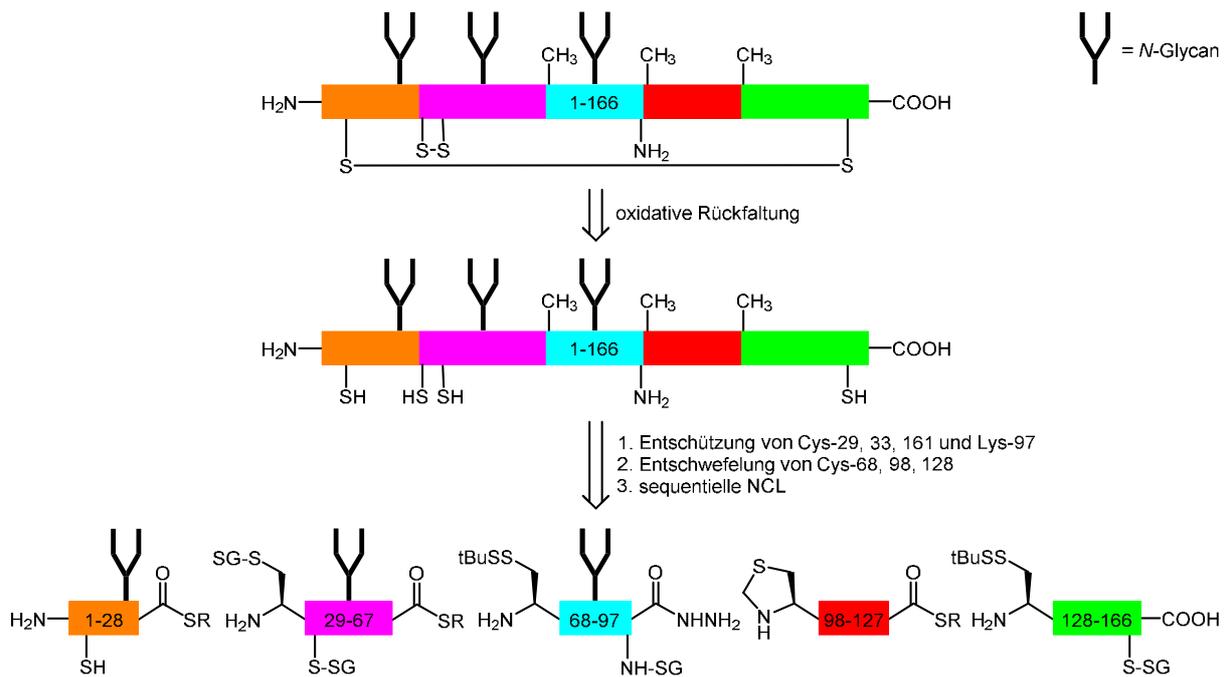


Abbildung 15: Retrosynthese von EPO mit drei komplexen *N*-Glycanen.

3 Synthese eines Glycopeptidhydrazids des IgG1 Fc

Antikörper sind Teil der Immunantwort des Menschen. Eine Subklasse davon sind die Immunglobuline des Typs G (IgG). Sie bestehen aus zwei identischen leichten und schweren Ketten, die disulfidverbrückt sind (Abbildung 16).^[170] IgG1 weist jeweils ein *N*-Glycan in der Fc-Domäne (*crystallizable fragment*) an Asn-297 auf, das die Bindung an IgG-Rezeptoren beeinflusst.^[171] Dieses Saccharid spielt auch eine Rolle bei Autoimmunkrankheiten wie der amyotrophen Lateralsklerose (ALS).^[172,173,174] Die Synthese von homogenen Glycoformen der Fc-Domäne des IgG1 ist wichtig, um den genauen Zusammenhang von Struktur und Wirkung ermitteln zu können und Therapeutika zu entwickeln.

Retrosynthetisch kann das Fc-Dimer in vier Fragmente unterteilt werden. Dabei ist eine Ligation mit anschließender Entschwefelung an Cys-287 notwendig. Das C-terminale Fragment 321-447 ist durch Expression in *E. coli* zugänglich, die weiteren Fragmente können durch Fmoc-SPPS und im Falle des Glycopeptidhydrazids **1** durch *Lansbury*-Aspartylierung erhalten werden (Abbildung 16).

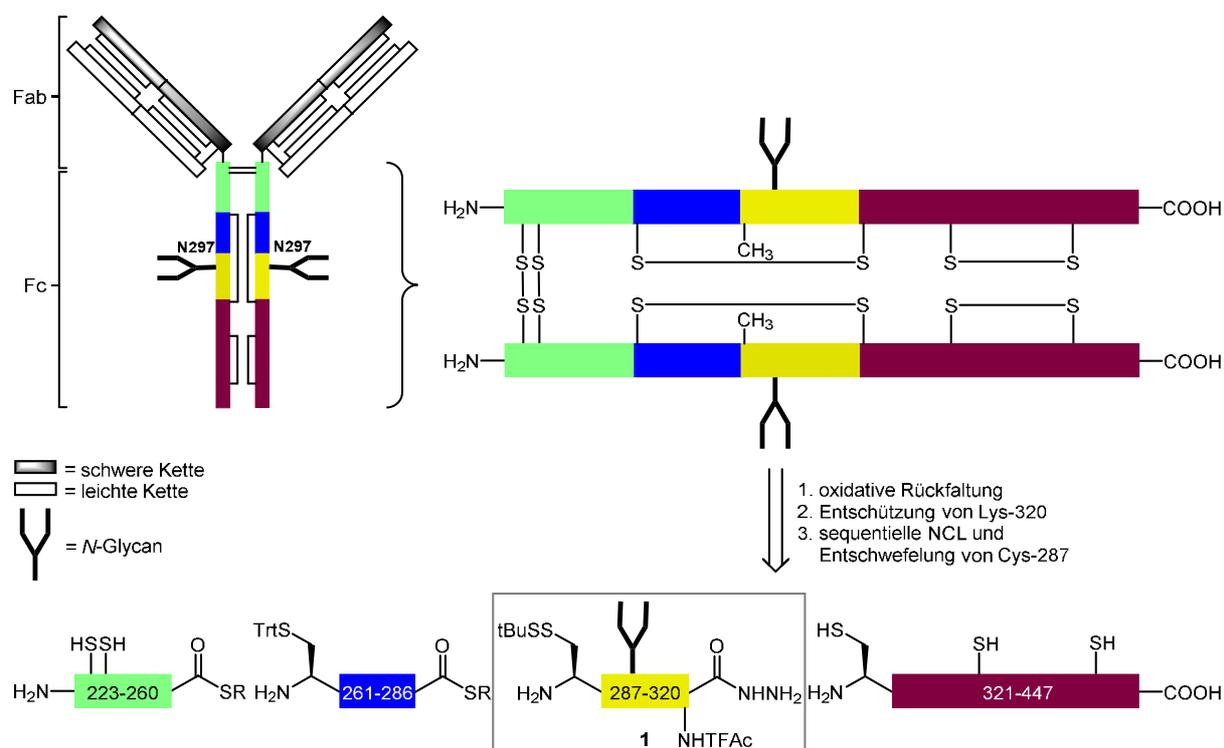


Abbildung 16: Retrosynthese der Fc-Domäne von IgG1.

Rädisch leistete bereits wesentliche Beiträge zur Semisynthese der Fc-Domäne. Durch sequentielle NCL und Entschwefelung konnte ein Fc 223-320 Glycopeptidhydrazid erhalten

werden. Nach Umwandlung des Hydrazids in einen Thioester gelang die finale Ligation jedoch nicht, weil vermutlich eine Cyclisierung des C-terminalen Lysins zum ϵ -Caprolactam erfolgte.^[175] Dieses Problem löste *Wagner* durch Verwendung einer TFAc-Schutzgruppe am Lysin-320, allerdings gelang die spätere Abspaltung der Schutzgruppe nicht vollständig.^[176] Um die Synthese zu optimieren, sollte das Glycopeptidhydrazid Fc 287-320 **1** mit einer TFAc-Schutzgruppe an Lys-320 synthetisiert werden.^[176,177,178] Der Peptidaufbau erfolgte am amphiphilen Trityl-ChemMatrix-Harz **2**. Nach Aktivierung des Linkers an **2** durch 10 % AcBr/DCM wurde Fmoc-Lys(TFAc)-OH angeknüpft. Die Kupplungen der weiteren Aminosäuren erfolgten durch automatisierte Fmoc-SPPS (Abbildung 17).

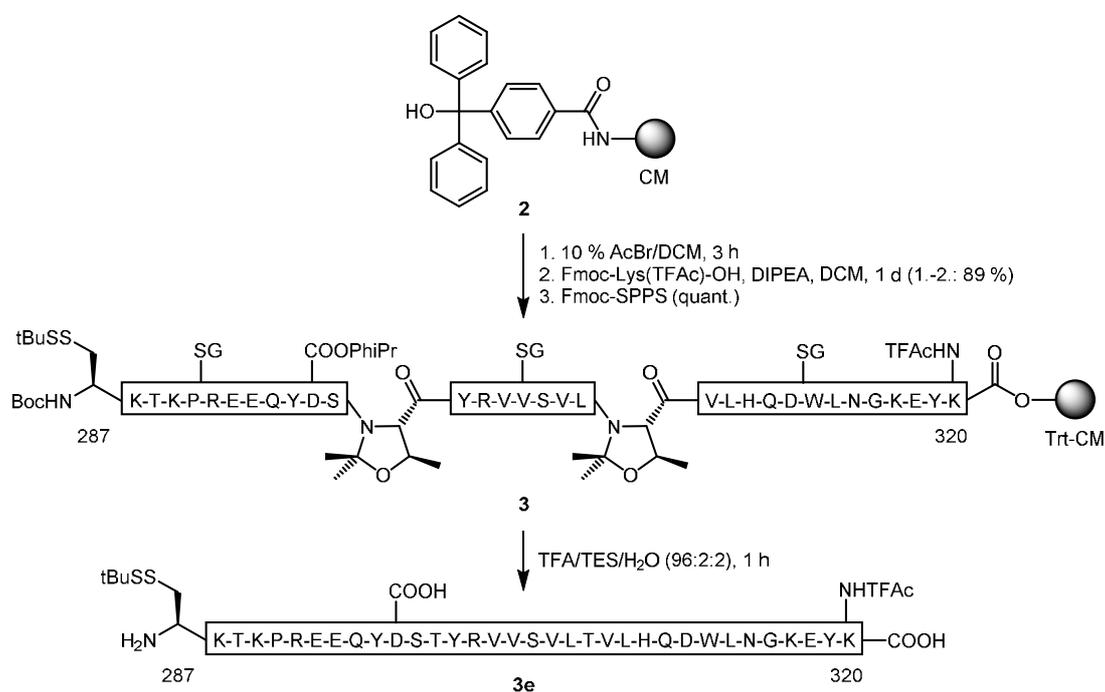


Abbildung 17: Synthese von Fc 287-320 (OPhiPr, TFAc)-Trt-CM **3** und Entschützung.

Zur Vermeidung von Aggregationen und Aspartimidbildung wurden zwei Pseudoprolin-dipeptide verwendet. An der Glycosylierungsstelle wurde Asp-297 mit PhiPr-Schutzgruppe eingebaut. Der PhiPr-Ester kann bereits durch schwache Säuren abgespalten werden und besitzt gegenüber dem Allylester die Vorteile einer leichten Reinigung und der Vermeidung von Schwermetallen bei der Schutzgruppenentfernung.^[55,61,63,83] Um Racemisierungen zu verhindern, wurde Boc-Cys(StBu)-OH als symmetrisches Anhydrid zur Kupplung eingesetzt.^[179] Nach der Peptidelongation ergab sich für das Harz **3** eine quantitative Ausbeute (Fmoc-UV-Absorption). Eine Testentschützung von **3** und nachfolgende LC-MS-Analyse zeigte Fc 287-320 (TFAc) **3e** (Abbildung 18). Dabei war kein Verlust der TFAc-Gruppe zu

beobachten, allerdings war ein Nebenprodukt **3e**+^[44] vorhanden, das um 44 g/mol schwerer war. Da dieser Peak bei mehreren auf gleiche Weise durchgeführten Testentschützungen in unterschiedlichen Mengen auftrat, handelte es sich hierbei vermutlich um ein stabiles Trp-Carbamat, das erst bei längeren Abspaltungszeiten verschwindet.^[180,181,182]

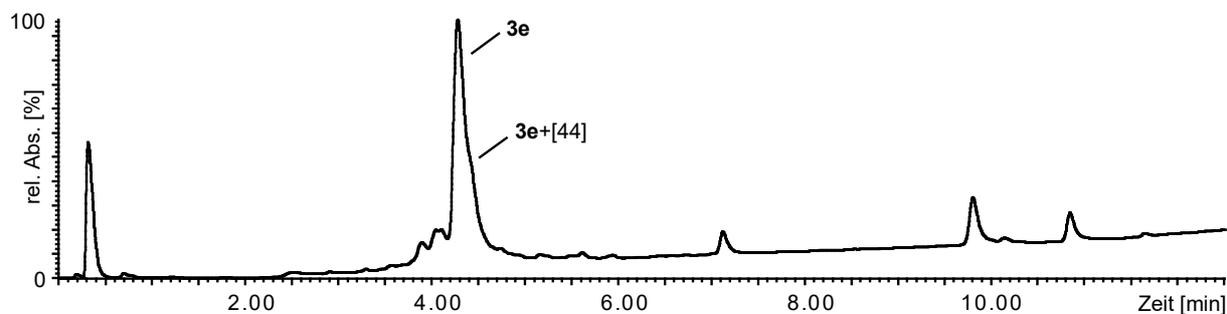


Abbildung 18: RP-UHPLC-Chromatogramm von Fc 287-320 (TFAc) **3e**.

Da bereits 1 % TFA/DCM zur Abspaltung der PhiPr-Schutzgruppe führt, wurde die geschützte Peptidylsäure mit 20 % HFIP/DCM bei 0 °C vom Harz abgespalten. Es erfolgte eine C-terminale Hydrazidierung mit *tert*-Butylcarbazat, DIC, Cl-HOBt und DIPEA in DCM.^[61,83] Nach Aufarbeitung und Reinigung per Flash-Chromatographie wurde das Fc 287-320 Hydrazid **4** in einer Ausbeute von 83 % erhalten (Abbildung 19).

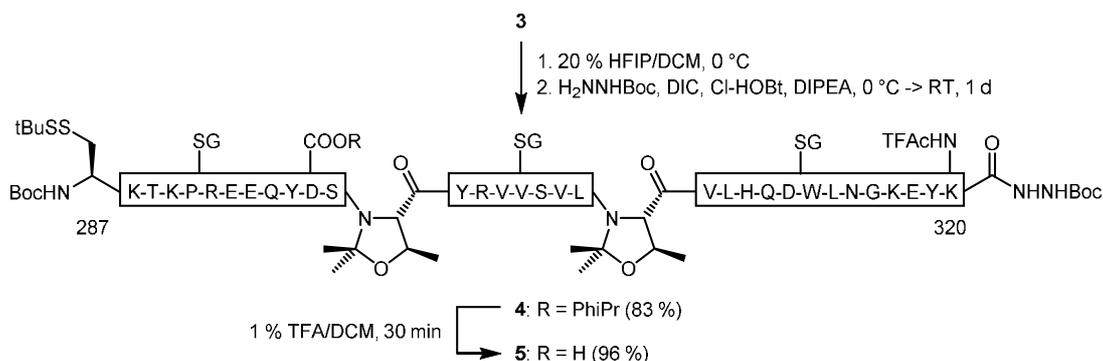


Abbildung 19: Synthese des Fc 287-320 (OPhiPr, TFAc) Hydrazids **4** und PhiPr-Abspaltung.

Das entschützte Hydrazid **4e** zeigte auch ein Nebenprodukt **4e**+^[44] (Abbildung 20). Um eine freie Glycosylierungsstelle für die *Lansbury*-Aspartylierung zu erhalten, wurde die PhiPr-Schutzgruppe mit 1 % TFA/DCM für 30 min abgespalten (Abbildung 19).^[63,83] Die Vollständigkeit der Reaktion wurde per DC überprüft. Die Aufarbeitung erfolgte durch Extraktion gegen wässrige NaCl-Lösung. Nach Trocknung und Entfernung des

Lösungsmittels wurde das Hydrazid **5** mit freiem Aspartat-297 in einer Ausbeute von 96 % erhalten.

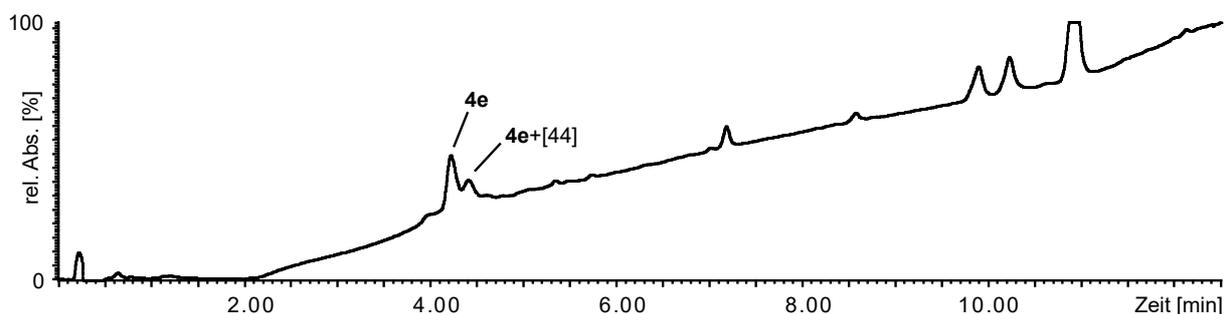


Abbildung 20: RP-UHPLC-Chromatogramm des Fc 287-320 (TFAc) Hydrazids **4e**.

Für die anschließende Glykokupplung wurde das biantennäre Nonasaccharidazid **6** mit 1,3-Propanedithiol in Methanol zum Halbaminal **7** reduziert (Abbildung 21).^[183,184,185,186,187] Nach Aktivierung des freien Aspartats von **5** (1 eq) mit HATU, HOAt und DIPEA in DMF/DMSO (1:1) erfolgte die Kupplung des Glycosylamins **7** (1.5 eq) über 21 h bei 30 °C und anschließend die Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) zum Glycopeptid **1**.

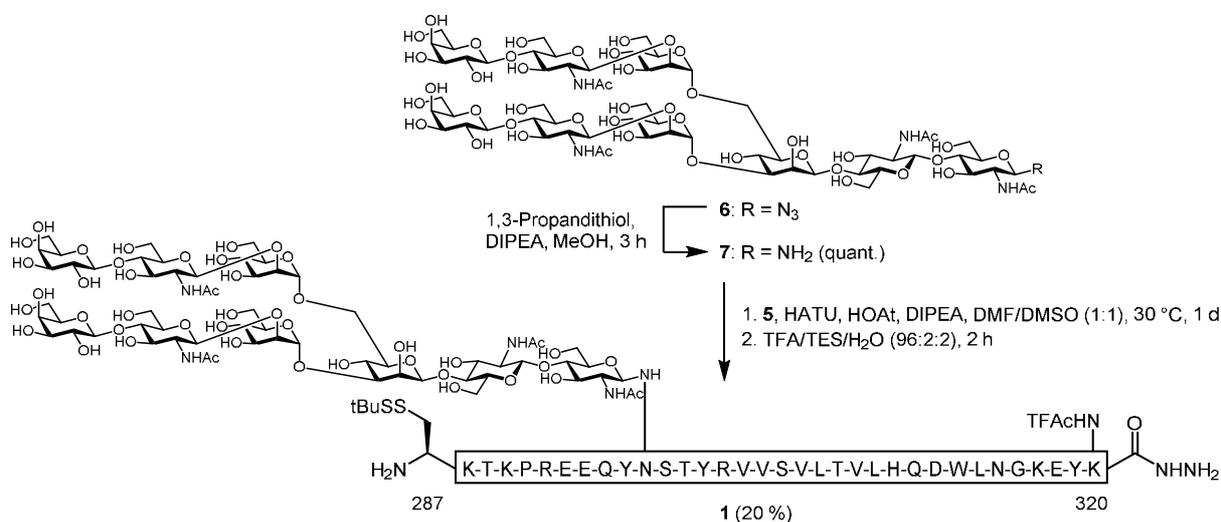


Abbildung 21: Synthese von Fc 287-320 (Nona, TFAc) **1**.

Das Rohprodukt wurde per LC-MS analysiert (Abbildung 22). Im Chromatogramm sind zahlreiche Verunreinigungen zu erkennen, darunter auch ein Aspartimid **4eAI**. Durch RP-HPLC-Reinigung konnten die Verunreinigungen abgetrennt werden und das Glycopeptid Fc 287-320 (Nona, TFAc) **1** wurde in einer Ausbeute von 20 % erhalten. Bezüglich der

Effizienz der Glykokupplung besteht noch Optimierungsbedarf. Diese könnte durch RP-HPLC-Reinigung des Edukts **4** oder **5** verbessert werden.^[188]

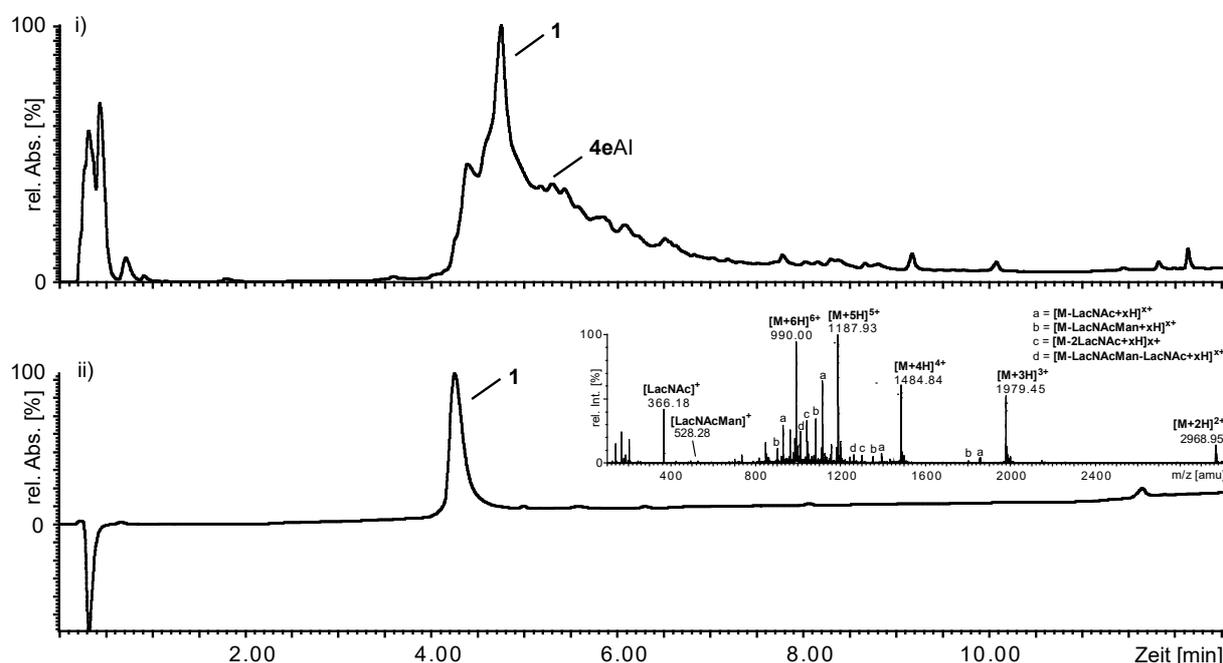


Abbildung 22: i) RP-UHPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **1** und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem Fc 287-320 (Nona, TFAc) **1**.

Die Entfernung der basenlabilen TFAc-Schutzgruppe wurde anschließend untersucht. *Wagner* testete dies mit 0.1 M Piperidin/H₂O, was nach 4 h Reaktionszeit nur zu einer 50 %-igen Abspaltung führte.^[176] Am Glycopeptid **1** wurde dies mit 0.5 M bzw. 1 M Piperidin/H₂O (pH 13) versucht (Abbildung 23).^[189] Die Entschützungen waren bereits nach 1 h vollständig und verliefen nahezu ohne Nebenreaktionen. Auch nach dreistündiger Reaktionsdauer und anschließender Gefriertrocknung ohne Aufarbeitung traten nur wenige Verunreinigungen auf (Abbildung 24).

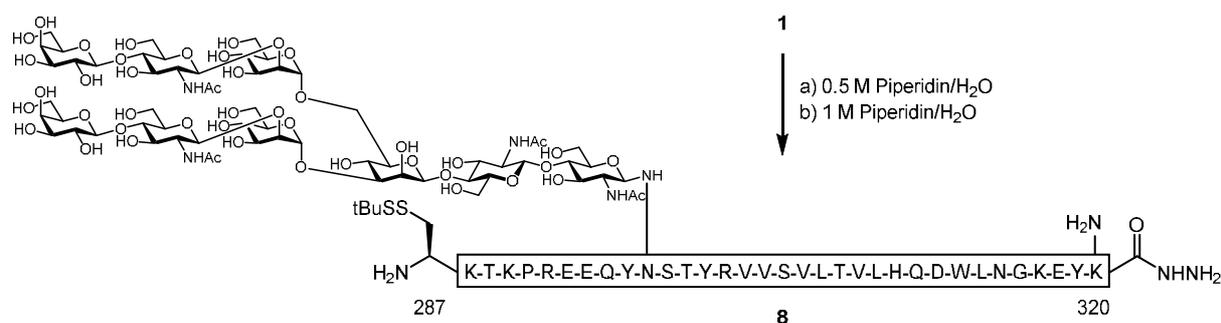


Abbildung 23: Abspaltung der TFAc-Gruppe zu Fc 287-320 (Nona) **8**.

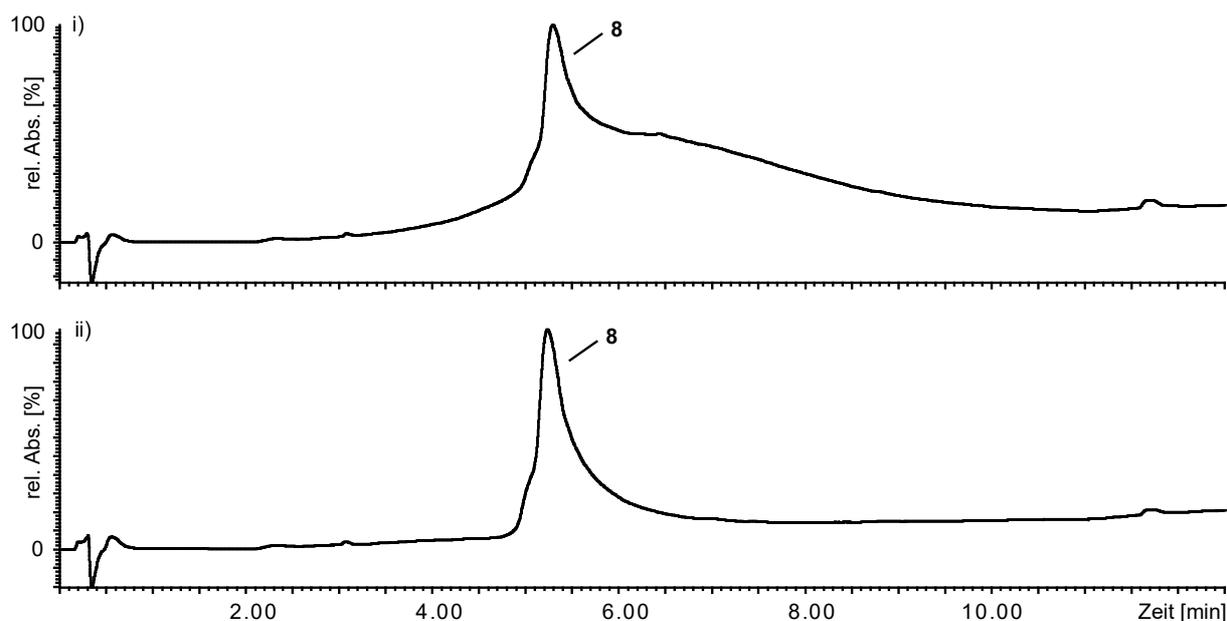


Abbildung 24: RP-UHPLC-Chromatogramme der Reaktionen zu **8** mit i) 0.5 M Piperidin/H₂O und ii) 1 M Piperidin/H₂O nach 3 h und Gefriertrocknung.

Die Entfernung einer TFAc-Schutzgruppe sollte daher auch an der nicht glycosylierten Testverbindung Fc 287-447 (TFAc) **14** untersucht werden. Hierfür wurde das Fc 287-320 Hydrazid **5** entschützt und per RP-HPLC gereinigt. Es ergab sich dabei eine Ausbeute an **4e** von 31 % (Abbildung 25). Anschließend wurde die StBu-Schutzgruppe von **4e** durch TCEP bei pH 6.9 entfernt.^[190] Nach Gelfiltration wurde das Cys-Peptid **9** in einer Ausbeute von 76 % gewonnen. Um Cys-287 für die folgende Ligation zu deaktivieren, wurde eine Tritylgruppe mit Hilfe von Triphenylmethanol (2.5 eq) in HFIP/AcOH (1:1) + 2 % TFA angebracht.^[83,191] Da bei der Tritylierung auch diverse Nebenprodukte gebildet wurden, betrug die Ausbeute an Fc 287-320 (STrt, TFAc) **10** nach RP-HPLC lediglich 14 % (Abbildung 26).

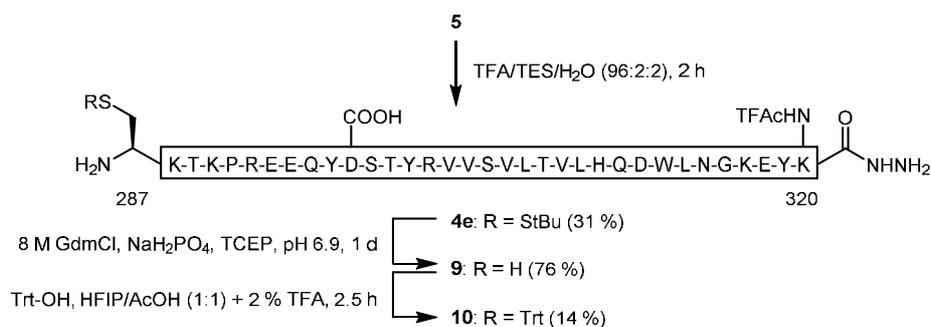


Abbildung 25: Synthese von Fc 287-320 (STrt, TFAc) **10**.

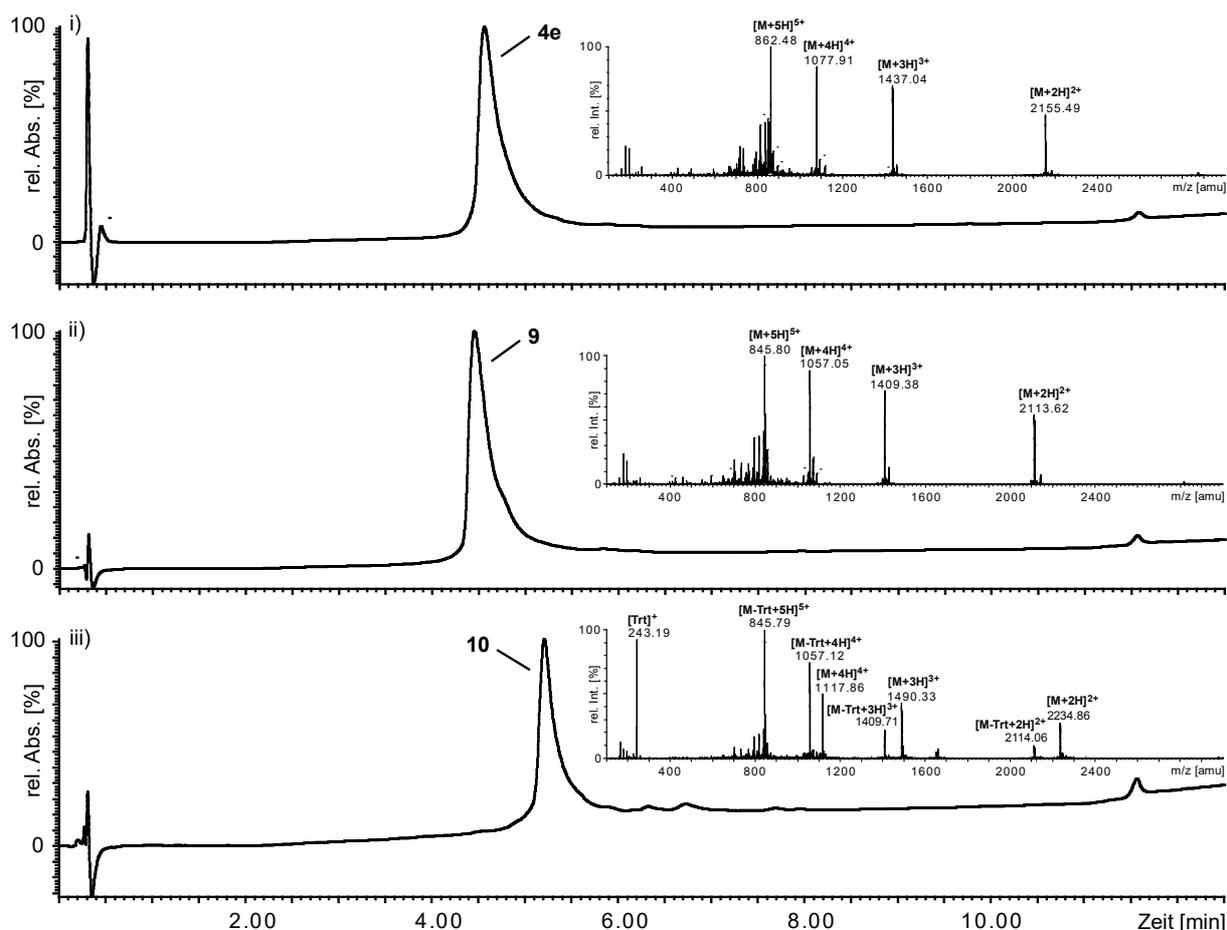


Abbildung 26: RP-UHPLC-MS von gereinigtem i) Fc 287-320 (SStBu, TFAc) **4e**, ii) Fc 287-320 (SH, TFAc) **9** und iii) Fc 287-320 (STrt, TFAc) **10**.

Die Umwandlung von **10** zum Thioester erfolgte durch Diazotierung mit Natriumnitrit bei pH 3 und -24 °C und anschließende Zugabe von 4-(Mercaptomethyl)benzoesäure (MMBA) bei pH 6 und RT (Abbildung 27).^[92] Um Verluste zu minimieren, wurde der Thioester **11** durch Gelfiltration gereinigt (73 % Ausbeute, 71 % Reinheit). Der Thioester **11** sollte mit dem rekombinant exprimierten Cys-Peptid Fc 321-447 **13** ligiert werden.^[192] An N-terminalen Cysteinen kann es nachträglich zur Bildung von Thiazolidinderivaten kommen.^[168] Um zu gewährleisten, dass ein freies Cystein vorliegt, wurde das Proteinfragment Fc 321-447 **13** mit Methoxyamin bei pH 3.4 für 1 d behandelt.^[95,99,168] Nach einer Reduktion mit TCEP und anschließender Reinigung per RP-HPLC ergab sich für Fc 321-447 **13** eine quantitative Ausbeute. Im LC-MS-Chromatogramm sind zwei Peaks zu sehen, die Produkten mit der gleichen Masse entsprechen. Dabei handelt es sich vermutlich um Fc 321-447 **13** mit *cis*- und *trans*-Konformeren, was auf die 10 Prolinreste in der Aminosäuresequenz zurückgeführt werden kann.

Synthese eines Glycopeptidhydrazids des IgG1 Fc

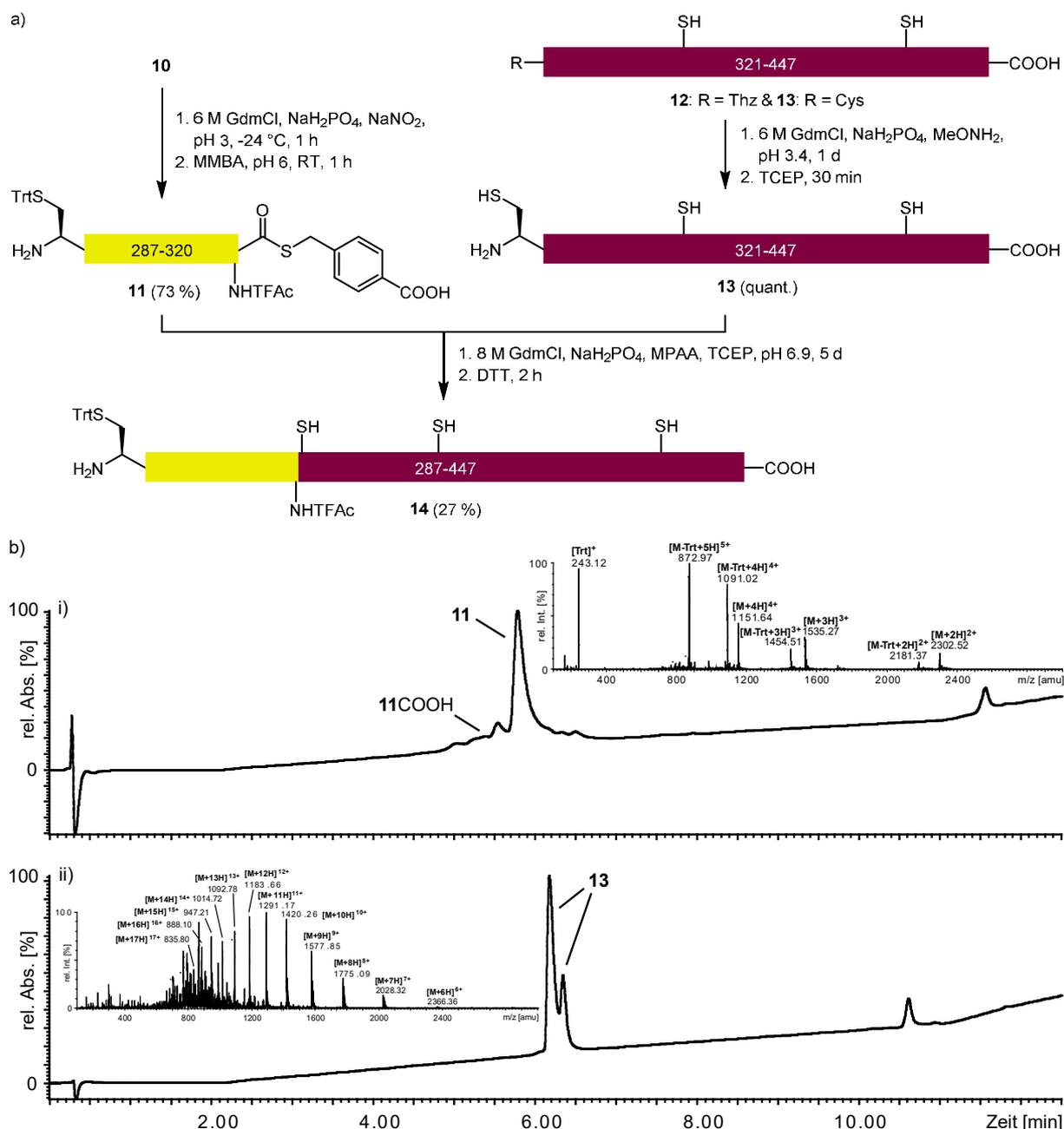


Abbildung 27: a) Synthese von Fc 287-320 (STrt, TFAc) **14** und b) RP-UHPLC-MS von gereinigtem i) Fc 287-320 (STrt, TFAc) MMBA **11** und ii) Fc 321-447 **13**.

Der Fc 287-320 (STrt, TFAc) Thioester **11** (1 eq) wurde mit Fc 321-447 **13** (1.5 eq) ligiert. Die NCL erfolgte unter Inertgasatmosphäre im Phosphatpuffer mit 8 M Guanidiniumchlorid bei pH 6.9 (Abbildung 27). Nach 5 d wurde DTT zugegeben und das Ligationsprodukt **14** per RP-HPLC gereinigt. In den LC-MS-Chromatogrammen ist **14** als Doppelpeak zu sehen (Abbildung 28). Das im Überschuss zugegebene Cys-Peptid **13** und weitere Verunreinigungen konnten durch RP-HPLC abgetrennt werden, wodurch **14** in guter Reinheit und 27 % Ausbeute gewonnen wurde. Die TFAc-Schutzgruppe für Lys-320 war bei der NCL stabil.

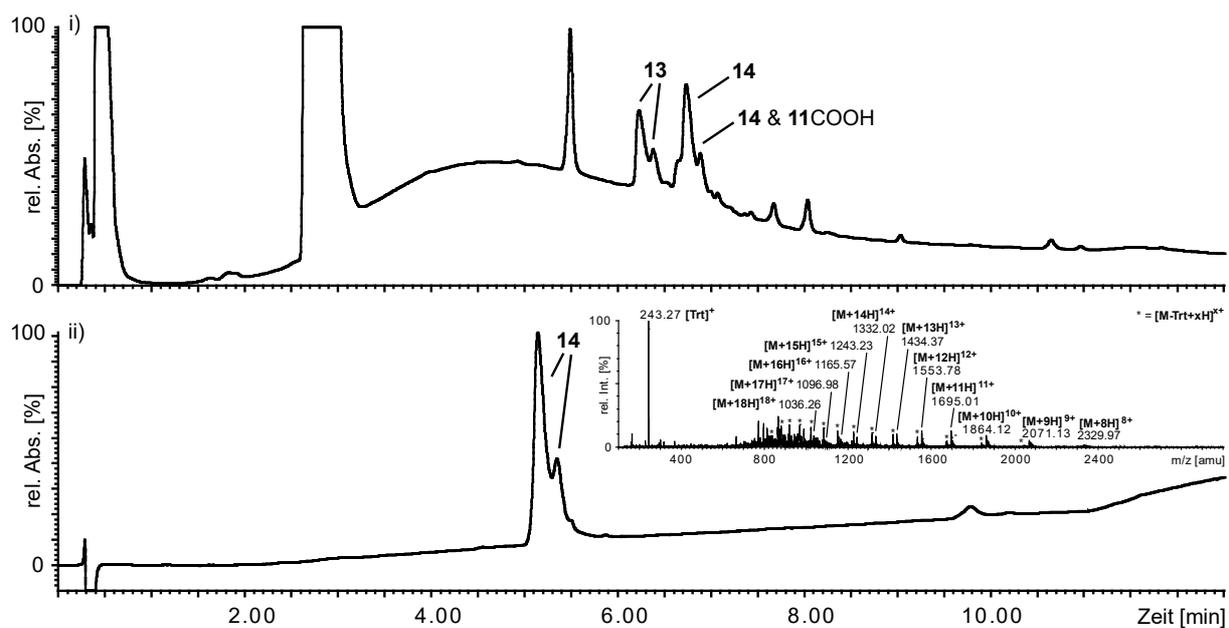


Abbildung 28: i) RP-UHPLC-Chromatogramm der NCL zu **14** nach 5 d und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem Fc 287-447 (STrt, TFAc) **14**.

Die Abspaltung der internen TFAc-Schutzgruppe an Fc 287-447 **14** wurde mit 0.5 M Piperidin/H₂O (pH 13) versucht (Abbildung 29). Die TFAc-Schutzgruppe des 161 Aminosäuren umfassenden Ligationsprodukts **14** war nach 1 h vollständig entfernt und lieferte Produkt **15** als Doppelpeak (Abbildung 30). Nach einer Reaktionszeit von 3 h und anschließender Gefriertrocknung zeigten sich jedoch Nebenprodukte.

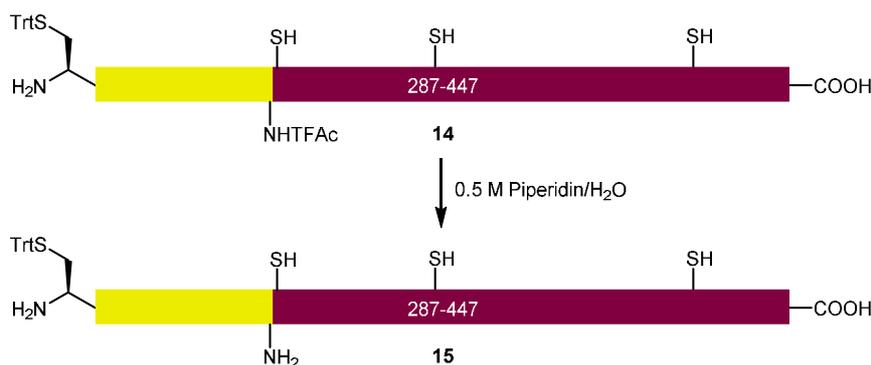


Abbildung 29: Abspaltung der TFAc-Gruppe von Fc 287-447 (STrt) **14**.

Die Synthese und Entschützung des Testpeptids **14** zeigte, dass die TFAc-Schutzgruppe an Lys-320 die ϵ -Caprolactambildung verhindert und nach der Ligation unter kontrollierten Bedingungen abgespalten werden sollte.

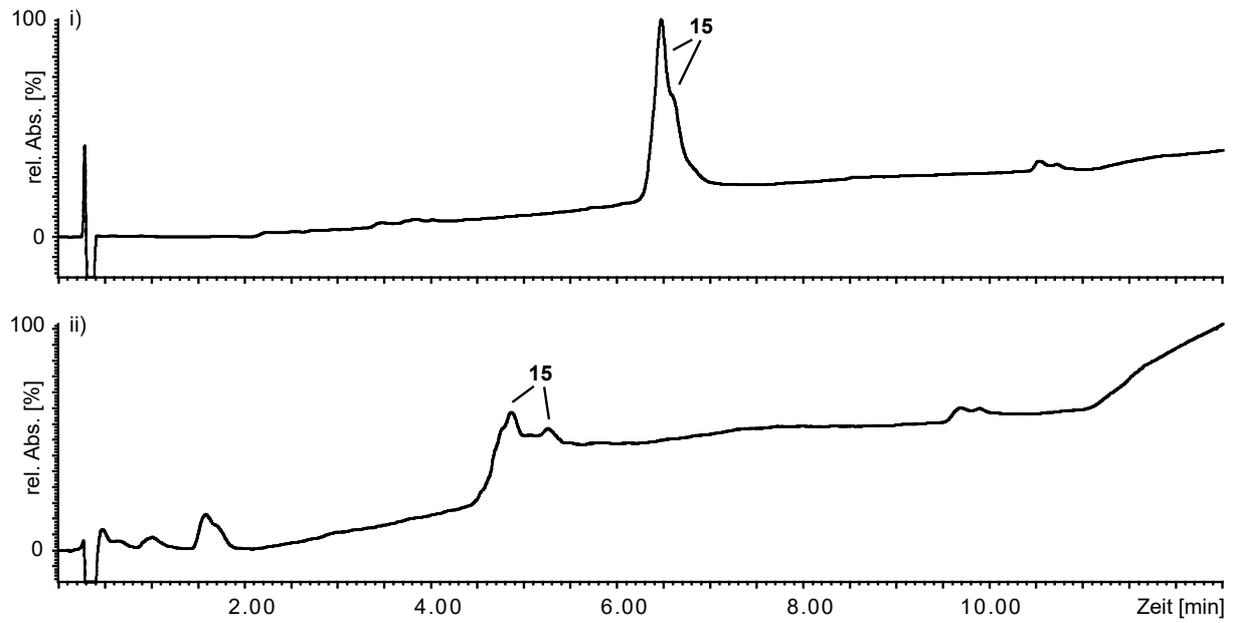


Abbildung 30: RP-UHPLC-Chromatogramme der Abspaltung der TFAc-Gruppe zu Fc 287-447 (STrt) **15** nach i) 1 h und ii) 3 h und Gefriertrocknung.

4 Semisynthese von einfach glycosyliertem Erythropoietin

Um den Einfluss der *N*-Glycanstruktur auf die Aktivität von humanem Erythropoietin untersuchen zu können, sollte EPO **A** mit einem α -2,6-sialylierten komplexen biantennären *N*-Glycan an Asn-24 synthetisiert werden. Retrosynthetisch ist das monoglycosylierte EPO **A** auf die beiden Fragmente **B1** und **C** zurückzuführen, die durch NCL verknüpft werden können. EPO 1-28 (Undeca) **B1** kann konvergent synthetisiert werden. EPO 29-166 **C** ist durch Expression in *E. coli* zugänglich (Abbildung 31). *Gottwald* gelang bereits die Semisynthese und Charakterisierung von sieben Asn-24 Glycoformen von EPO. Um weiteres Material bereitzustellen, sollte sialyliertes EPO (Undeca) **A** im größeren Maßstab dargestellt werden.^[168]

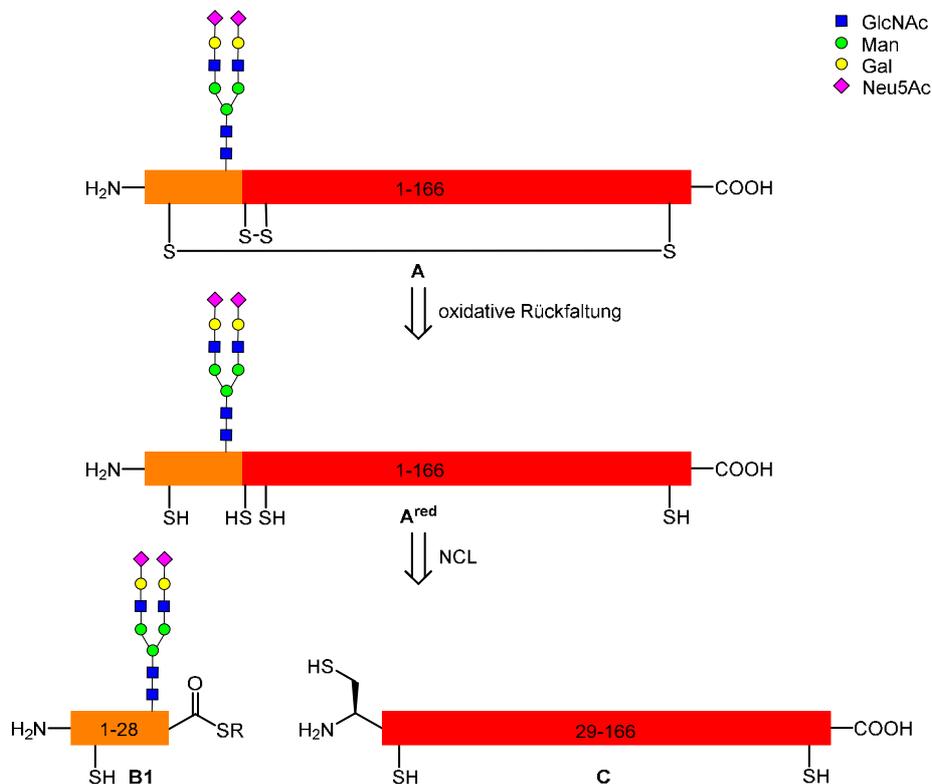


Abbildung 31: Retrosynthese von EPO (Undeca) **A**.

4.1 Synthese von EPO 1-28 Glycopeptidthioestern

Die Synthese des EPO 1-28 Peptids erfolgte durch automatisierte Fmoc-SPPS am Trityl-ChemMatrix-Harz **2** unter Verwendung von zwei Pseudoprolindipeptiden zur Aspartimid- und Aggregationsunterdrückung. Zum Schutz der Glycosylierungsstelle Asp-24 wurde die

orthogonale Allylgruppe eingesetzt. Fmoc-Cys(Trt)-OH wurde als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Die Ausbeute an Harz **16** betrug nach Peptidelongation 93 %. Eine geringe Menge an **16** wurde entschützt und per LC-MS analysiert. Das RP-HPLC-Chromatogramm zeigte EPO 1-28 (OAll) **16e** sowie eine Ile/Leu-Deletion **16e-Ile/Leu** und ein um 48 g/mol schwereres Nebenprodukt **16eSO₃H** (Abbildung 32). Bei den ab 24 min eluierenden Peaks handelte es sich um die abgespaltenen Schutzgruppen.

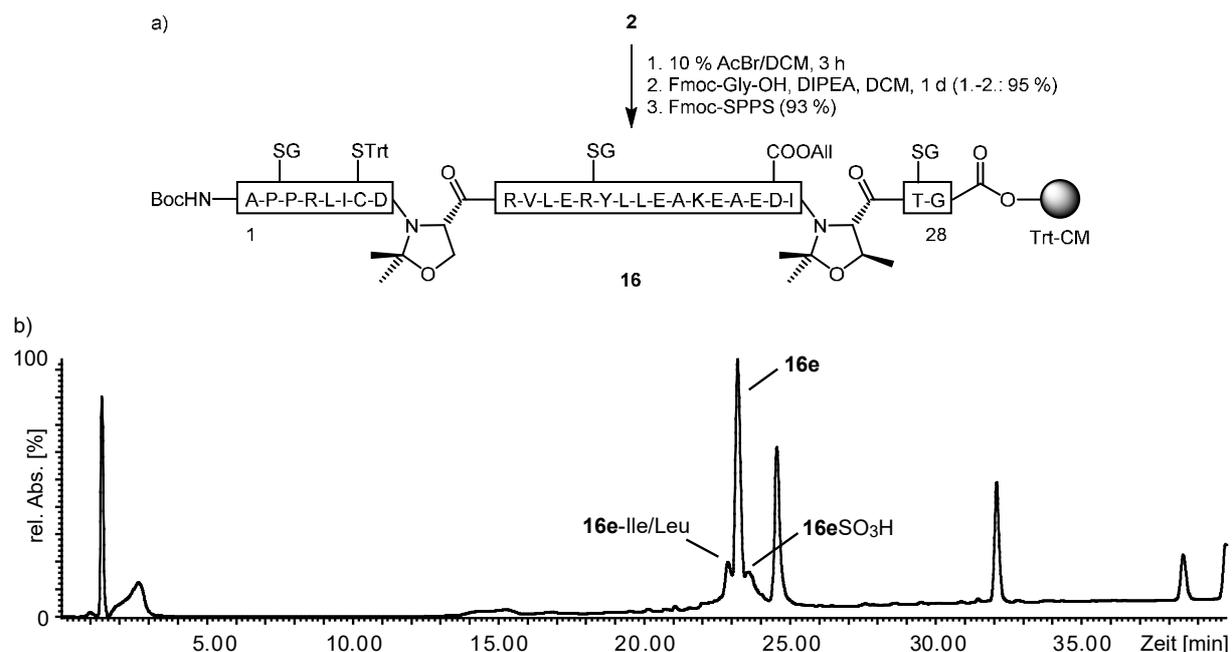


Abbildung 32: a) Synthese von EPO 1-28 (OAll)-Trt-CM **16** und b) RP-HPLC-Chromatogramm von **16e**.

Die geschützte Peptidylsäure wurde mit 1.5 % TFA/2 % TES/DCM vom Harz abgespalten und *in situ* mit *tert*-Butylcarbazat, DIC, Cl-HOBt und DIPEA zum Hydrazid **17** umgesetzt (Abbildung 33).^[81,84,85] Nach Extraktion gegen wässrige NaCl-Lösung und Reinigung per Flash-Chromatographie ergab sich für das EPO 1-28 (OAll) Hydrazid **17** eine Ausbeute von 55 %. Die Testentschützung zeigte das entschützte Produkt **17e** sowie **17e-Ile/Leu** und **17eSO₃H**.

Vor der Aspartylierung wurde die Allylschutzgruppe an der Glycosylierungsstelle Asp-24 entfernt. Dies erfolgte mit dem an einer Polyureamatrix immobilisierten Palladiumacetat Pd^{II}EnCat® und einem Phosphinliganden. Im Gegensatz zu löslichen Pd-Katalysatoren wie Pd⁰(PPh₃)₄ kann das festphasengebundene Palladium sehr effektiv aus der Reaktionsmischung entfernt werden.^[58,59] Als Phosphinligand wurde zunächst der (*R,R*)-DACH-Phenyl-Trost-Ligand verwendet, mit dem sich eine Ausbeute an desallyliertem EPO 1-28 (OH) Hydrazid **19**

von 67 % ergab (Daten nicht gezeigt). Durch Verwendung von [2-(Dicyclohexylphosphino)ethyl]trimethylammoniumchlorid (DCHT) **18** konnte die Ausbeute auf 84 % gesteigert werden. Um den Allylrest abzufangen wurde Phenylsilan als Scavenger zugegeben.^[58] Der Reaktionsfortschritt wurde per DC verfolgt. Nach vollständiger Abspaltung wurden die Pd-Mikrokapseln abfiltriert und das Rohprodukt **19** per Flash-Chromatographie gereinigt. Das gereinigte Produkt **19** wurde als **19e** zusammen mit **19e-Ile/Leu** und **19eSO₃H** nachgewiesen.

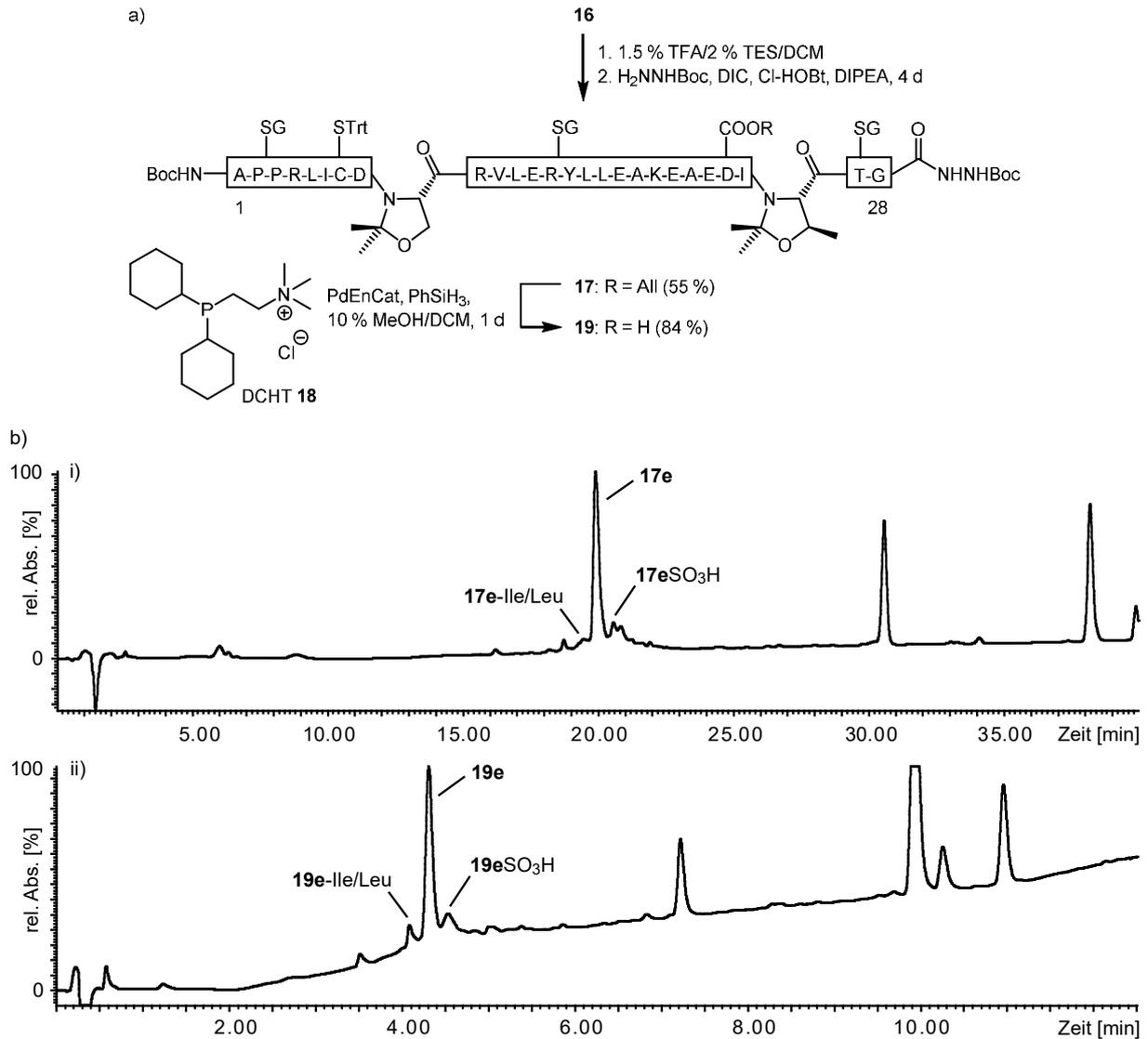


Abbildung 33: a) Synthese des EPO 1-28 (OAll) Hydrazids **17** und Allylabsplung und b) i) RP-HPLC-Chromatogramm von **17e** und ii) RP-UHPLC-Chromatogramm von **19e**.

Die Eignung verschiedener Aktivierungsreagenzien für die *Lansbury*-Aspartylierung von **19** wurde mit GlcNAc-NH₂ **21** als Kupplungspartner getestet (Abbildung 34). Die anschließende *in situ*-Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) lieferte Glycopeptid **22**, das per RP-HPLC

gereinigt wurde. Zur Aktivierung wurden HATU/HOAt, PyAOP sowie DMTMM **20** verwendet.^[193,194,195,196]

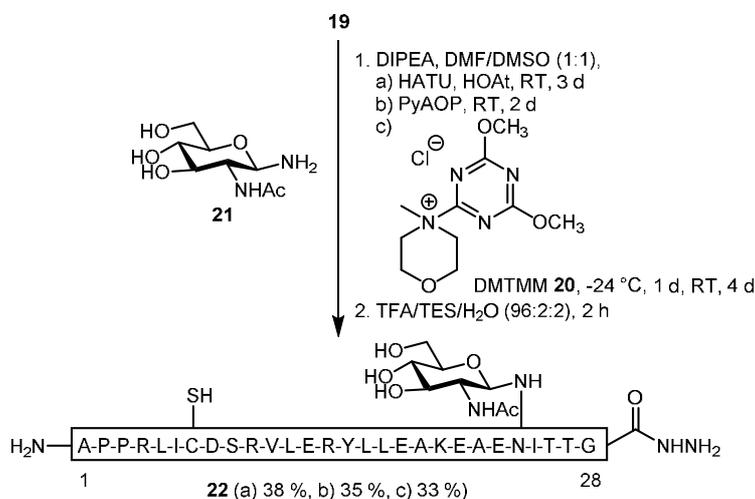


Abbildung 34: Synthese von EPO 1-28 (GlcNAc) **22** unter Verwendung von a) HATU/HOAt, b) PyAOP und c) DMTMM **20** als Aktivierungsreagenz.

Die LC-MS-Chromatogramme der Rohprodukte **22** nach Etherfällung waren bei den drei Reaktionen ähnlich. Neben **22** waren Edukt **19e** und die Ile/Leu-Deletion **22-Ile/Leu** zu sehen (Abbildung 35, Abbildung 36 und Abbildung 37).

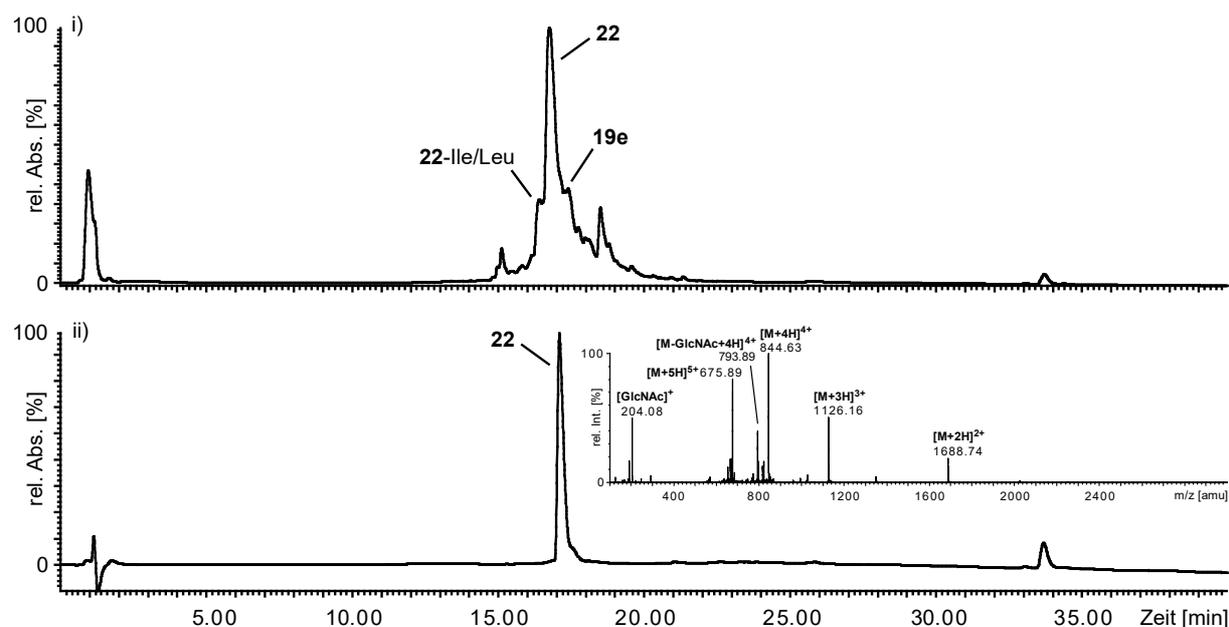


Abbildung 35: i) RP-HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **22** und ii) RP-HPLC-MS von gereinigtem EPO 1-28 (GlcNAc) **22** nach Verwendung von HATU als Aktivierungsreagenz.

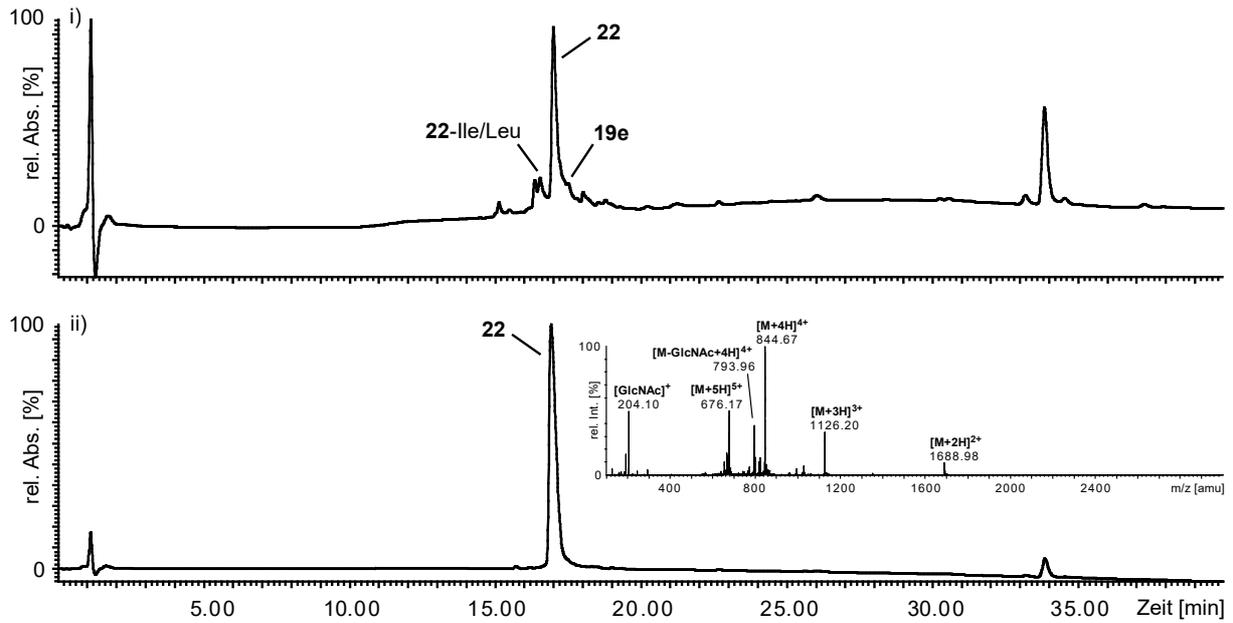


Abbildung 36: i) RP-HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **22** und ii) RP-HPLC-MS von gereinigtem EPO 1-28 (GlcNAc) **22** nach Verwendung von PyAOP als Aktivierungsreagenz.

Durch RP-HPLC-Reinigung konnten die Verunreinigungen abgetrennt werden und EPO 1-28 (GlcNAc) **22** wurde in allen drei Fällen in guter Reinheit erhalten.

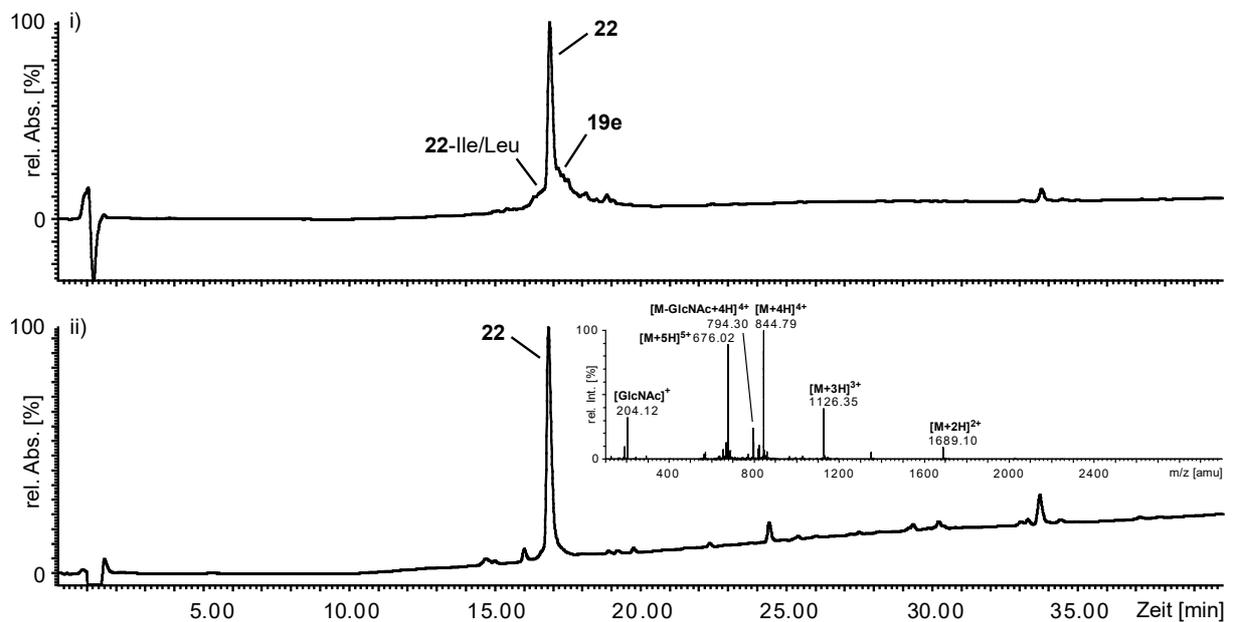


Abbildung 37: i) RP-HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **22** und ii) RP-HPLC-MS von gereinigtem EPO 1-28 (GlcNAc) **22** nach Verwendung von DMTMM **20** als Aktivierungsreagenz.

Obwohl das Rohchromatogramm bei Verwendung von HATU/HOAt mehr Verunreinigungen aufwies, wurde hierbei die höchste Ausbeute (38 %) erzielt. Bei PyAOP betrug die Ausbeute 35 % und bei DMTMM **20** 33 %. Beim Einsatz von DMTMM war das Produkt **22** nach RP-HPLC-Reinigung stärker verunreinigt als bei den anderen Aktivierungsreagenzien. HATU/HOAt ist somit PyAOP und DMTMM **20** vorzuziehen. Auch aufgrund der höheren Instabilität von PyAOP stellt HATU das Aktivierungsreagenz der Wahl dar.^[197]

Unter Verwendung von HATU/HOAt zur Aktivierung von EPO 1-28 (OH) **19** (1 eq) erfolgte anschließend die Kupplung des Nonasaccharidamins **7** (1.5 eq) mit DIPEA in DMF/DMSO (1:1). Nach *in situ*-Entschützung und Etherfällung wurde **23** per RP-HPLC gereinigt (21 % Ausbeute). Nicht umgesetztes Edukt **19e** und die Ile/Leu-Deletion **23-Ile/Leu** konnten abgetrennt werden (Abbildung 38).

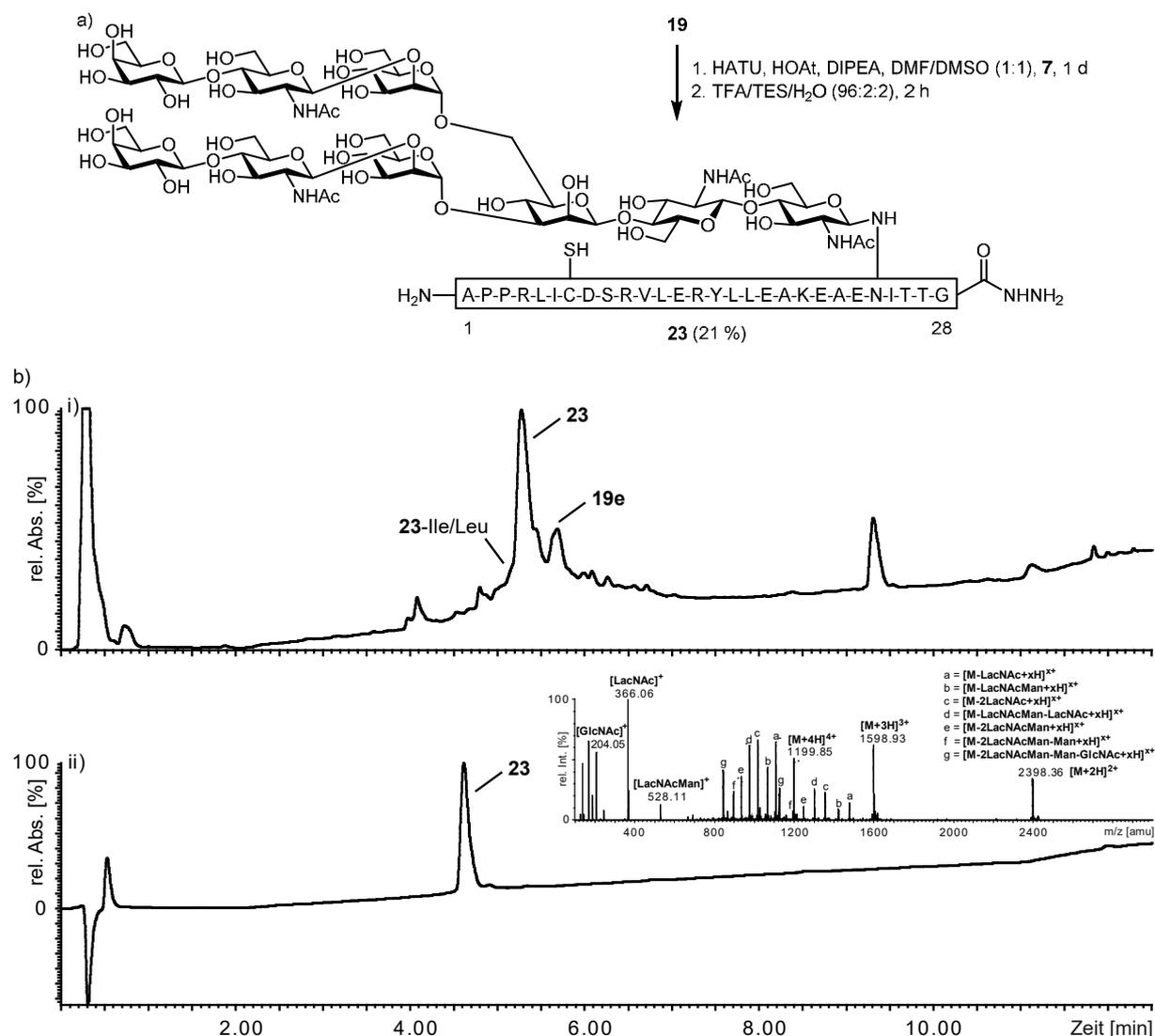


Abbildung 38: a) Synthese von EPO 1-28 (Nona) **23** und b) i) RP-UHPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **23** und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem **23**.

Das Glycopeptidhydrazid **23** wurde anschließend mit Natriumnitrit im denaturierenden Phosphatpuffer (pH 3) bei $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ diazotiert und mit MMBA bei pH 6 und RT zum Thioester **B2** umgesetzt.^[92] Es folgte eine Gelfiltration, die noch geringe Verunreinigungen im Produkt zurückließ. Durch RP-HPLC wurde reines EPO 1-28 (Nona) MMBA **B2** in einer Ausbeute von 63 % erhalten (Abbildung 39).

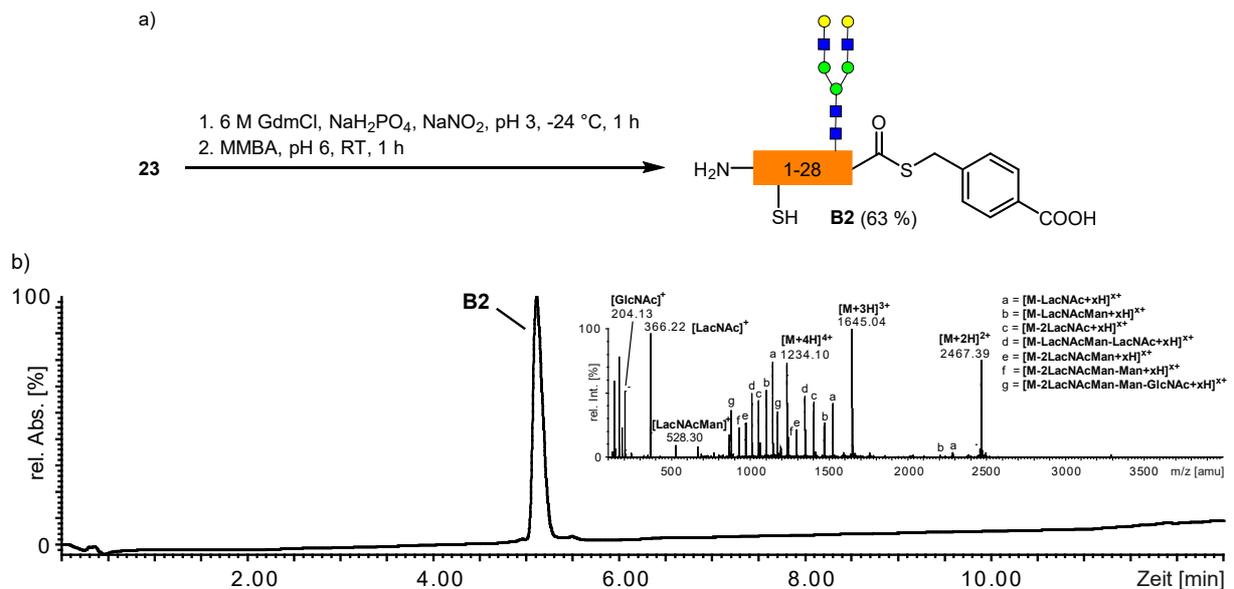


Abbildung 39: a) Synthese von EPO 1-28 (Nona) MMBA **B2** und b) RP-UHPLC-MS von RP-HPLC-gereinigtem **B2**.

Als Baustein für die Semisynthese der sialylierten Glycoform EPO (Undeca) **A** wurde der sialylierte EPO 1-28 Thioester **B1** benötigt. Die *Lansbury*-Aspartylierung von ungeschützten sialylierten Oligosacchariden ist nicht effizient. Sialylierte Glycopeptide sind jedoch gut durch enzymatische Sialylierung zugänglich. Die α -2,6-Sialylierung des Hydrazids **23** wurde nach der Methode von *Perkams* durchgeführt. Nach Lösen des Glycopeptids **23** (4 mM) in Tris-HCl-Puffer (pH 9) wurden 3 eq CMP-Neu5Ac, alkalische Phosphatase (CIAP) und α -2,6-Sialyltransferase (ST6) (*Photobacterium damsela*) zugegeben. Es wurden noch dreimal nach jeweils 15 min je 3 eq CMP-Neu5Ac (insgesamt 12 eq) hinzugefügt.^[186] Die Reaktion fand bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Thermoschüttler statt und war nach 1 h vollständig. Anschließend wurde DTT zugegeben und das Rohprodukt **24** per Gelfiltration gereinigt. Aufgrund der Säurelabilität der Sialinsäuren wurde bei den Reinigungen von sialylierten Verbindungen Ameisensäure (0.1 %) anstelle von TFA als Zusatz verwendet. EPO 1-28 (Undeca) **24** wurde in guter Reinheit und einer Ausbeute von 78 % gewonnen (Abbildung 40).

Semisyntese von einfach glycosyliertem Erythropoietin

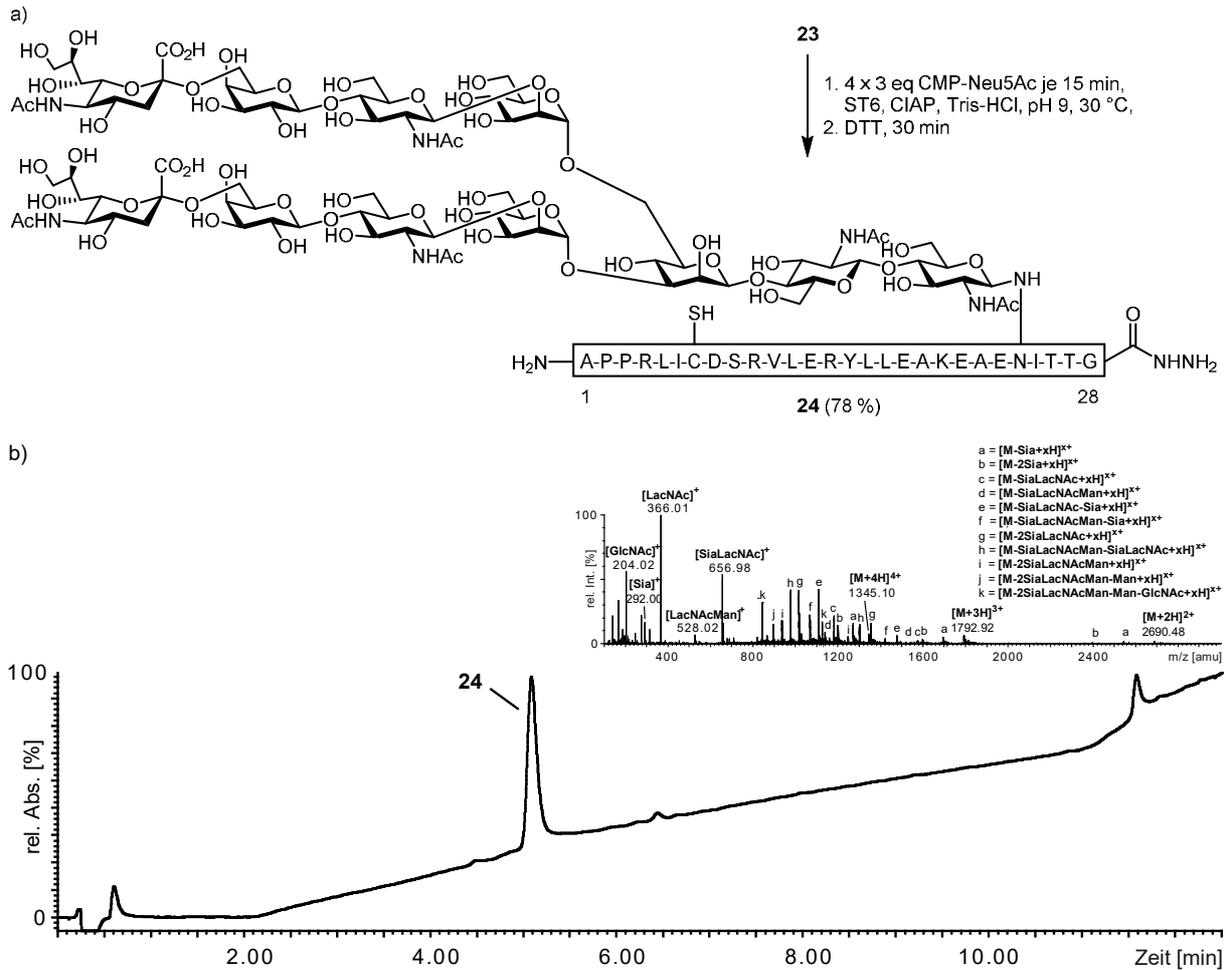


Abbildung 40: a) Synthese von EPO 1-28 (Undeca) **24** und b) RP-UHPLC-MS von gereinigtem **24**.

Die Thioveresterung zu **B1** erfolgte durch Diazotierung des Hydrazids **24** und Thiolyse mit MMBA (Abbildung 41). Die anschließende Gelfiltration lieferte EPO 1-28 (Undeca) MMBA **B1** in einer Reinheit von 72 % und einer Ausbeute von 58 %. Im LC-MS-Chromatogramm sind das Thiolacton **B1**Thiolacton, die Peptidylsäure **B1**COOH und das MMBA-Disulfid **B1**+MMBA zu erkennen (Abbildung 42).

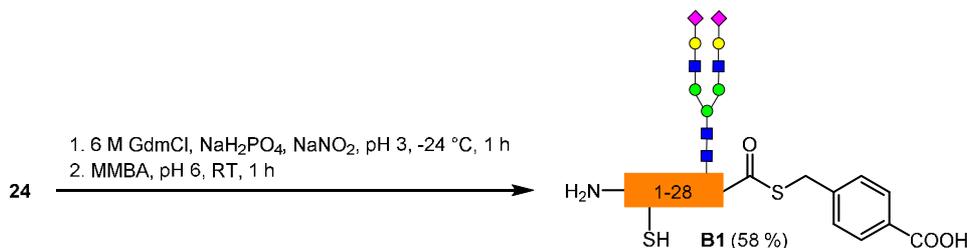


Abbildung 41: Synthese von EPO 1-28 (Undeca) MMBA **B1**.

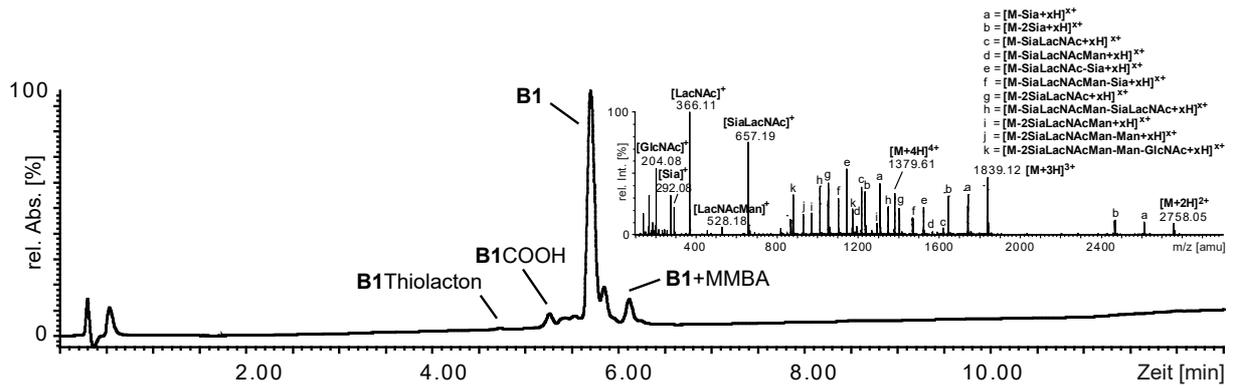


Abbildung 42: RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 1-28 (Undeca) MMBA B1.

4.2 Ligation und Rückfaltung der sialylierten EPO Glycoform A

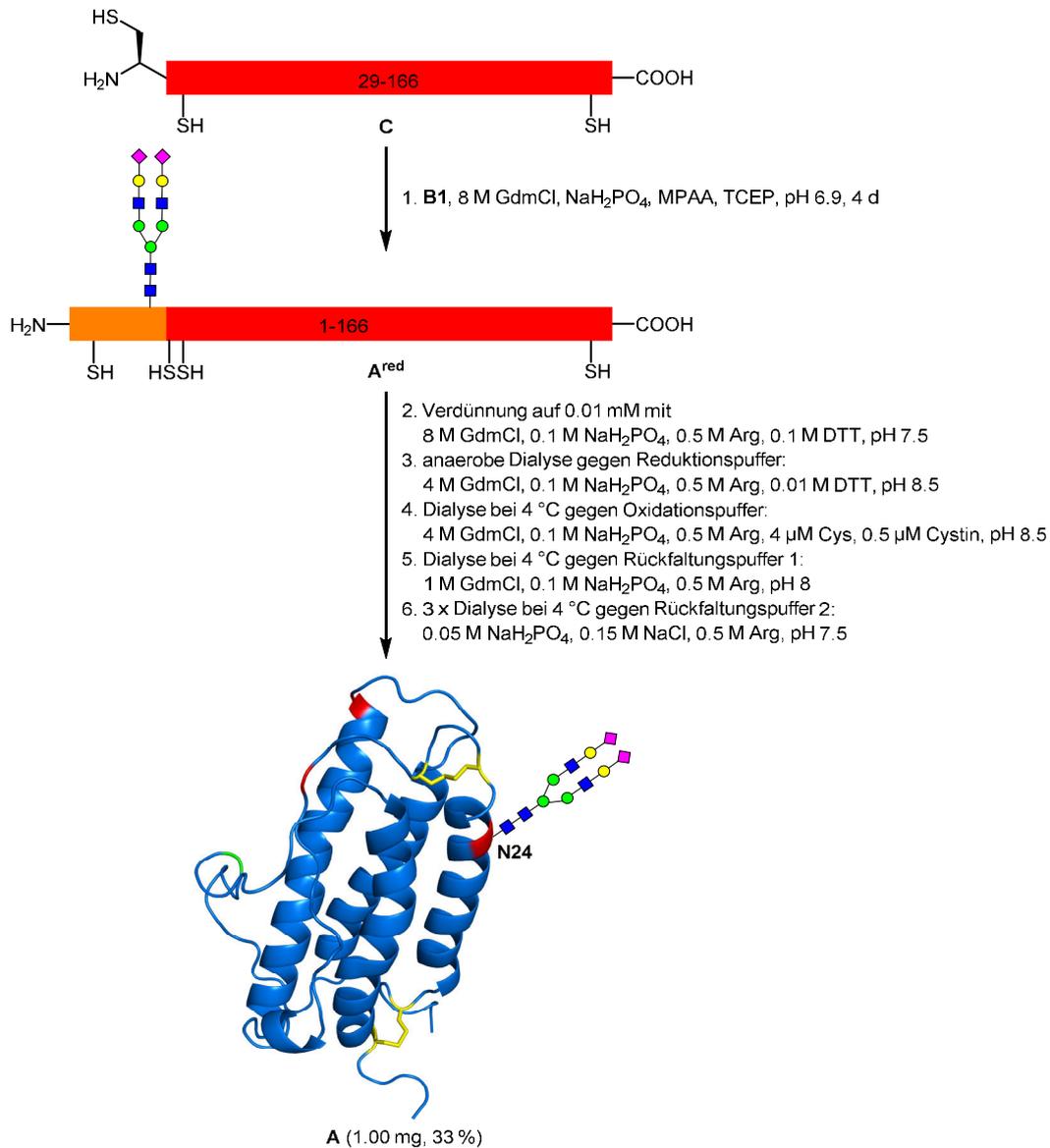


Abbildung 43: Ligation und Rückfaltung von EPO (Undeca) A.

Zur Darstellung von EPO **A** wurde der EPO 1-28 Thioester **B1** (1.1 eq) mit dem durch Expression in *E. coli* gewonnenen Cys-Fragment EPO 29-166 **C** (1 eq) verknüpft. Das Fragment **C** wurde von *Rau* bereitgestellt.^[192] Die NCL zu EPO 1-166 **A^{red}** erfolgte unter Inertgasatmosphäre im Phosphatpuffer mit 8 M GdmCl bei pH 6.9 (Abbildung 43). Im LC-MS-Chromatogramm nach 3 d waren neben dem Ligationsprodukt **A^{red}** freie Säure **B1COOH** und restliches Cys-Fragment **C** zu sehen (Abbildung 44). Da die Ligation keinen weiteren Fortschritt zeigte, wurde nach 4 d die Ligationmischung nach der optimierten Methode von *Gottwald* zurückgefaltet.^[168] Nach Verdünnung der Reaktion unter Reduktion der Cysteine folgte die Oxidation durch einen Cystein-Cystin-*Shuffle*.^[168,198] Arginin wurde als Faltungshelfer zugesetzt und die Konzentration an Guanidiniumchlorid stufenweise durch Dialyse verringert (Abbildung 43).^[168,199] Das Rohprodukt **A** wurde anschließend per Gelfiltration über eine Superdex 75-Säule gereinigt, wobei entstandene Oligomere **A^{Oligo}** vollständig abgetrennt werden konnten (Abbildung 44).

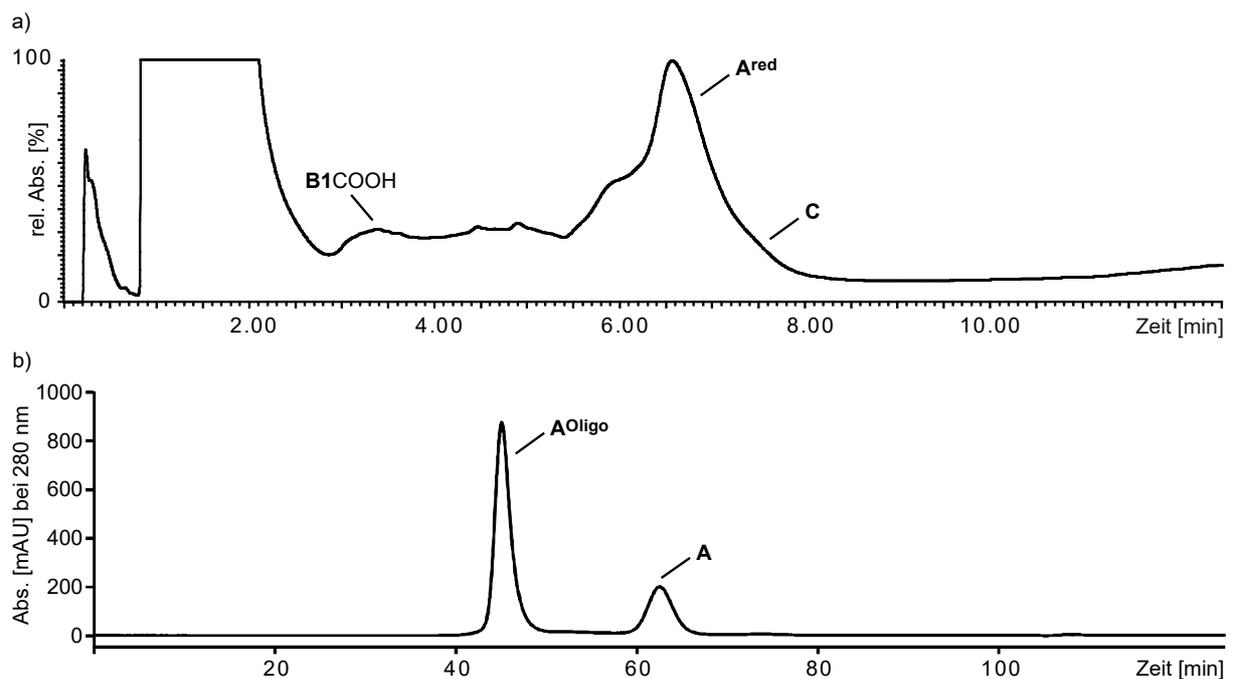


Abbildung 44: a) RP-UHPLC-Chromatogramm der NCL zu **A^{red}** nach 4d und b) UV-Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 75) des Rohprodukts **A**.

Um Salze und restliche Verunreinigungen zu entfernen, erfolgte eine RP-HPLC-Reinigung, wonach EPO (Undeca) **A** in einer Ausbeute von 33 % erhalten wurde. Durch RP-UHPLC-MS und HR-MS wurde die Reinheit von **A** mit typischer Gaußverteilung der Ladungszustände nachgewiesen. Das SDS-Gel zeigte eine Bande für EPO (Undeca) **A**

und das CD-Spektrum bestätigte die korrekte Faltung der synthetisierten Glycoform (Abbildung 45).

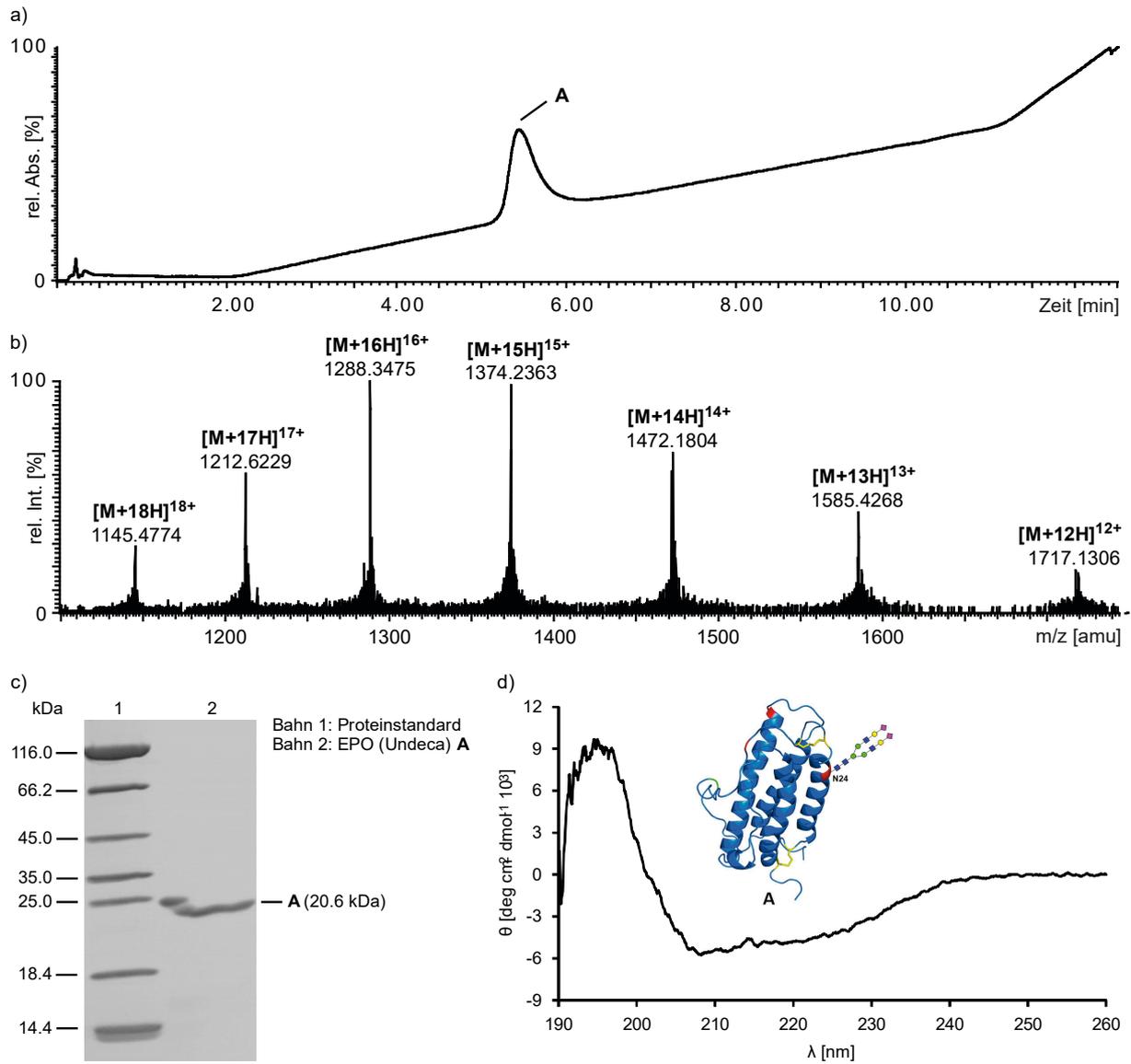


Abbildung 45: a) RP-UHPLC-Chromatogramm, b) HR-MS-Spektrum, c) SDS-PAGE (nicht reduzierend) und d) CD-Spektrum von gereinigtem EPO (Undeca) A.

5 Synthese von dreifach glycosyliertem Erythropoietin nach der Trt/Nvoc-Strategie

Zur Erforschung von Struktur-Wirkungsbeziehungen sollte eine Methode zur Totalsynthese von dreifach *N*-glycosyliertem Erythropoietin **D** über EPO **D^{red}** gefunden werden. Retrosynthetisch kann **D^{red}** in fünf Fragmente **B2-H1** aufgeteilt werden. Zum Erhalt der nativen Cysteine müssen diese mit geeigneten Schutzgruppen versehen werden, um Entschwefelungen von Cys-68, 98 und 128 zu ermöglichen. Die fünf Peptidfragmente **B2-H1** können durch Fmoc-SPPS gewonnen werden (Abbildung 46). *Gross* leistete bereits bedeutende Vorarbeit zur Synthese von dreifach glycosyliertem EPO. Unter Verwendung von Ac_m- und Phac_m-Schutzgruppen an den nativen Cysteinen gelangte sie durch sequentielle NCL und Entschwefelung bis zu EPO 29-166 (2xPhac_m, 2xNona, Ac_m). Da die vollständige Entfernung der Cys-Schutzgruppen an diesem Molekül nicht gelang, wurden andere Methoden zur Schützung der nativen Cysteine gesucht.^[85] Eine Möglichkeit stellt die Retriptylierung freier Cysteine dar.^[83] Da *Gross* bei der Thioveresterung von EPO 29-97 eine Caprolactambildung des C-terminalen Lysins beobachtete, sollte dessen Seitenkette mit einer Nvoc-Gruppe geschützt werden.^[85,169]

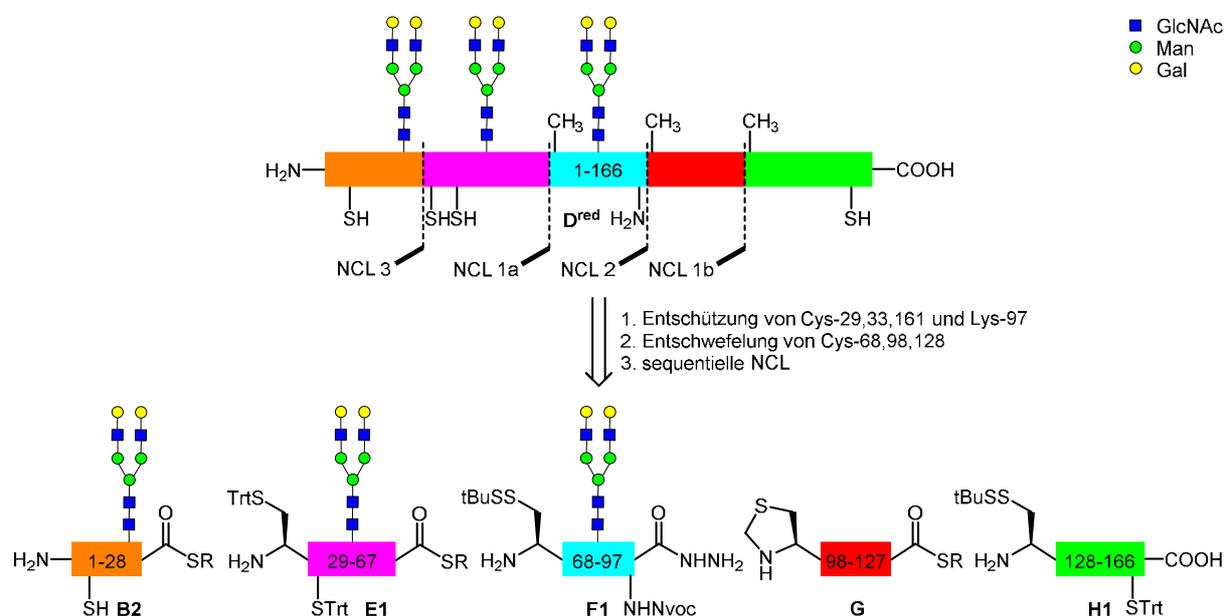


Abbildung 46: Retrosynthese von EPO (3xNona) **D^{red}** nach der Trt/Nvoc-Strategie.

5.1 Synthese des *S*-tritylierten EPO 29-67 Glycopeptidhydrazids **29**

Da sich die AcM/Phacm-Schutzgruppen für die nativen Cysteine von EPO nicht bewährten, wurden alternativ Tritylgruppen untersucht.^[83,85] Die Tritylfunktion ist während der metallfreien radikalischen Entschwefelung stabil und eignet sich daher als Cys-Schutzgruppe für Ala-Ligationen.^[200] Bei der sauren Entschützung von Peptiden kommt es zur Detritylierung, weshalb danach eine selektive Retritylierung notwendig ist. Die Synthese des tritylierten EPO 29-97 Glycopeptidhydrazids **29** wurde analog zu *Graf* durchgeführt.^[83] Das Peptid wurde am Trt-CM-Harz **2** durch automatisierte Fmoc-SPPS aufgebaut. Dabei wurden Fmoc-(Dmb)Gly-OH und zwei Pseudoprolindipeptide eingebaut. Die Glycosylierungsstelle Asp-38 wurde durch die selektiv acidolytisch abspaltbare PhiPr-Gruppe geschützt. Die Kupplung von Cys erfolgte als symmetrisches Anhydrid. Nach der Aktivierung von **2** verlief die Kupplung von Fmoc-Leu-67-OH mit einer Ausbeute von 70 %. Die Ausbeute an Harz **25** nach SPPS wurde nicht bestimmt. Nach einer Testentschützung und anschließender LC-MS-Analyse wurde EPO 29-67 **25e** nachgewiesen (Abbildung 47). Dabei wurde auch das Nebenprodukt **25e**+**[44]** gefunden, bei dem es sich um ein Trp-Carbamat handeln sollte. Weitere unvollständig entschützte Nebenprodukte **25e**+Dmb und das entsprechende **25e**+Dmb+**[44]** waren zu finden.

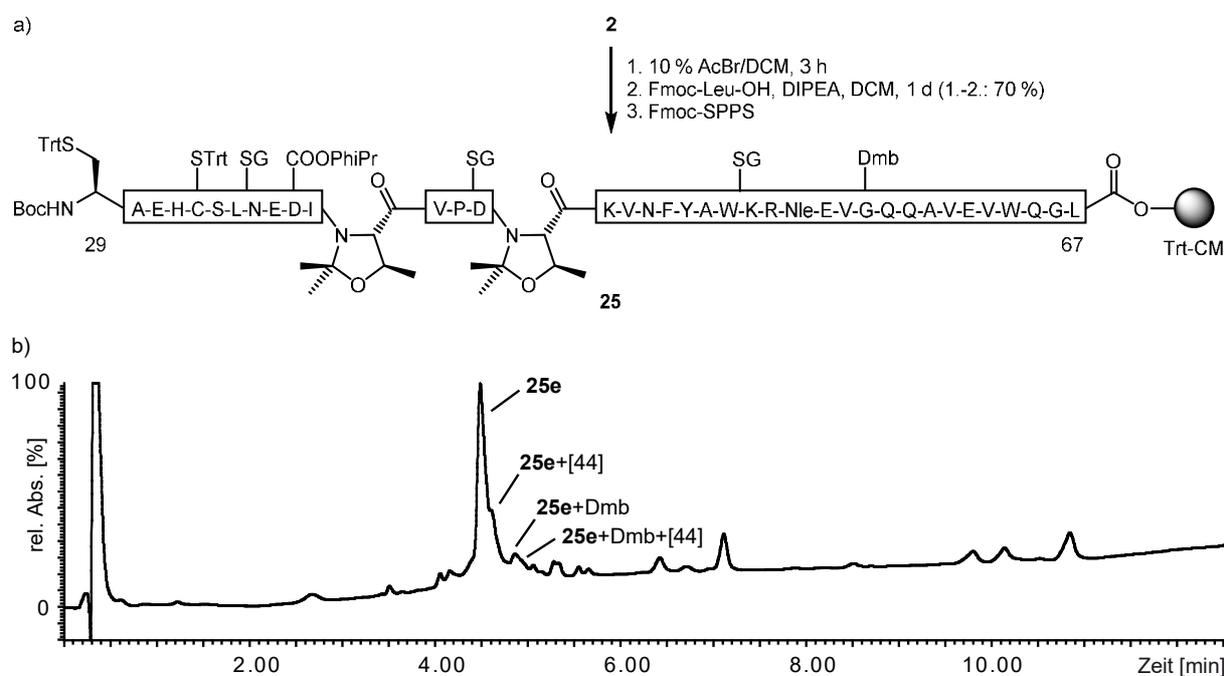


Abbildung 47: a) Synthese von EPO 29-67-Trt-CM **25** und b) RP-UHPLC-Chromatogramm von **25e**.

Aufgrund der hohen Säurelabilität der PhiPr-Schutzgruppe erfolgte die Abspaltung der Peptidylsäure vom Harz mit 20 % HFIP/DCM bei 0 °C. Die Peptidylsäure wurde mit *tert*-Butylcarbazat, DIC, Cl-HOBt und DIPEA umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erfolgte die Reinigung per Flash-Chromatographie, wonach das EPO 29-67 Hydrazid **26** in einer Ausbeute von 70 % gewonnen wurde. Die LC-MS-Analyse des entschützten Peptids zeigte neben dem Hydrazid **26e** auch **26e**+**[44]** sowie **26e**+Dmb und **26e**+Dmb+**[44]** (Abbildung 48).

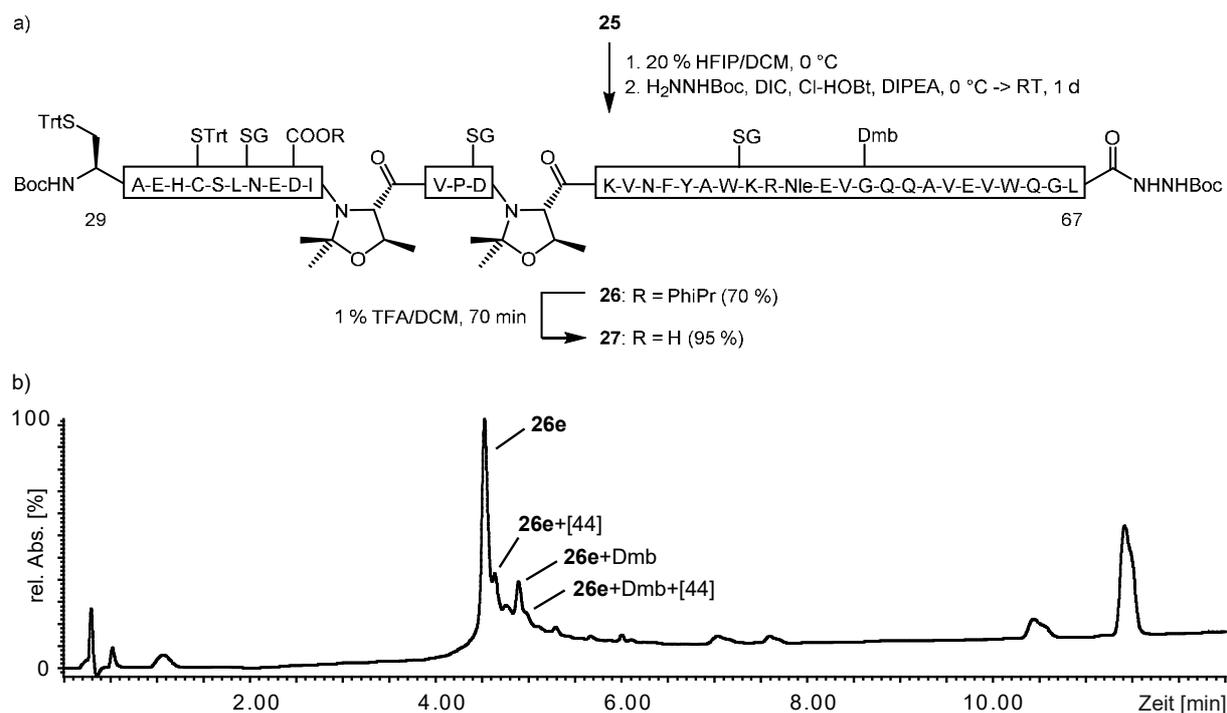


Abbildung 48: a) Synthese des EPO 29-67 Hydrazids **26** und PhiPr-Abspaltung und b) RP-UHPLC-Chromatogramm von **26e**.

Die selektive Abspaltung der PhiPr-Schutzgruppe wurde mit 1 % TFA/DCM für 70 min durchgeführt, wobei die Reaktion per DC verfolgt wurde (Abbildung 48). Die Tritylschutzgruppen waren unter diesen Bedingungen stabil. Die Aufarbeitung erfolgte durch Etherfällung und lieferte das EPO 29-67 Hydrazid **27** mit freiem Asp-38 in einer Ausbeute von 95 %.

Die Kupplung des Nonasaccharidamins **7** (1.5 eq) an **27** (1 eq) mit HATU, HOAt und DIPEA in DMF/DMSO (1:1) ergab nach Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) das Glycopeptid **28** (Abbildung 49). Das Rohprodukt **28** wurde nach Etherfällung per LC-MS analysiert. Im Chromatogramm waren restliches Edukt **26e** sowie Aspartimid **26eAI** und **26eAI**+**[44]** sichtbar (Abbildung 50). Wahrscheinlich wurde die Abspaltung des PhiPr-Esters nicht rechtzeitig abgebrochen, wodurch es zur Pseudoprolinöffnung und anschließend zur Aspartimidbildung bei der Asparylierung kam.

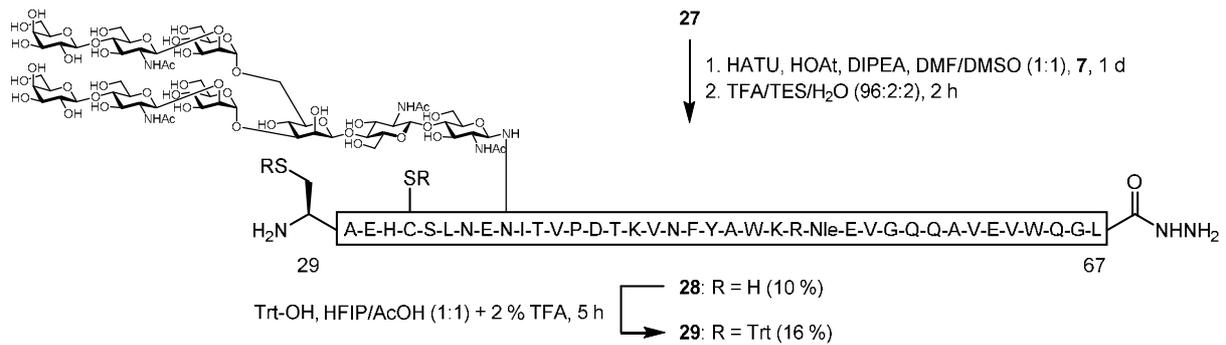


Abbildung 49: Synthese von EPO 29-67 (2xSTrt, Nona) 29.

Durch RP-HPLC-Reinigung gelang es die Nebenprodukte abzutrennen und nahezu reines Glycopeptid EPO 29-67 (2xSH) 28 zu erhalten (Abbildung 50). Die Ausbeute betrug allerdings lediglich 10 %. Zudem besaß das Glycopeptid 28 nach der Etherfällung eine geringe Löslichkeit, was zum Ausbeuteverlust beitrug.

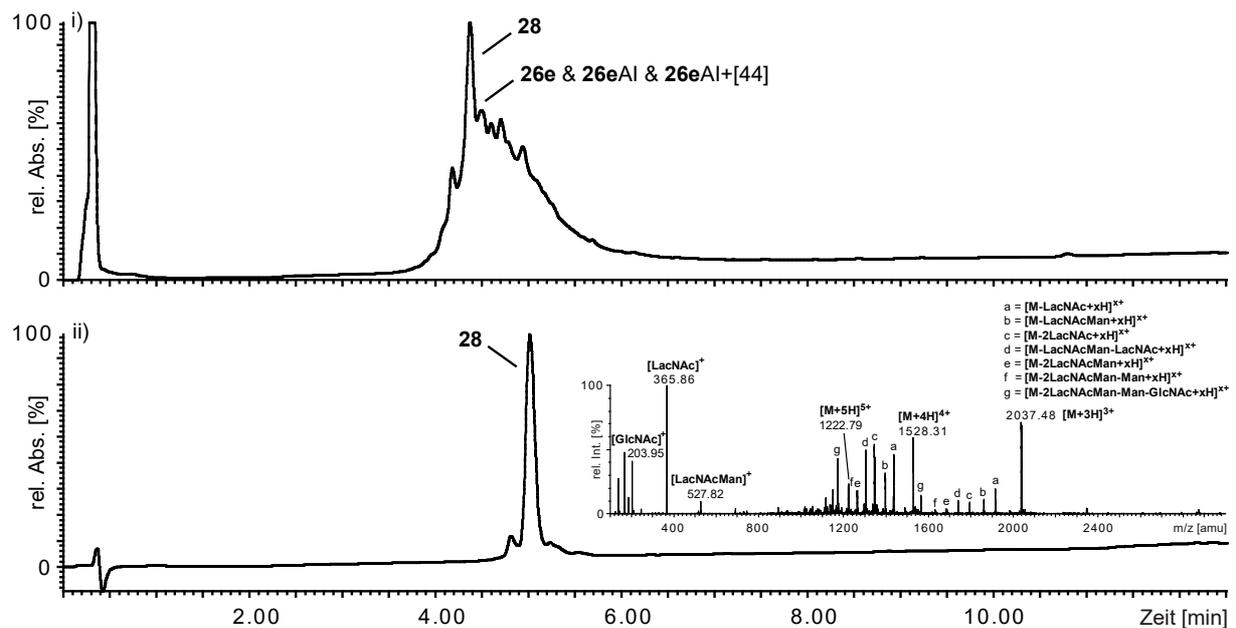


Abbildung 50: i) RP-UHPLC-Chromatogramm des Rohprodukts 28 und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 29-67 (2xSH, Nona) 28.

Die Retriptylierung von Cys-29 und 33 am Glycopeptid 28 erfolgte nach Graf mit Triphenylmethanol (3.5 eq) in HFIP/AcOH (1:1) + 2 % TFA (Abbildung 49).^[83,191] Um Übertriptylierungen, die besonders an Histidinen auftreten, wieder zu entfernen, wurden Essigsäure und zu einem kleinen Teil TFA zugesetzt.^[191,201,202] Graf beobachtete, dass Übertriptylierungen auftraten, diese aber bei längerer Reaktionsdauer wieder verschwanden.^[83]

Nach 2.5 h und nach 4.5 h Reaktionszeit zeigte sich das gleiche Ergebnis (Abbildung 51). Neben restlichem Edukt **28** wurde ein um 96 g/mol schwereres Edukt **28**+ $[96]$ gefunden. Hierbei könnte es sich um das trifluoracetylierte Hydrazid handeln.^[203] Auch ein einfach trityliertes Derivat **28**+Trt+ $[96]$ war zu sehen. Neben dem gewünschten Produkt **29** waren **29**+ $[96]$ sowie dreifach trityliertes Glycopeptid **29**+Trt und **29**+Trt+ $[96]$ zu finden. Durch RP-HPLC konnten die Verunreinigungen fast vollständig entfernt werden und EPO 29-67 (2xSTrt) **29** in einer Ausbeute von 16 % gewonnen werden. Bei *Graf* betrug die Ausbeute 49 %.^[83] In beiden Fällen waren die Ausbeuten zu niedrig, um die Synthese von dreifach glycosyliertem EPO zu ermöglichen. Auch die Verwendung von 2-Cl-4'-Carboxy- und 4'-Carboxytriphenylmethanol unter Variation der Äquivalente, Peptidkonzentration und Lösungsmittelzusammensetzung zeigten keine Verbesserung der Synthese (Daten nicht gezeigt).

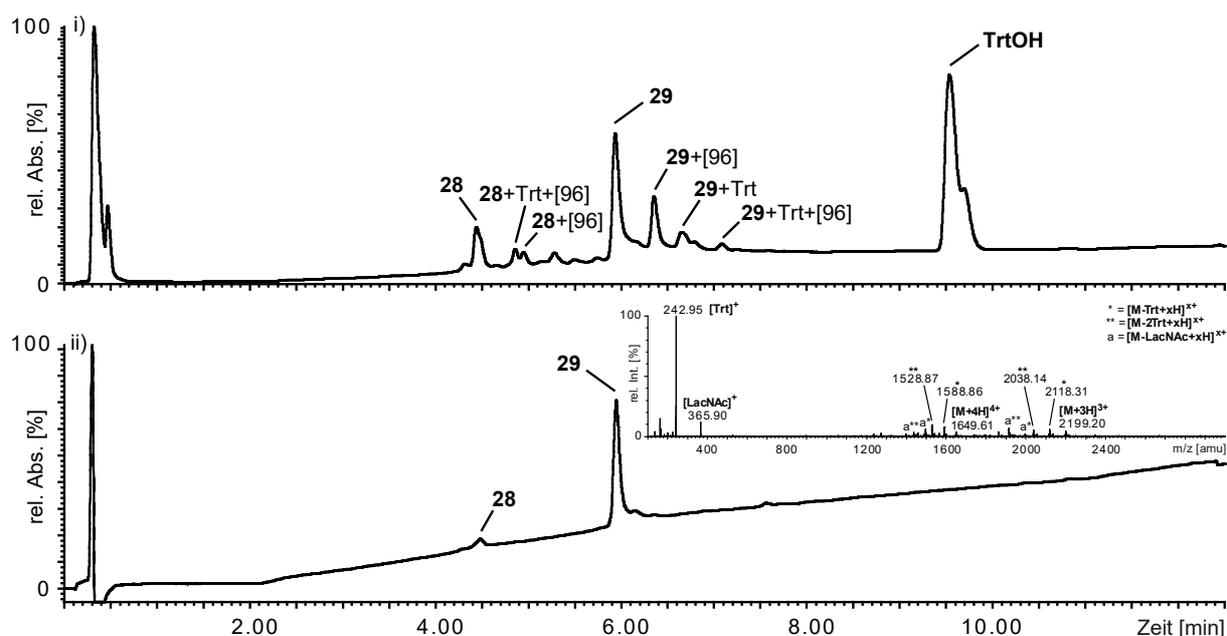


Abbildung 51: i) RP-UHPLC-Chromatogramm der Tritylierung nach 4.5 h und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 29-67 (2xSTrt, Nona) **29**.

5.2 Synthese von EPO 98-166 (STrt) **33**

Für die Totalsynthese von EPO mit drei *N*-Glycanen wurde auch das Peptidfragment EPO 98-166 (STrt) **33** benötigt, das durch NCL des EPO 98-127 Thioesters **G** mit EPO 128-166 (STrt) **H1** zugänglich ist. Die Synthese des Thioesters EPO 98-127 **G** wurde analog zu *Gross* durch automatisierte Fmoc-SPPS am Trt-CM-Harz **2** aufgebaut (Abbildung 52).^[85] Zur

Löslichkeitsverbesserung wurden drei Pseudoprolindipeptide und Fmoc-(Dmb)Gly-OH verwendet. Das N-terminale Cystein wurde als Thiazolidin einbaut. Die Peptidelongation zum Harz **30** verlief mit einer Ausbeute von 73 %.

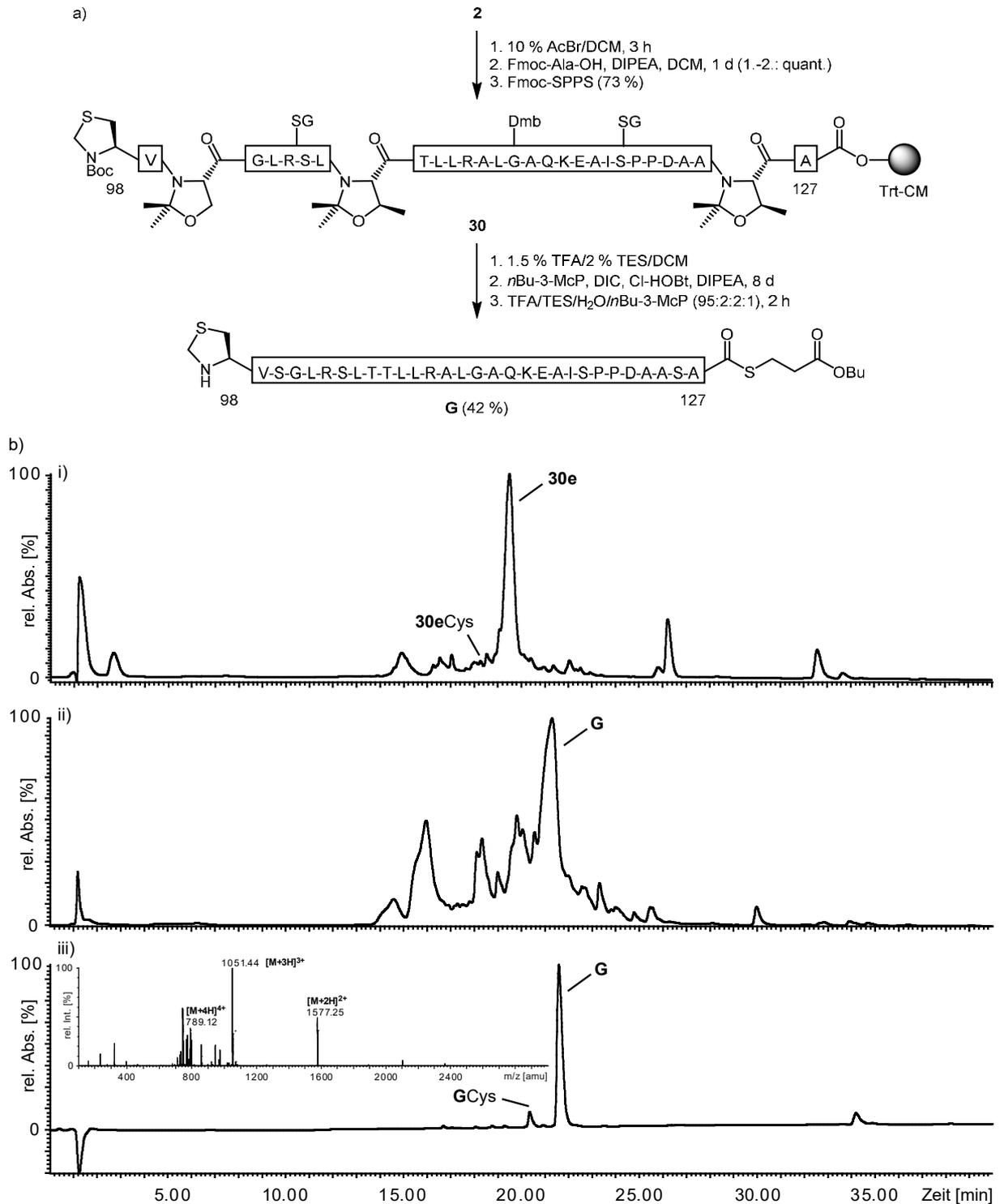


Abbildung 52: a) Synthese von EPO 98-127 *n*Bu-3-McP **G** und b) i) RP-HPLC-Chromatogramm von EPO 98-127 **30e** und ii) des Rohprodukts **G** und iii) RP-HPLC-MS von gereinigtem **G**.

Die LC-MS-Analyse zeigte EPO 98-127 **30e** und in geringem Maß eine Thiazolidinringöffnung zu **30eCys**, die vermutlich aus der Entschützung resultierte (Abbildung 52). Es folgte die Abspaltung der geschützten Peptidylsäure vom Harz mit 1.5 % TFA/2 % TES/DCM und die *in situ*-Thioveresterung mit *n*Bu-3-McP, DIC, Cl-HOBt und DIPEA mit anschließender globaler *in situ*-Entschützung. Nach Etherfällung und RP-HPLC-Reinigung wurde der Thioester **G** in guter Reinheit und 42 % Ausbeute erhalten. Nach der Reinigung war ein Nebenprodukt **GCys** mit freiem Cys-98 in geringer Menge zu beobachten. Es ist anzunehmen, dass es bei der Gefriertrocknung wegen der im RP-HPLC-Laufmittel enthaltenen TFA (0.1 %) zur Öffnung des Thiazolidins kam.^[85]

Bei dem EPO 128-166 (STrt) Fragment **H1** erfolgte der Peptidaufbau am Trt-CM-Harz **2** unter Einsatz von drei Pseudoprolindipeptiden (Abbildung 53). Das N-terminale Cys-128 wurde als Disulfid eingebaut. Die Peptidelongation lieferte das Harz **31** in 70 % Ausbeute.

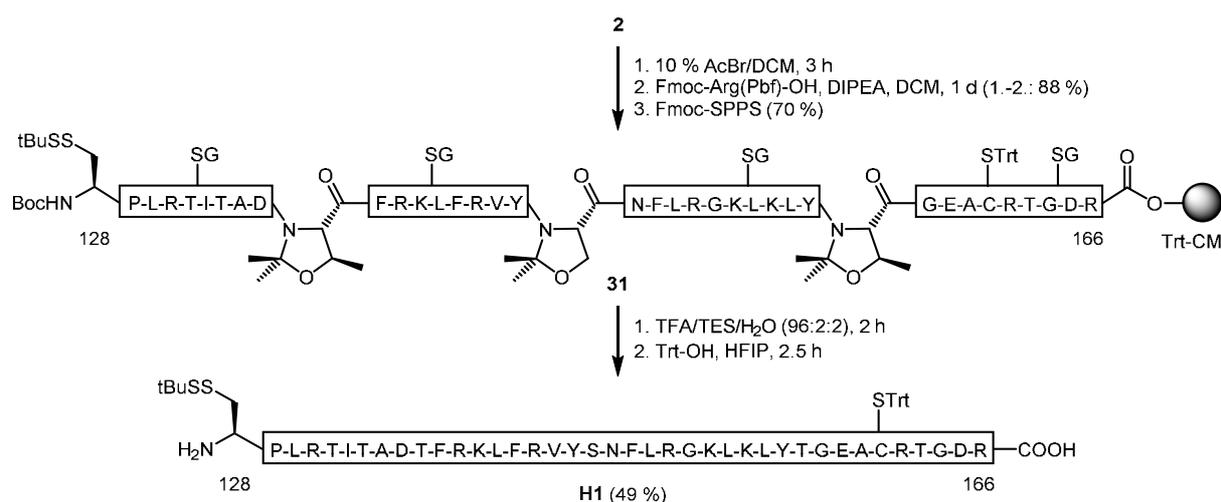


Abbildung 53: Synthese von EPO 128-166 (STrt) **H1**.

Nach einer Testentschützung waren nur wenige Verunreinigungen zu sehen, unter anderem **31e-Ile/Leu** (Abbildung 54). Es folgte die Entschützung zu EPO 128-166 (SH) **31e** und eine Retriptylierung mit Triphenylmethanol (4 eq) in HFIP (Abbildung 53).^[200] Im Gegensatz zur Retriptylierung des EPO 29-67 Glycopeptids **28** verlief diese an EPO 128-166 **31e** problemlos. Zur Entfernung des Tritylalkohols wurde das Rohprodukt **H1** mit Diethylether gefällt und die Verunreinigungen durch RP-HPLC-Reinigung abgetrennt. EPO 128-166 (STrt) **H1** wurde in 49 % Ausbeute und hoher Reinheit gewonnen (Abbildung 54). Es wurde auch die Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Retriptylierung des Peptids mit TFA/DmbOH/H₂O (95:2.5:2.5)

getestet.^[191] Dies hatte jedoch nicht den gewünschten Erfolg und resultierte in einer Mischung (Daten nicht gezeigt).

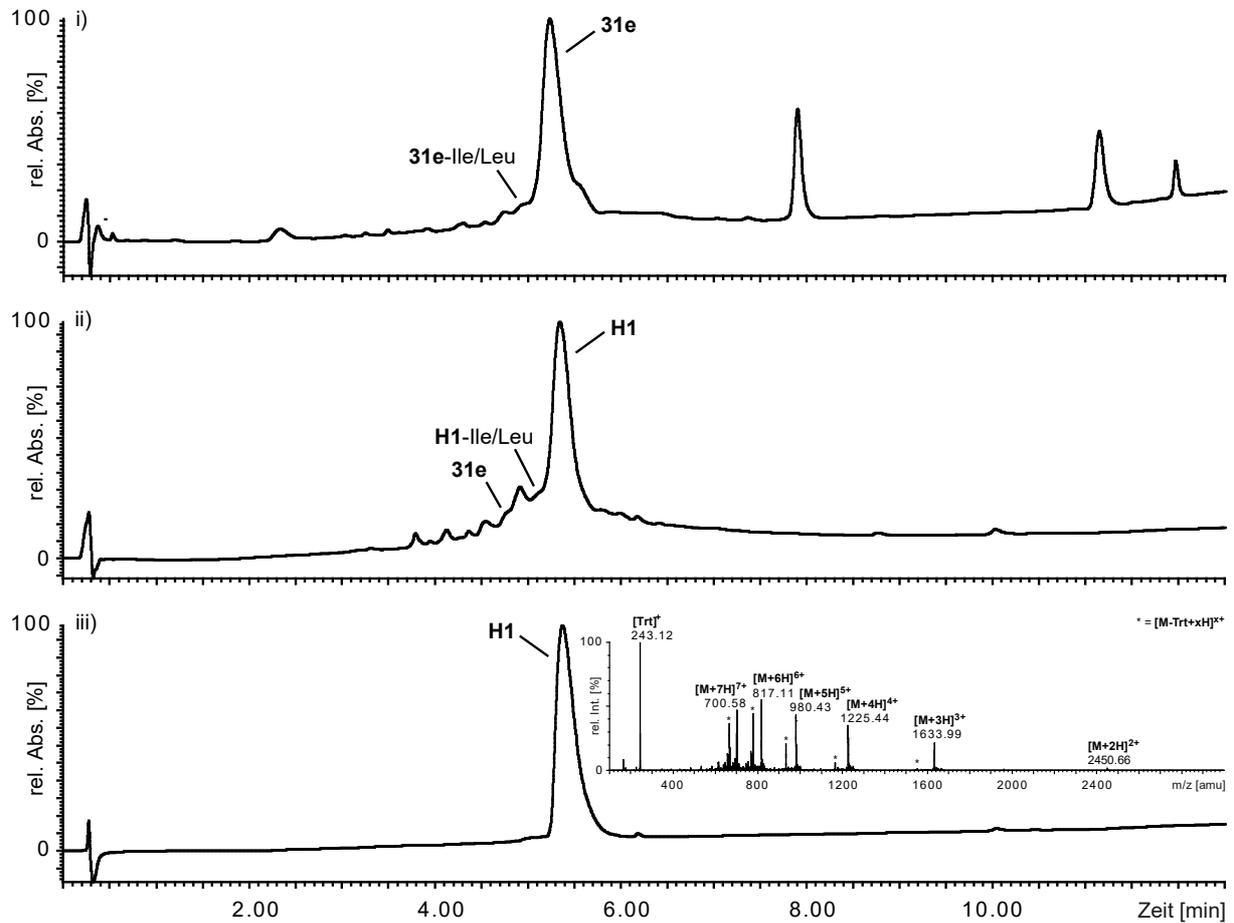


Abbildung 54: i) RP-UHPLC-Chromatogramm von entschütztem EPO 128-166 **31e** und ii) des Rohprodukts **H1** und iii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 128-166 (STrt) **H1**.

Die Ligation der beiden Peptidfragmente **G** (1.2 eq) und **H1** (1 eq) erfolgte in 8 M GdmCl bei pH 6.9. Cys-128 wurde dabei durch TCEP freigesetzt (Abbildung 55). Nach 6 d Reaktionszeit wurde mit DTT reduziert und das Rohprodukt **32** per RP-HPLC gereinigt.

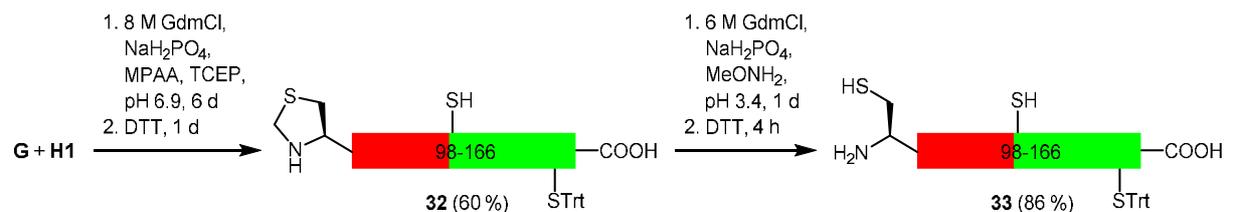


Abbildung 55: Synthese von EPO 98-166 (STrt) **33**.

Im Chromatogramm des Rohprodukts **32** waren die Säure **30e**, das Ligationsprodukt mit freiem Cys-98 **33** und ein doppelt ligiertes Peptid **G32** zu finden (Abbildung 56). Die Verunreinigungen konnten entfernt und EPO 98-166 (Thz, STrt) **32** in einer Ausbeute von 60 % erhalten werden. Das Chromatogramm des gereinigten Ligationsprodukts **32** wies zu kleinem Teil bereits das Cys-Peptid **33** auf. Die Öffnung des Thiazolidins an EPO 98-166 (Thz, STrt) **32** erfolgte mit Methoxyamin bei pH 3.4 (Abbildung 55). Nach Zugabe von DTT wurden die Reagenzien per RP-HPLC abgetrennt, wodurch EPO 98-166 (STrt) **33** in hoher Reinheit und einer Ausbeute von 86 % erhalten wurde (Abbildung 56).

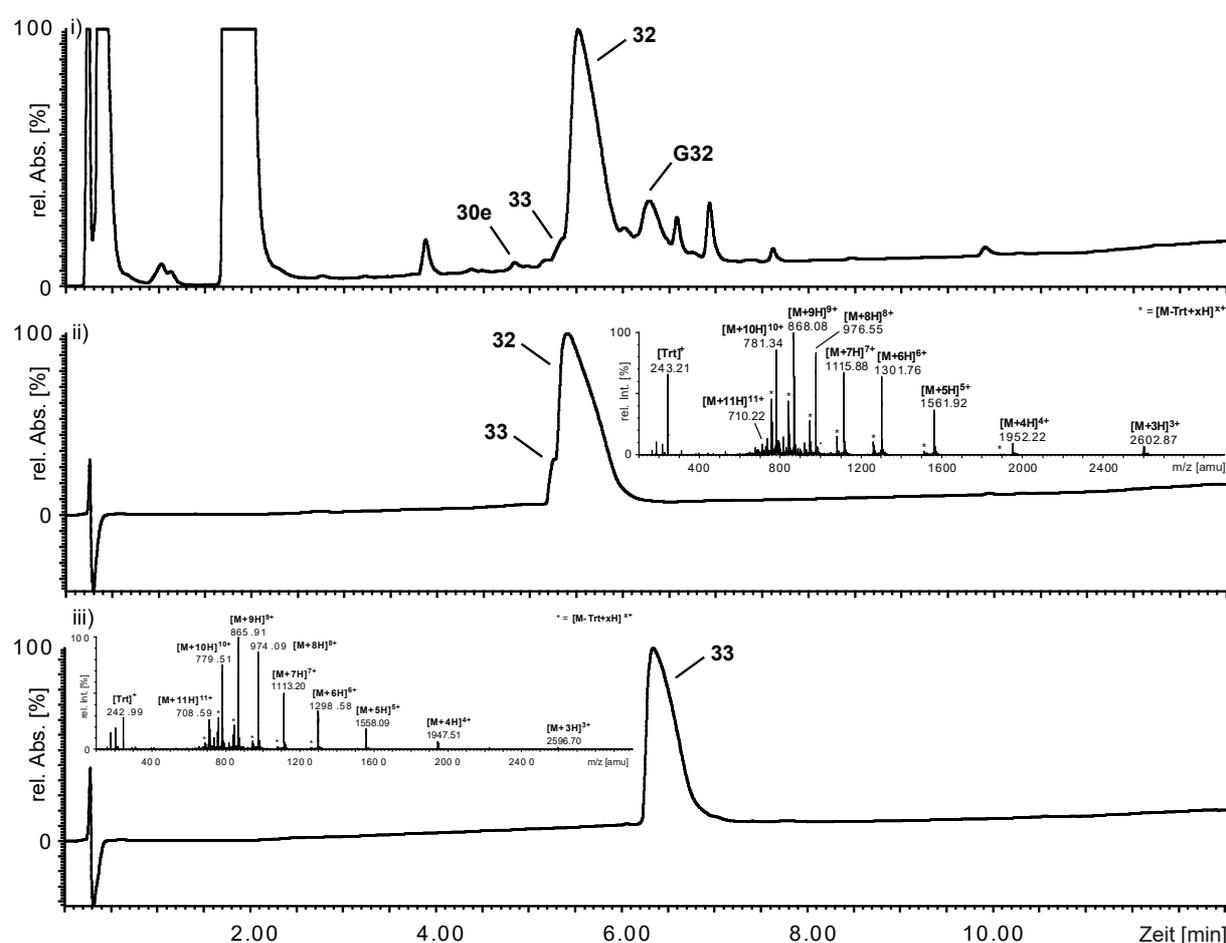


Abbildung 56: i) RP-UHPLC-Chromatogramm der NCL zu **32** nach 6 d und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 98-166 (Thz, STrt) **32** und iii) von gereinigtem EPO 98-166 (STrt) **33**.

5.3 Ligation zu doppelt glycosyliertem EPO 29-166 **36**

Von *Graf* wurde das doppelt glycosylierte EPO 29-97 Hydrazid **34** durch Ligation des EPO 29-67 Thioesters **E1** (1.1 eq) mit EPO 68-97 (Nona, Nvoc) **F1** (1 eq) erhalten (Abbildung

57).^[83,169] Zur Vermeidung einer Caprolactambildung am C-terminalen Lys-97 wurde die photolabile 6-Nitroveratryloxycarbonyl (Nvoc)-Schutzgruppe eingesetzt, die durch Licht oder bei der radikalischen Entschwefelung entfernt werden kann.^[85,169,204,205,206]

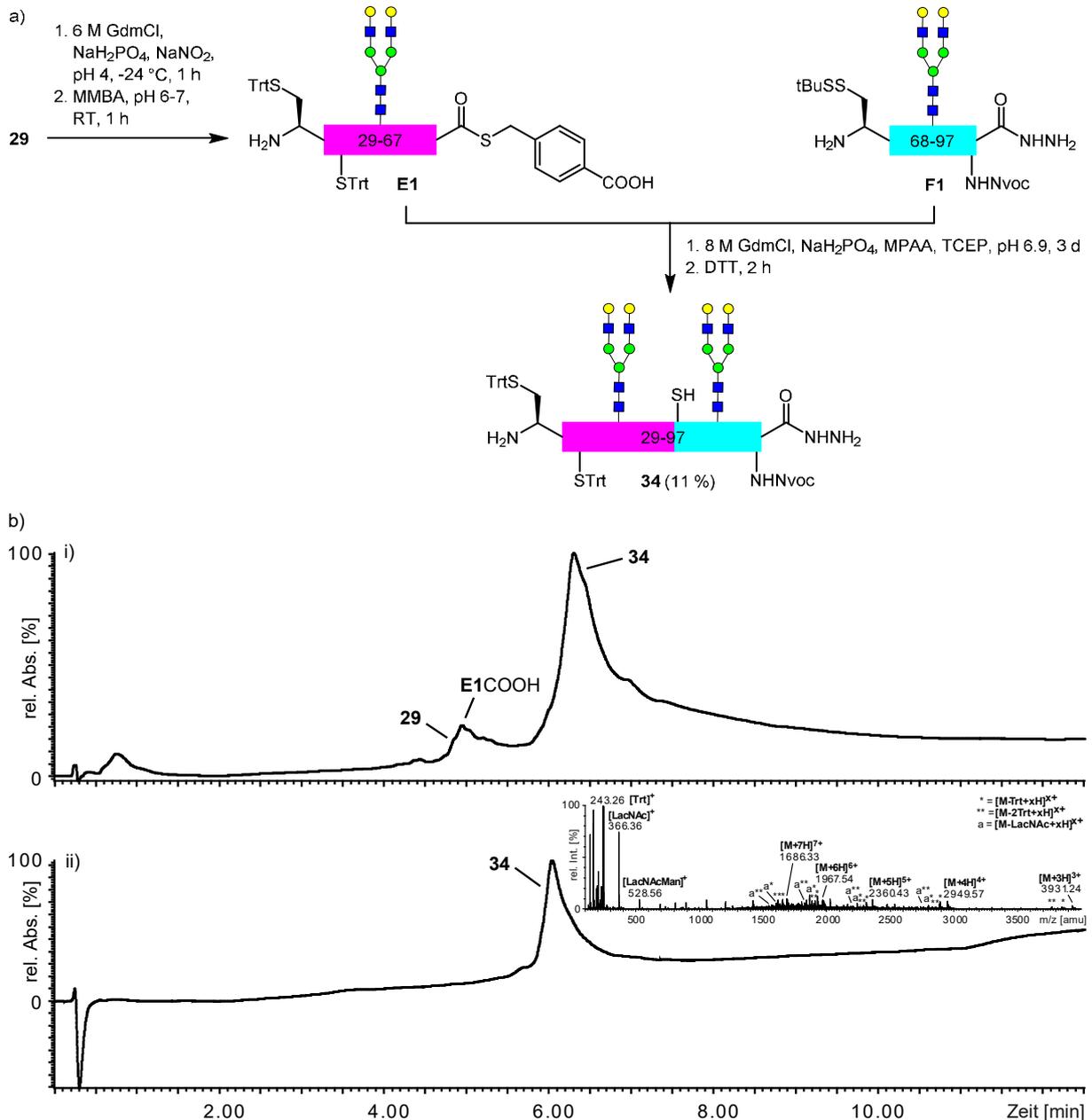


Abbildung 57: a) Von Graf durchgeführte Synthese von EPO 29-97 (2xSTrt, 2xNona, Nvoc) **34** und b) i) RP-UHPLC-Chromatogramm des von Graf ausgefällten und ii) RP-UHPLC-MS von RP-HPLC-gereinigtem **34**.

Das Glycopeptid **34** zeigte bei der Synthese in größerem Maßstab (2.9 mg **E1** und 2.1 mg **F1**) eine geringe Löslichkeit in 55 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA und wurde deshalb von Graf

durch Ausfällen mit 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA vorgereinigt.^[83] Nach einer Gefrier-trocknung aus Essigsäure war das Rohprodukt **34** löslich in 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA und konnte per RP-HPLC gereinigt werden. EPO 29-97 **34** wurde in einer Ausbeute von 11 % (bezogen auf **F1**) und guter Reinheit erhalten (Abbildung 57). Die geringe Löslichkeit ist auch auf die Hydrophobizität der Trityl- und Nvoc-Schutzgruppen zurückzuführen und bedingt die niedrige Ausbeute an **34**.

Für die folgende C-terminale NCL wurde das Hydrazid **34** zum Thioester **35** umgesetzt (Abbildung 58). Das Rohprodukt **35** wurde über eine Superdex Peptide-Säule gefilteriert und der EPO 29-97 Thioester **35** mit kleinen Verunreinigungen in 61 % Ausbeute gewonnen (Abbildung 59).

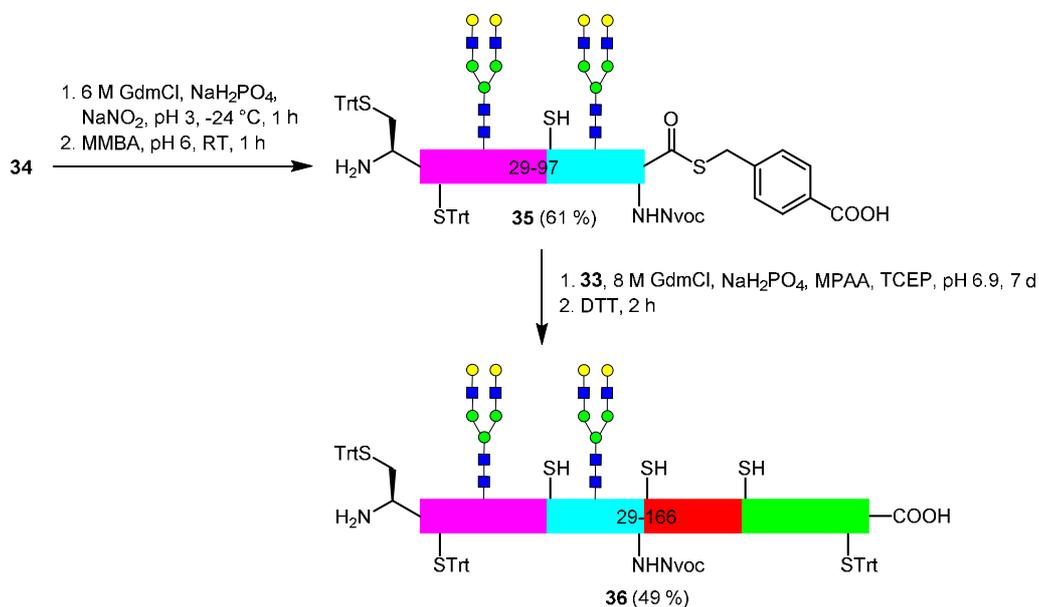


Abbildung 58: Synthese von EPO 29-166 (3xSTrt, 2xNona, Nvoc) **36**.

Die Ligation des Thioesters **35** (1 eq) mit dem Cys-Peptid EPO 98-166 (STrt) **33** (1.5 eq) bei pH 6.9 wurde nach 7 d mit DTT reduziert und per RP-HPLC gereinigt (Abbildung 58). Die in der Ligationmischung enthaltenen Verunreinigungen, unter anderem EPO 98-166 (STrt) **33** und das Thiazolidin **32**, konnten nicht komplett abgetrennt werden (Abbildung 59). Die Ausbeute an EPO 29-166 (3xSTrt, 2xNona, Nvoc) **36** betrug 49 %. Da nur 0.25 mg an **36** erhalten wurden und die Syntheseroute aufgrund der Löslichkeitsprobleme (Trt- und Nvoc-Gruppen) für die Synthese von dreifach N-glycosyliertem EPO **D** nicht geeignet war, wurde eine andere Schutzgruppenstrategie für die nativen Cysteine und Lys-97 eingesetzt.

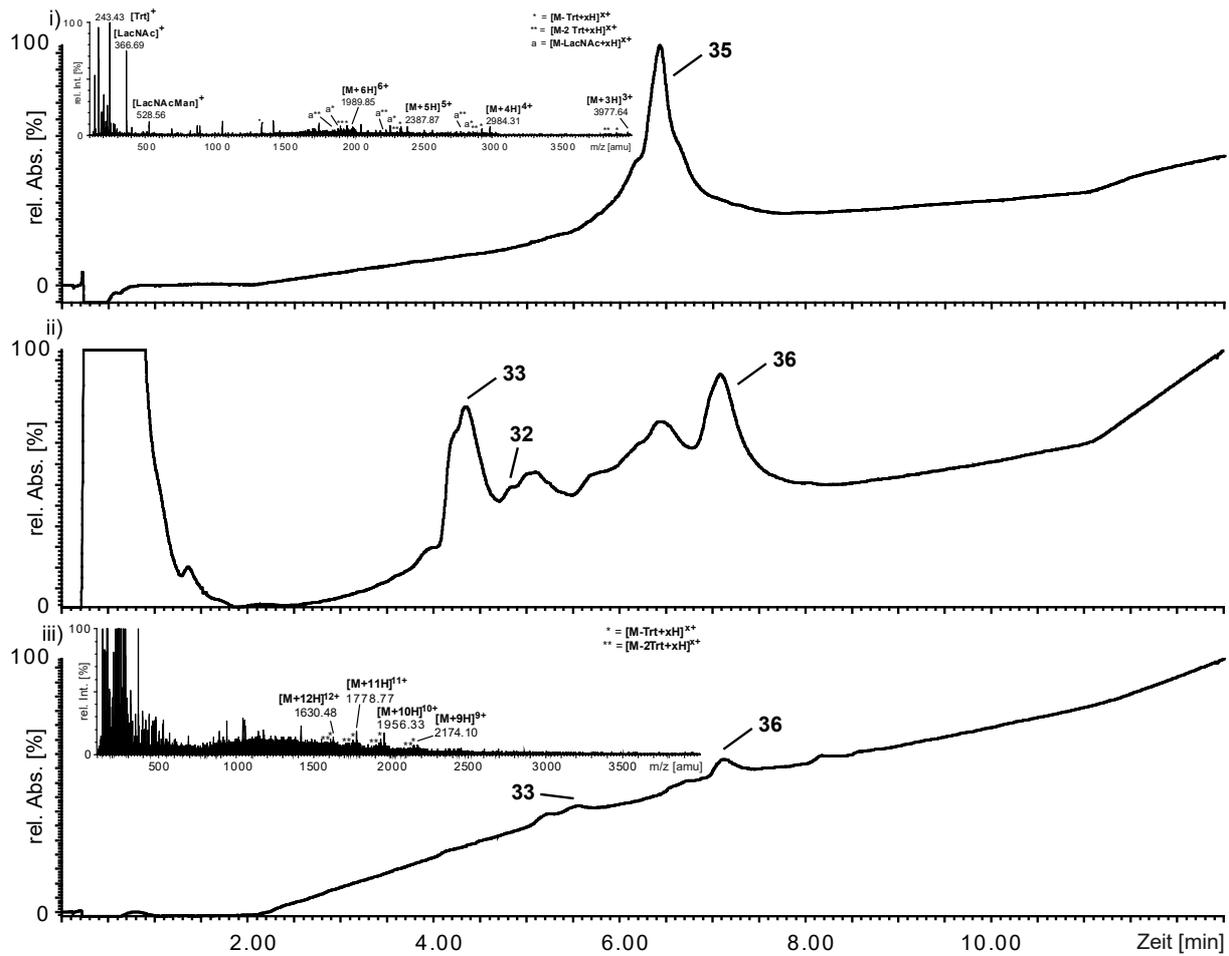


Abbildung 59: i) RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 29-97 (2xSTrt, 2xNona, Nvoc) MMBA 35, ii) RP-UHPLC-Chromatogramm des Rohprodukts 36 und iii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 29-166 (3xSTrt, 2xNona, Nvoc) 36.

6 Synthese von dreifach glycosyliertem Erythropoietin nach der AcM/TFac-Strategie

Nachdem *Brik et al.* 2016 eine neue Methode zur Entfernung von AcM- und PhacM-Schutzgruppen durch Palladiumverbindungen veröffentlichten, wurde die Eignung dieser Abspaltungsmethode für die nativen Cysteine von EPO geprüft.^[108,109] Bereits *Gross* verwendete diese Schutzgruppen, konnte sie jedoch nicht oder nur unvollständig entfernen. Sie beobachtete ebenfalls einen teilweisen Verlust einer AcM-Gruppe bei der Palladium(0)-katalysierten Allylabspaltung.^[85] Die Abspaltung von AcM-Schutzgruppen mit Pd^{II}-Verbindungen schien daher vielversprechend.^[108,109] Am C-terminalen Lys-97 wurde die basenlabile TFac-Schutzgruppe verwendet. Die Schnittstellen für die Verknüpfung der Peptidfragmente **B2-H2** wurden beibehalten (Abbildung 60).

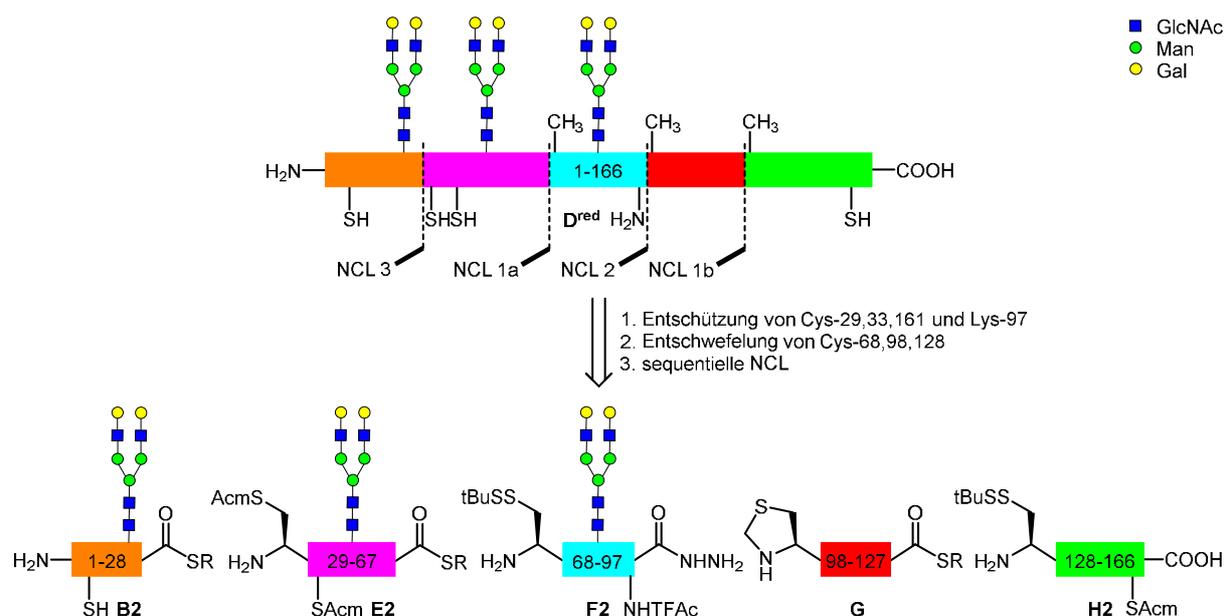


Abbildung 60: Retrosynthese von EPO (3xNona) D^{red} nach der AcM/TFac-Strategie.

6.1 Synthese von AcM-geschützten EPO 29-67 Glycopeptiden

Die Darstellung des EPO 29-67 Peptids **37** erfolgte am Trt-CM-Harz **2** mit zwei Pseudoprolindipeptiden und einem (Dmb)Gly. An der Glycosylierungsstelle wurde Fmoc-Asp(OPhiPr)-OH eingebaut. Durch die Vermeidung des Allylesters wurde der Einsatz von Palladium und somit ein möglicher Verlust der AcM-Schutzgruppen umgangen.^[85] Nach dem Peptidaufbau ergab sich für das Harz **37** eine Ausbeute von 67 % (Abbildung 61).

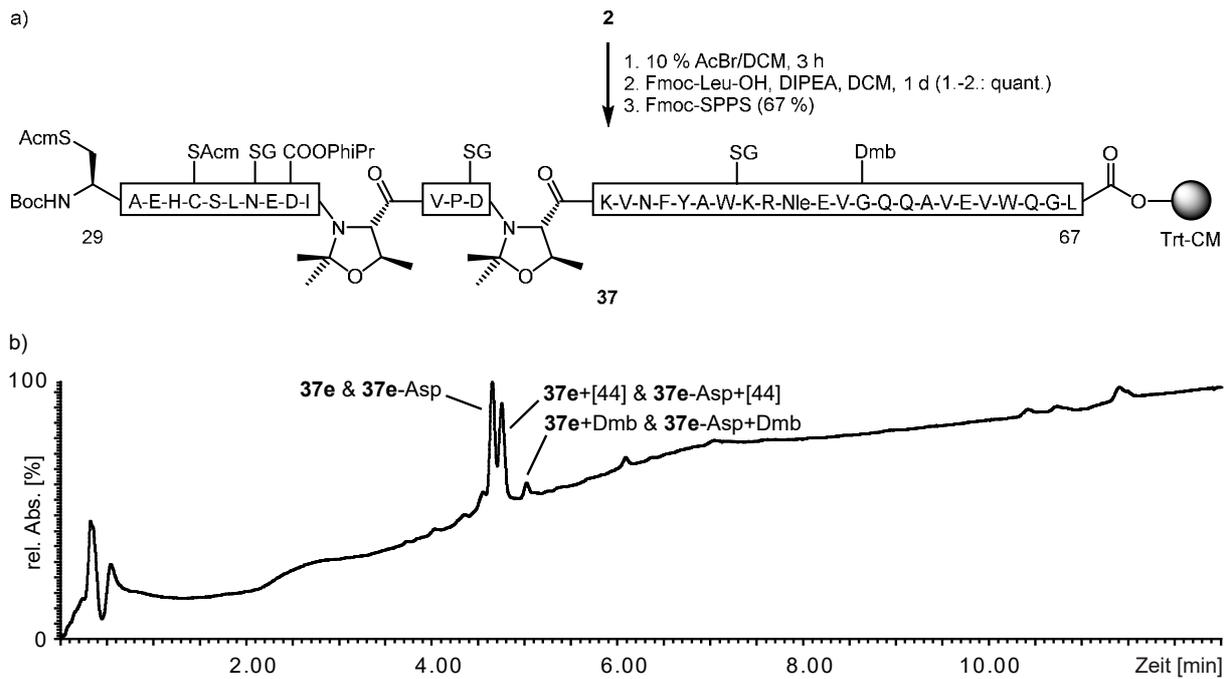


Abbildung 61: a) Synthese von EPO 29-67 (2xSAcm, OPhiPr)-Trt-CM 37 und b) RP-UHPLC-Chromatogramm von 37e.

Bei der Peptidelongation trat eine Asp/Asn-Deletion **37e-Asp** (ca. 25 %) auf. Wahrscheinlich handelt es sich um Asp(OPhiPr)-38. Die Deletion resultierte vermutlich daraus, dass die Lösungsmittelmenge nicht dem geringeren Beladungsgrad der verwendeten Harzcharge **2** angepasst wurde und so zu geringe Aminosäurekonzentrationen vorlagen. Wenn es sich bei der Asp/Asn-Deletion tatsächlich um Asp-38 handelt, kann am Nebenprodukt **39-Asp** kein Zucker gekuppelt werden und dies bei der RP-HPLC-Reinigung nach der Aspartylierung abgetrennt werden. Es waren zusätzlich **37e+[44]** und ein unvollständig entschütztes Nebenprodukt **37e+Dmb** mit jeweiligen Asp/Asn-Deletionen zu sehen.

Die Hydrazidsynthese erfolgte nach Abspaltung der geschützten Peptidylsäure mit 20 % HFIP/DCM bei 0 °C. Nach einer Flash-Chromatographie wurde das EPO 29-67 Hydrazid **38** in > 100 % Ausbeute erhalten. Dies deutete darauf hin, dass nicht alle Reagenzien abgetrennt wurden oder die experimentelle Bestimmung des Beladungsgrades des Harzes **37** zu ungenau war. Im LC-MS-Chromatogramm nach Entschützung einer analytischen Menge an Hydrazid **38** war wesentlich weniger Nebenprodukt **38e+[44]** und mehr **38e+Dmb** zu sehen als im Chromatogramm des Edukts **37**, was dafür sprach, dass es sich um Artefakte der Entschützung handelte (Abbildung 62).

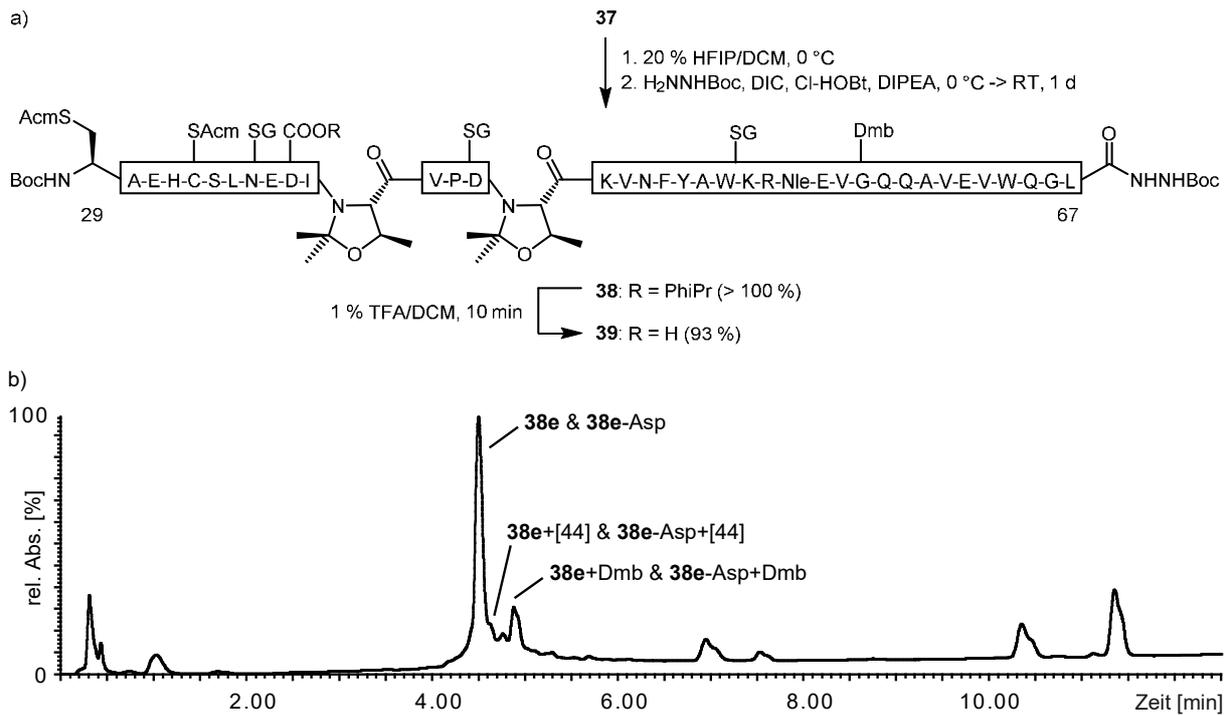


Abbildung 62: a) Synthese der EPO 29-67 Hydrazide **38** und **39** und b) RP-UHPLC-Chromatogramm von **38e**.

Durch eine optimierte Peptidsynthese wurde von *Hessefort* das Hydrazid **38** ohne Asp/Asn-Deletion aufgebaut.^[207] Die PhiPr-Schutzgruppe des von ihm bereitgestellten **38** wurde mit 1 % TFA/DCM für 10 min entfernt und daraus das EPO 29-67 (2xSAcM, OH) Hydrazid **39** nach Etherfällung in einer Ausbeute von 93 % erhalten (Abbildung 62).^[61,207] Das geschützte Hydrazid **39** mit freiem Asp-38 wurde per LC-MS analysiert. Es war fast ausschließlich Produkt **39** und nur in geringer Menge eine Pseudoprolinringöffnung **39-ψpro** und Edukt **38** zu beobachten (Abbildung 63). Bei 10-minütiger Reaktionszeit wird somit eine sehr hohe Effizienz bei der selektiven Entschützung erzielt.

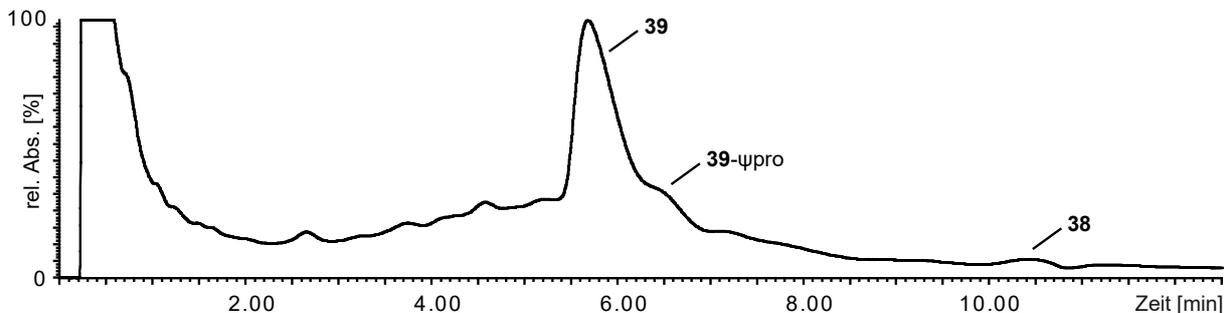


Abbildung 63: RP-UHPLC-Chromatogramm des geschützten EPO 29-67 Hydrazids **39**.

Nach Aktivierung des Peptids **39** (1.5 eq) mit HATU, HOAt und DIPEA in DMF/DMSO (1:1) erfolgte die Kupplung des Nonasaccharidamins **7** (1 eq) (Abbildung 64). Die saure Entschützung nach 35 h führte zum EPO 29-67 Glycopeptidhydrazid **40**, das durch Etherfällung aufgearbeitet und per RP-HPLC gereinigt wurde. Die Verunreinigungen, überschüssiges Edukt **39e** und **39e+[44]** konnten abgetrennt werden, wonach **40** in hoher Reinheit und einer Ausbeute von 29 % erhalten wurde.

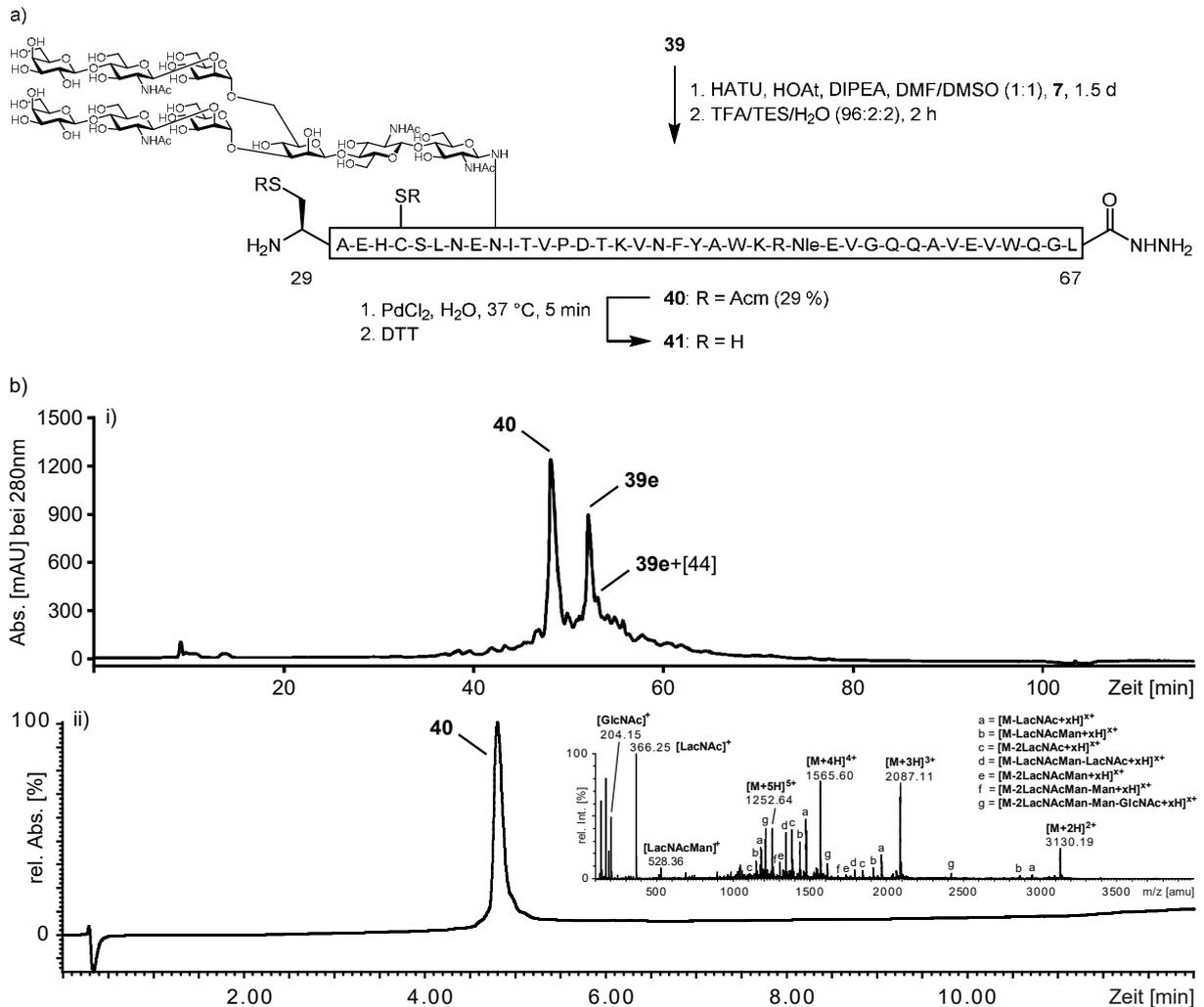


Abbildung 64: a) Synthese von EPO 29-67 (2xS_{AcM}, Nona) **40** und AcM-Abspaltung und b) i) UV-Chromatogramm der RP-HPLC-Reinigung des Rohprodukts **40** und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem **40**.

Beim Einsatz der Hydrazid-Charge **38** mit Asp/Asn-Deletion verlief nach der Abspaltung der PhiPr-Gruppe die Glycokupplung zu **40** mit 22 % Ausbeute. Dabei wurde auch das Nebenprodukt **39**-Asp abgetrennt, wodurch gezeigt wurde, dass es sich bei der Asp-Deletion am Harz **37** tatsächlich um Asp-38 handelte (Daten nicht gezeigt).

Die Methode von *Brik et al.* verwendet zur Abspaltung von AcM-Gruppen PdCl₂ in Phosphatpuffer mit 6 M GdmCl. Um zu untersuchen, ob die beiden AcM-Gruppen auch in reinem Wasser entfernt werden können, wurde **40** in H₂O gelöst, mit 10 eq gelöstem PdCl₂ versetzt und bei 37 °C geschüttelt. Vor der LC-MS-Analyse wurde das Palladium durch DTT desaktiviert (Abbildung 64).^[108] Bereits nach 5 min war die Reaktion vollständig und führte zum gewünschten Produkt **41** mit freien Cysteinen (Abbildung 65). Unter diesen Bedingungen eignet sich AcM als Schutzgruppe für die nativen Cysteine von EPO.

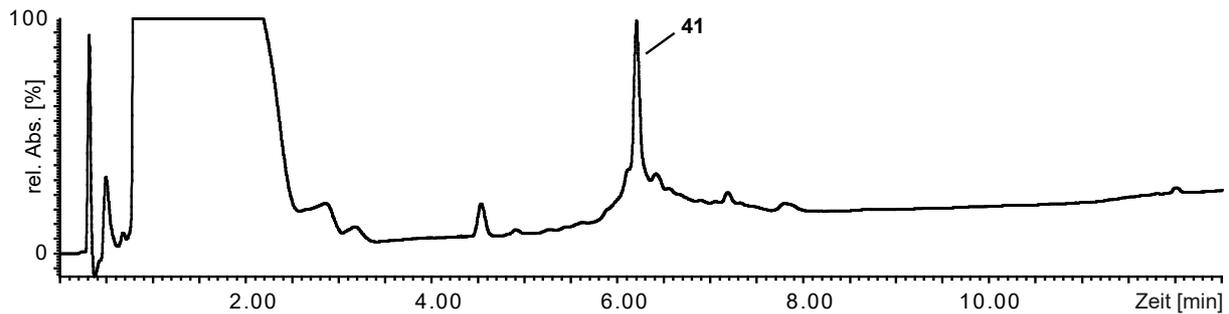


Abbildung 65: RP-UHPLC-Chromatogramm der AcM-Abspaltung zu EPO 29-67 (2xSH, Nona) **41**.

Das Hydrazid **40** wurde zum Thioester **E2** umgesetzt. Die Reinigung erfolgte per RP-HPLC und ergab **E2** in guter Reinheit und einer Ausbeute von 58 % (Abbildung 66).

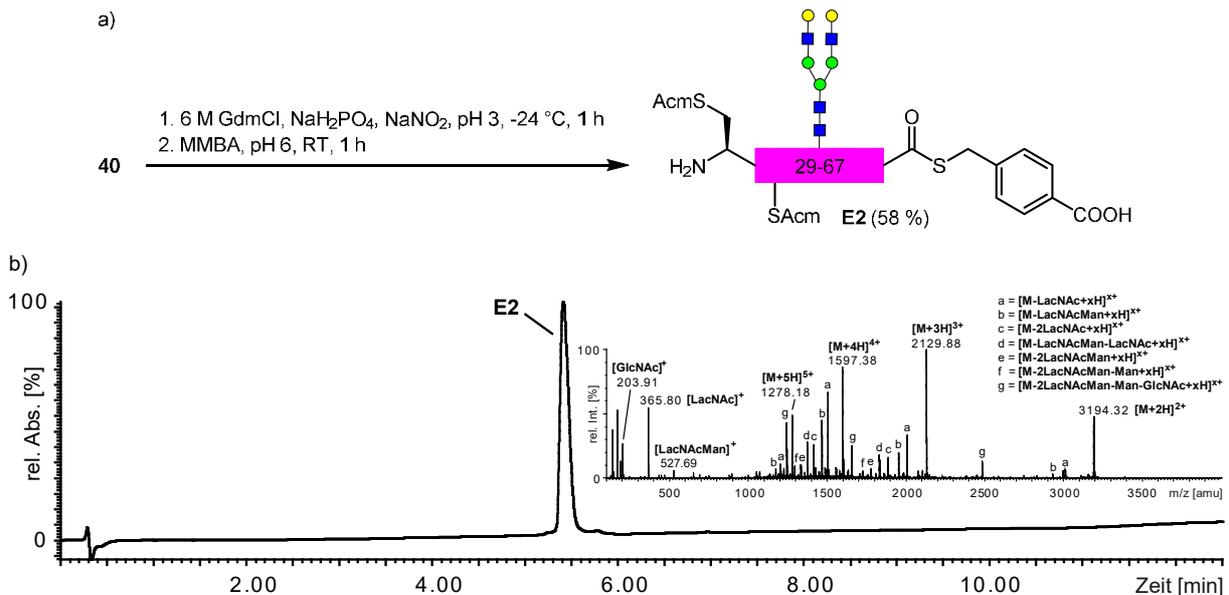


Abbildung 66: a) Synthese von EPO 29-67 (2xSAcM, Nona) MMBA **E2** und b) RP-UHPLC-MS von gereinigtem **E2**.

Die Reinigung per Gelfiltration ergab zwar eine Ausbeute von 83 %, allerdings nur in einer Reinheit von 80 % (Daten nicht gezeigt).

Auch eine Sialylierung des Glycopeptidhydrazids **40** wurde durchgeführt. Die Bedingungen, die bei der Sialylierung von EPO 1-28 (Nona) **23** angewandt wurden, mussten angepasst werden, um den Umsatz zu optimieren. Der höchste Umsatz wurde mit dem Glycopeptid **40** (0.5 mM) in Tris-HCl-Puffer (pH 9) und 24 eq CMP-Neu5Ac sowie α -2,6-Sialyltransferase erzielt. Nach 23 h bei 30 °C war ein Umsatz von 93 % zu verzeichnen. Das Rohprodukt wurde per RP-HPLC gereinigt, wodurch das sialylierte Glycopeptidhydrazid **42** in einer Ausbeute von 67 % erhalten wurde (Abbildung 67). Das Hydrazid EPO 29-67 **42** kann zur Synthese von sialylierten EPO-Glycoformen eingesetzt werden.

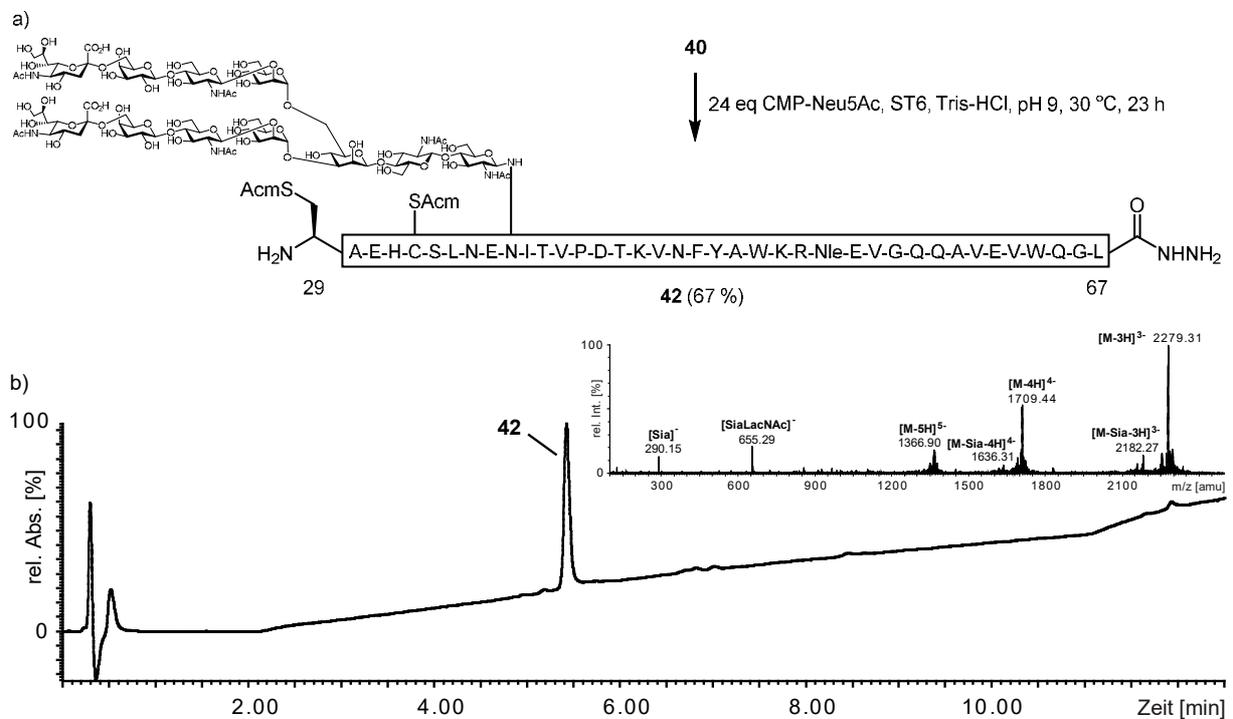


Abbildung 67: a) Synthese des sialylierten EPO 29-67 Hydrazids **42** und b) RP-UHPLC-MS von gereinigtem **42**.

6.2 Synthese von EPO 68-97 (TFAc) Glycopeptidhydraziden

Die Synthese des EPO 68-97 (TFAc) Peptids **46** erfolgte am Trt-CM-Harz **2** unter Einsatz von zwei Pseudoprolindipeptiden. Die Glycosylierungsstelle an Asp-83 wurde mit der orthogonalen Allylschutzgruppe versehen, das N-terminale Cys-68 wurde als Disulfid geschützt. An der Seitenkette des C-terminalen Lys-97 wurde die basenlabile TFAc-Gruppe

eingesetzt. Nach automatisierter Fmoc-SPPS ergab sich für das Harz **43** eine Ausbeute von 64 % (Abbildung 68).

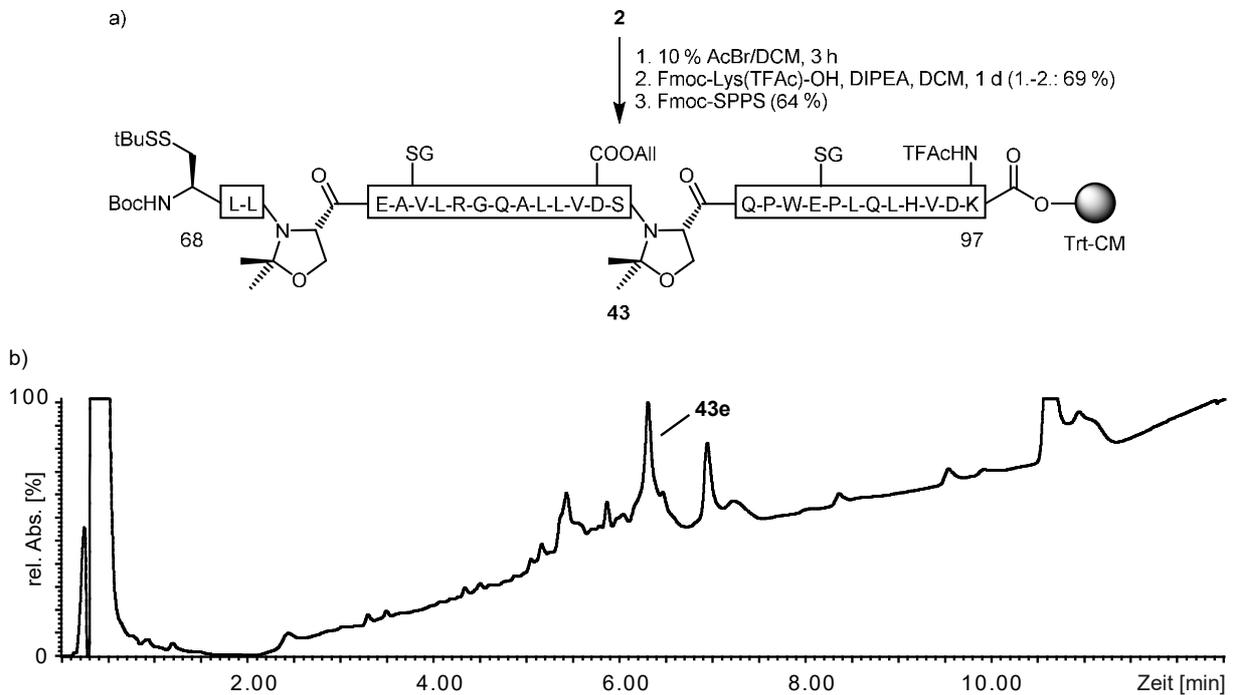


Abbildung 68: a) Synthese von EPO 68-97 (Oall, TFAc)-Trt-CM **43** und b) RP-UHPLC-Chromatogramm von **43e**.

Anschließend wurde die geschützte Peptidylsäure mit 1.5 % TFA/2% TES/DCM vom Harz abgespalten und *in situ* ins Hydrazid überführt (Abbildung 69). Nach Flash-Chromatographie wurde das EPO 68-97 Hydrazid **44** in einer Ausbeute von > 100 % erhalten (Abbildung 70).

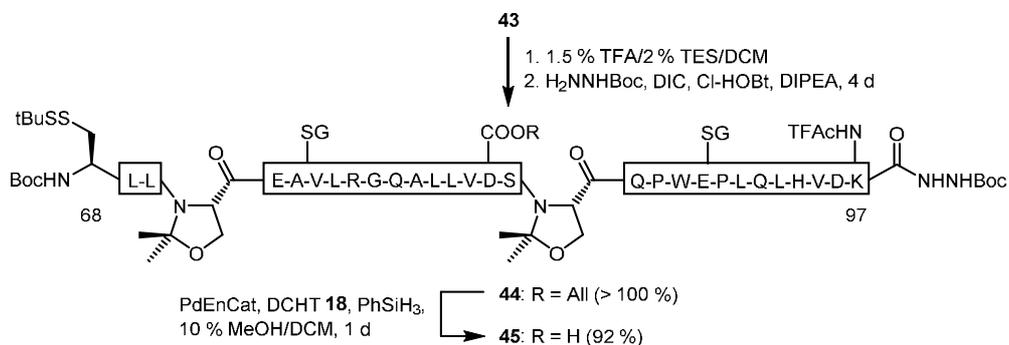


Abbildung 69: Synthese des EPO 68-97 Hydrazids **44** und Allylabsplattung.

Die Desallylierung gelang mit dem festphasengebundenen Palladiumacetat Pd^{II}EnCat® und dem Phosphinliganden DCHT **18** (Abbildung 69). Nach der Reaktion wurde das

immobilisierte Palladium abfiltriert und das Rohprodukt **45** per Flash-Chromatographie gereinigt. Das EPO 68-97 Hydrazid **45** wurde in einer Ausbeute von 92 % erhalten und zeigte in entschützter Form nur wenige Verunreinigungen (Abbildung 70).

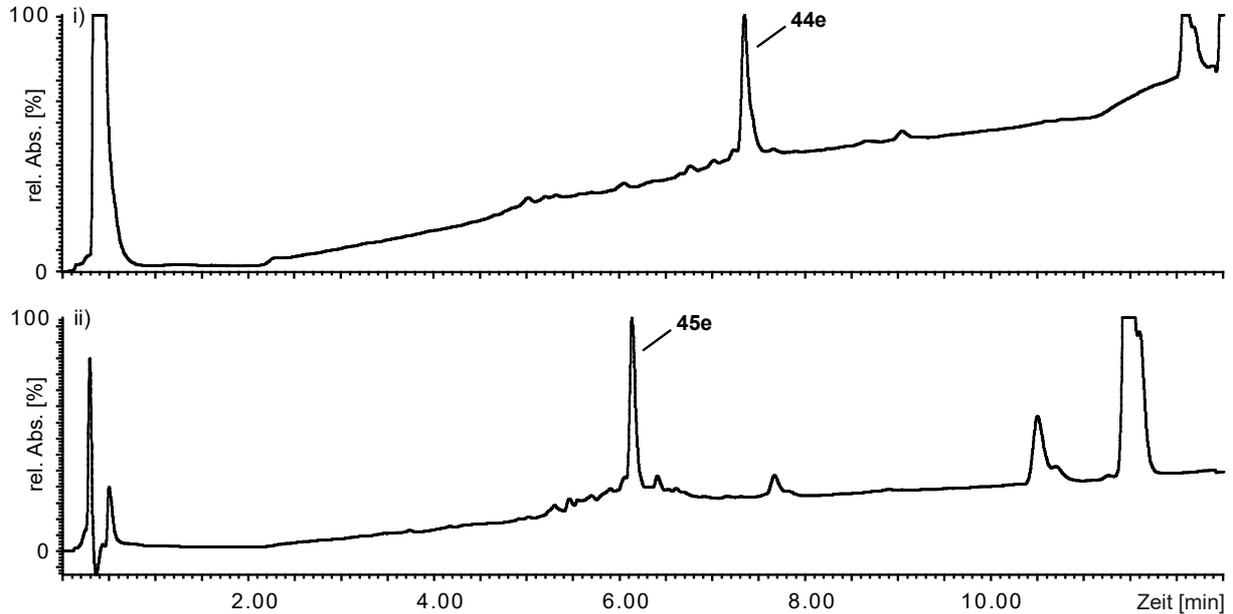


Abbildung 70: RP-UHPLC-Chromatogramme des i) EPO 68-97 (OAll, TFAc) Hydrazids **44e** und ii) EPO 68-97 (OH, TFAc) Hydrazids **45e**.

Für die *Lansbury*-Aspartylierung wurde das freie Asp-83 von Peptid **45** (1 eq) mit HATU, HOAt und DIPEA in DMF/DMSO (1:1) aktiviert und mit dem Nonasaccharidamin **7** (1.5 eq) gekuppelt (Abbildung 71). Nach 1 d wurde entschützt und das Rohprodukt **F2** nach Etherfällung per RP-HPLC gereinigt.

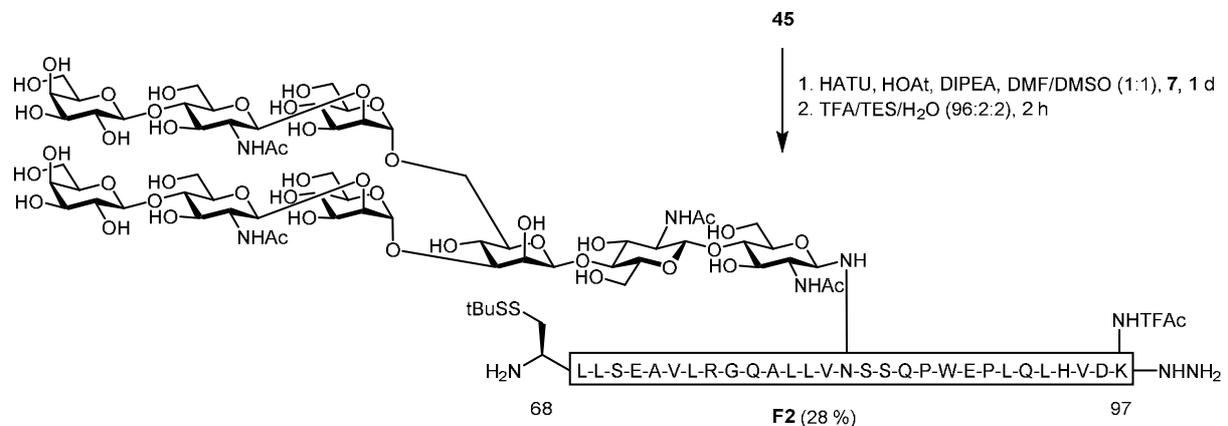


Abbildung 71: Synthese des EPO 68-97 Glycopeptids **F2**.

Die Verunreinigungen (unter anderem Aspartimid **45eAI**, das trotz benachbartem Pseudoprolin in größerer Menge entstand) konnten abgetrennt und das EPO 68-97 Glycopeptidhydrazid **F2** in guter Reinheit erhalten werden (Abbildung 72). Die Ausbeute an **F2** betrug 28 %. *Hessefort* fand zudem heraus, dass es bei 1.5 % TFA zur Öffnung des Serin-ψpro kommt, was in einer Aspartimidbildung bei der Glycokupplung resultiert. Die Abspaltung vom Harz sollte daher bevorzugt mit 20 % HFIP/DCM erfolgen.^[207]

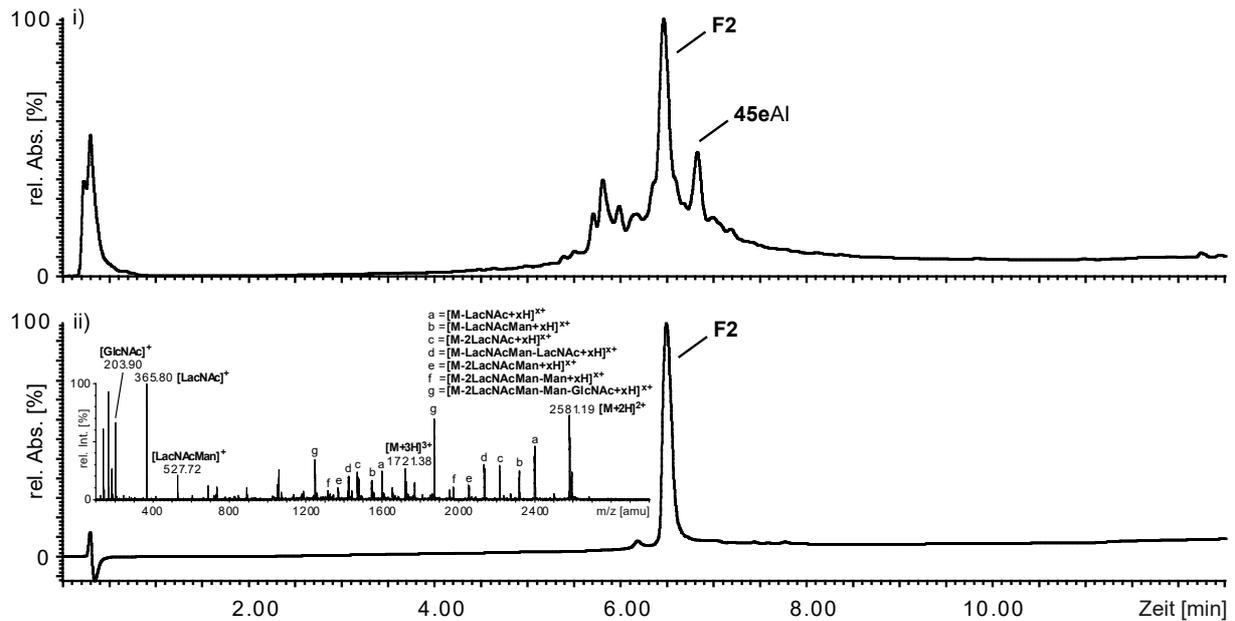


Abbildung 72: i) RP-UHPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **F2** und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 68-97 Glycopeptid **F2**.

Die Sialylierung von EPO 68-97 (Nona, TFAc) **F2** wurde ebenfalls untersucht. Auch hier wurden die Reaktionsbedingungen optimiert (Abbildung 73).

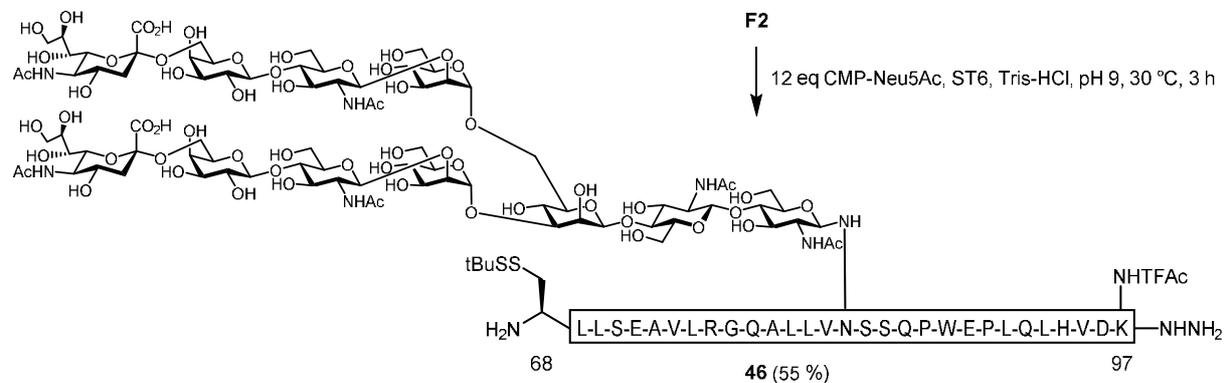


Abbildung 73: Synthese von EPO 68-97 (Undeca, TFAc) **46**.

Der höchste Umsatz wurde erzielt mit Peptid (2 mM) im Tris-HCl-Puffer (pH 9) und Zugabe von 12 eq CMP-Neu5Ac und α -2,6-Sialyltransferase (Abbildung 73). Bei 30 °C war die Reaktion nach 3 h zu 92 % vollständig. Es trat nur ein geringer Verlust der TFAc-Schutzgruppe auf (ca. 1 %). Die RP-HPLC-Reinigung ergab EPO 68-97 (Undeca, TFAc) **46** in hoher Reinheit und 55 % Ausbeute (Abbildung 74). Das sialylierte Glycopeptid **46** kann zur Darstellung von EPO mit sialylierten *N*-Glycanen dienen.

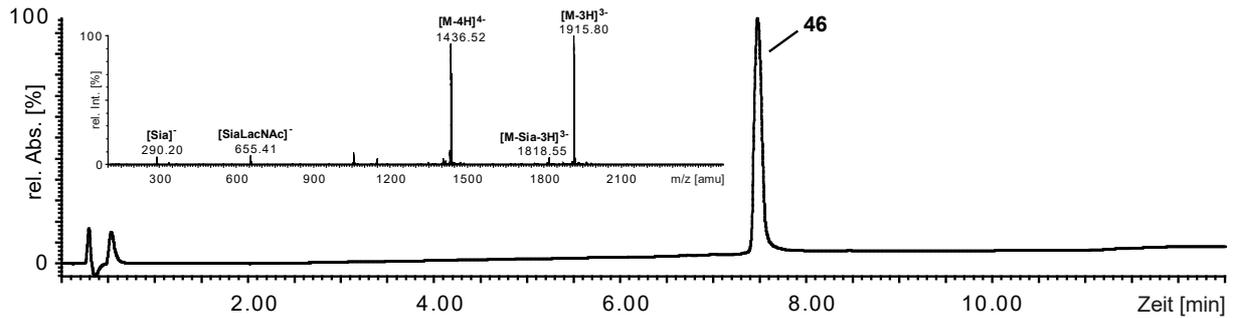


Abbildung 74: RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 68-97 (Undeca, TFAc) **46**.

6.3 Synthese des doppelt glycosylierten EPO 29-97 Thioesters **48**

Die Fragmente **E2** und **F2** wurden durch NCL verknüpft. Es wurden für die NCL 1 eq **E2** und 1.1 eq des Hydrazids **F2** verwendet. Die Ligation erfolgte unter Inertgasatmosphäre in 8 M GdmCl bei pH 6.9 (Abbildung 75).

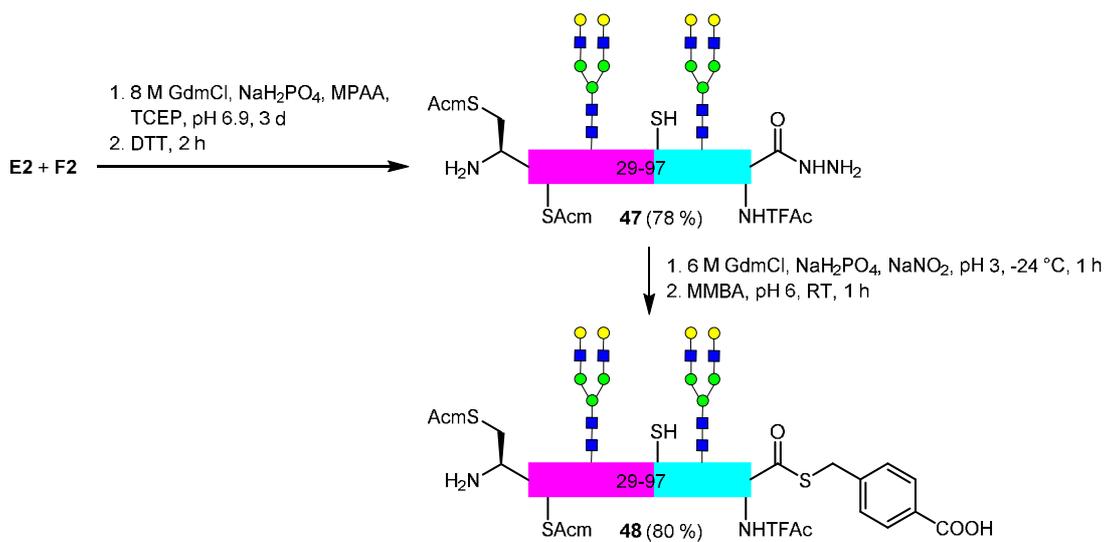


Abbildung 75: Synthese von EPO 29-97 (2xSAcm, 2xNona, TFAc) **47** und Thioveresterung.

Nach 3 d wurde reduziert und per RP-HPLC gereinigt. Das Lignationsprodukt **47** wurde in guter Reinheit und 78 % Ausbeute gewonnen (Abbildung 76). Bei der Ligation einer gefilterten Charge von **E2** (1.1 eq) mit 80 % Reinheit wurde nach RP-HPLC-Reinigung dagegen nur eine Ausbeute von 38 % an Lignationsprodukt **47** erhalten (Daten nicht gezeigt). Eine RP-HPLC-Reinigung des Thioesters **E2** vor der Ligation ist daher wichtig. Anschließend wurde das Lignationsprodukt **47** zum Thioester **48** umgesetzt (Abbildung 75). Durch die im Anschluss durchgeführte RP-HPLC-Reinigung konnten nicht alle Verunreinigungen abgetrennt werden (Abbildung 76). Der Thioester EPO 29-97 **48** wurde in einer Ausbeute von 80 % und einer Reinheit von 79 % erhalten. Bei der Reaktion war kein Verlust der TFAC-Schutzgruppe und keine Caprolactambildung des terminalen Lys-97 zu beobachten.

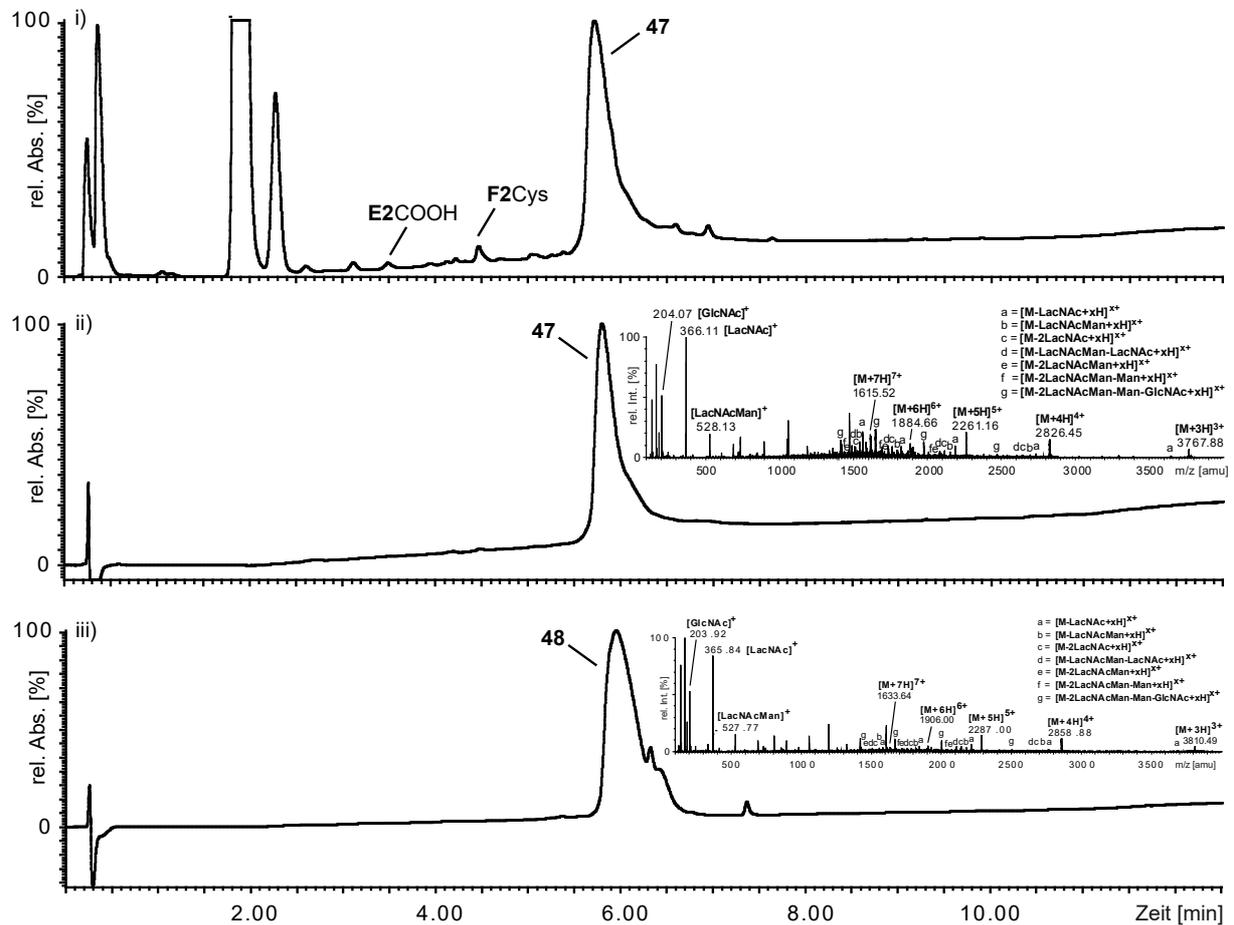


Abbildung 76: i) RP-UHPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **47**, ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 29-97 Hydrazid **47** und iii) von gereinigtem EPO 29-97 Thioester **48**.

6.4 Synthese von EPO 98-166 (SPhacm) **51** und EPO 98-166 (SAcm) **53**

Da die Phacm-Schutzgruppe im Gegensatz zur AcM-Schutzgruppe auch enzymatisch entfernt werden kann, sollten EPO 98-166 **51** und **53** mit Phacm- und AcM-geschütztem Cys-161 aufgebaut werden.^[102,110] Daran sollte die Anwendbarkeit der Pd-katalysierten Abspaltung der Phacm- und AcM-Schutzgruppen getestet werden.^[100,108,109] Die beiden EPO 128-166 Peptide **H3** und **H2** wurden durch Fmoc-SPPS am Trt-CM-Harz **2** unter Einsatz von drei Pseudoprolindipeptiden aufgebaut (Abbildung 77).

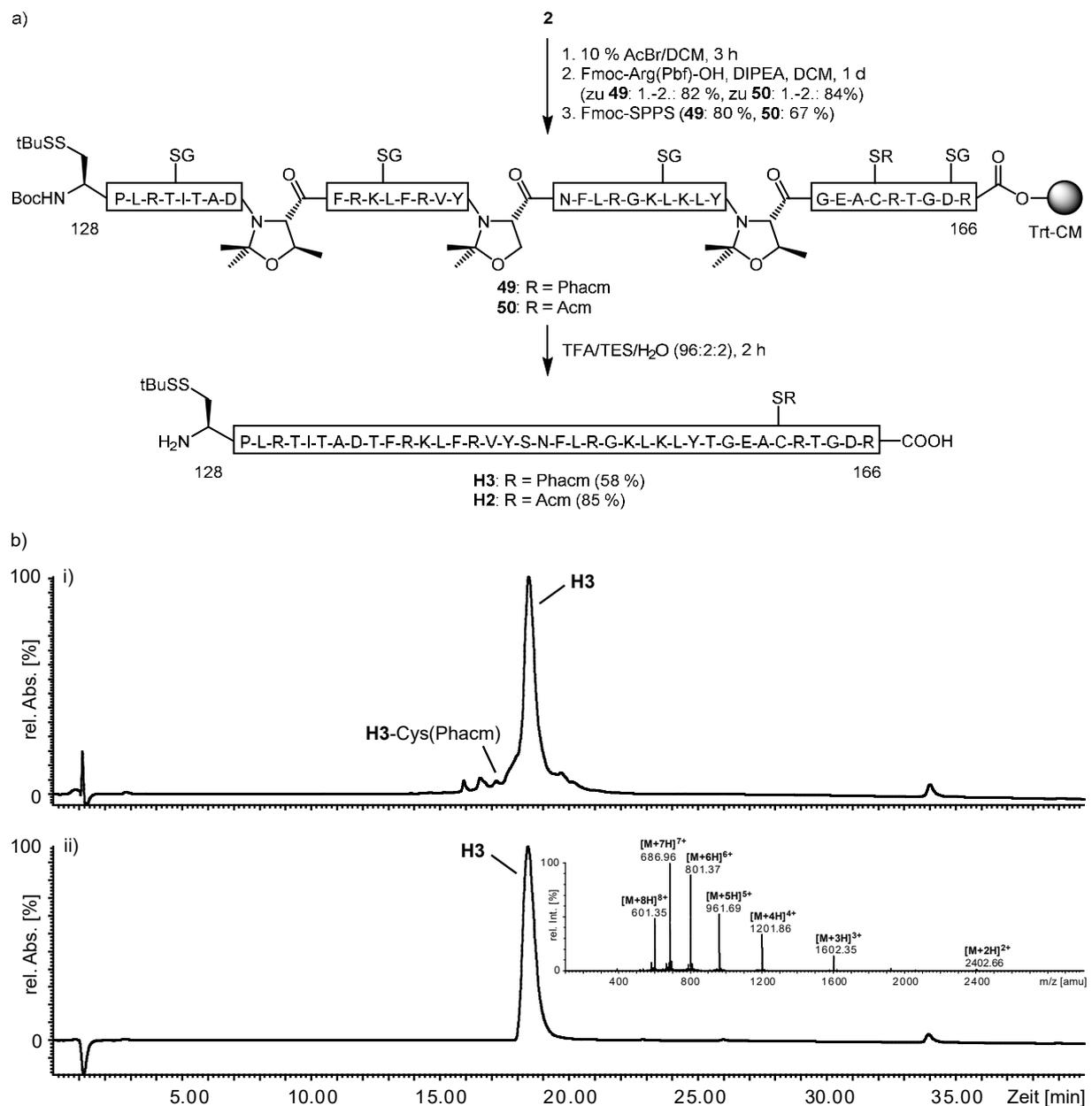


Abbildung 77: a) Synthese von EPO 128-166 (SPhacm) **H3** und EPO 128-166 (SAcm) **H2** und b) i) RP-HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **H3** und ii) RP-HPLC-MS von gereinigtem **H3**.

Für das Harz **49** ergab sich nach Peptidelongation eine Ausbeute von 80 % und für das Harz **50** von 67 %. Die Peptidylsäuren **H3** bzw. **H2** wurden unter globaler Entschützung vom Harz abgespalten und nach Etherfällung per RP-HPLC gereinigt. EPO 128-166 (SPhacm) **H3** und EPO 128-166 (SAcm) **H2** wurden in hoher Reinheit und 58 % bzw. 85 % Ausbeute erhalten (Abbildung 77 und Abbildung 78).

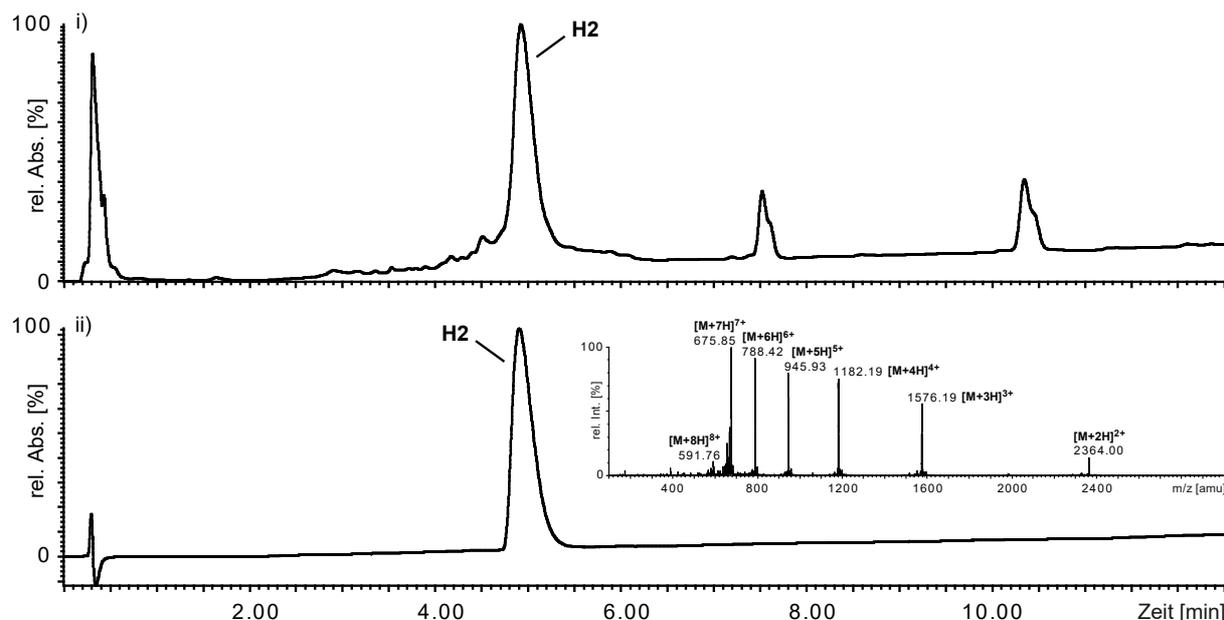


Abbildung 78: i) RP-UHPLC-Chromatogramm von entschütztem EPO 128-166 (SAcm) **H2** und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem **H2**.

Anschließend wurde EPO 98-127 *n*Bu-3-McP **G** (1.2 eq) mit **H3** (1 eq) bzw. **H2** (1 eq) ligiert (Abbildung 79). Nach 6 d wurde das Rohprodukt **51** mit DTT reduziert, gefiltert und per RP-HPLC gereinigt. Ein Ligationsprodukt mit freiem Cys-98 **51**Cys und das daraus entstandene doppelt ligierte Nebenprodukt **G51**Cys konnten entfernt werden. EPO 98-166 (Thz, SPhacm) **51** wurde in guter Reinheit und 53 % Ausbeute gewonnen. Im Chromatogramm nach der Reinigung war auch **51**Cys nachweisbar.

Das Rohprodukt **52** mit AcM-geschütztem Cys-161 wurde nach 3 d mit DTT reduziert und gefriergetrocknet. Das als Thz geschützte Cys-98 an **52** wurde durch Methoxyamin bei pH 3.3 entschützt. Nach erneuter DTT-Zugabe erfolgte eine RP-HPLC-Reinigung, wodurch fast alle Verunreinigungen, unter anderem hydrolysiertes Thioester mit freiem Cys-98 **30e**Cys und doppeltligiertes Peptid **G53**, entfernt werden konnten (Abbildung 80).

Synthese von dreifach glycosyliertem Erythropoietin nach der AcM/TFAc-Strategie

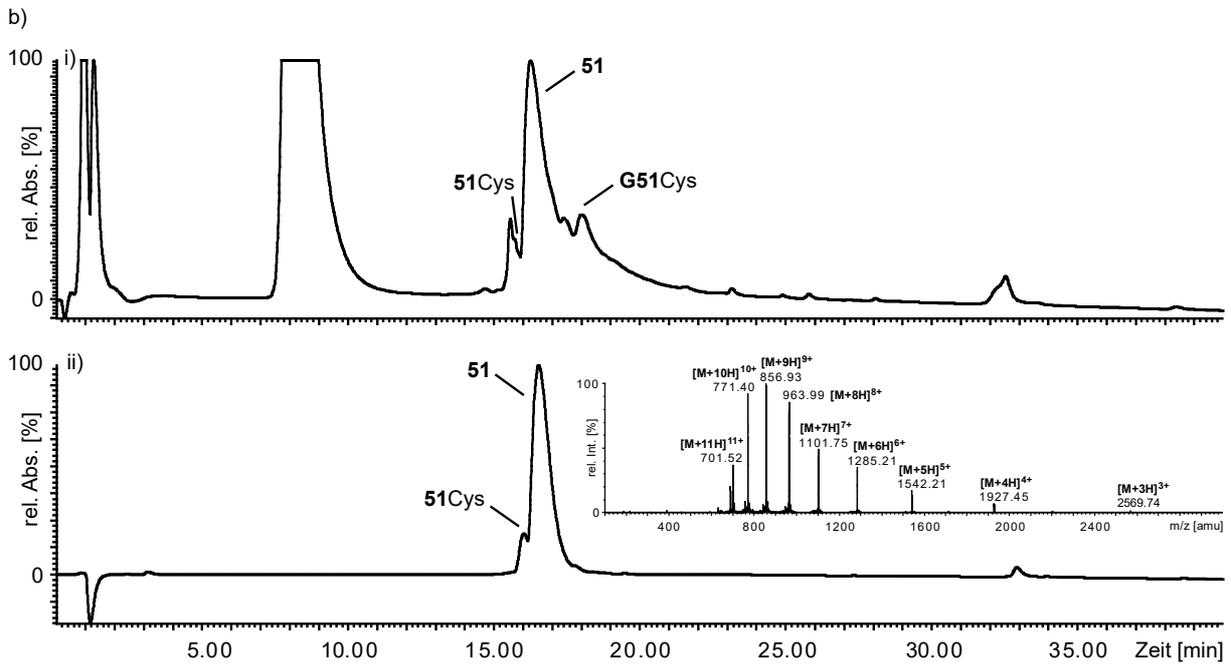
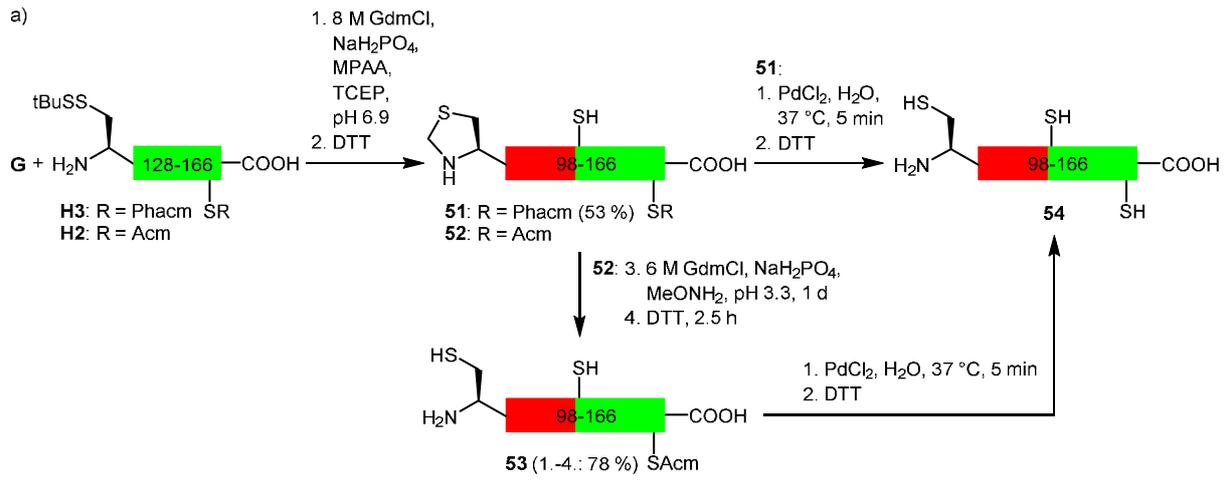


Abbildung 79: a) Synthese von EPO 98-166 (Thz, SPhacm) **51** und EPO 98-166 (SAcm) **53** und Entschützung und b) i) RP-HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **51** und ii) RP-HPLC-MS von gereinigtem **51**.

EPO 98-166 (SAcm) **53** wurde in 78 % Ausbeute bezogen auf **H2** erhalten. Erfolgte bereits nach der NCL zu **52** eine RP-HPLC-Reinigung, so wurde **53** in einer Gesamtausbeute von 51 % bezogen auf **H2** erhalten.

Die enzymatische Entfernung der Phacm-Schutzgruppe an **51** durch die Penicillin G Acylase (PGA) wurde mit löslichem und immobilisiertem Enzym versucht, führte jedoch nur zu einer unvollständigen Entschützung von Cys-161 (Daten nicht gezeigt).^[102,110] Daher wurde die Abspaltung der Phacm-Gruppe mit PdCl₂ in H₂O bei 37 °C getestet.^[109] Das N-terminale Thz sollte dabei auch geöffnet werden (Abbildung 79).^[100]

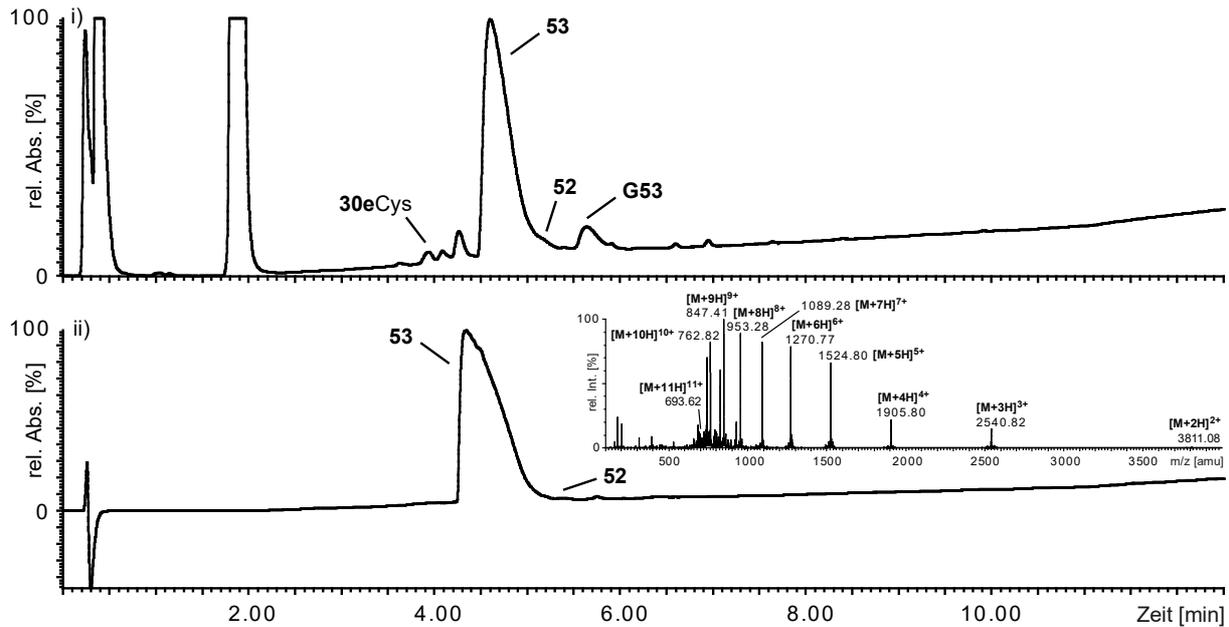


Abbildung 80: i) RP-UHPLC-Chromatogramm des Rohprodukts EPO 98-166 (SAcM) 53 und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem 53.

Bei Verwendung von 7.5 eq PdCl₂ war fast ausschließlich Produkt mit freiem Cys-161 und N-terminalem Thz 54Thz zu sehen. Wurde die Menge an PdCl₂ erhöht (15 eq), so wurde auch der Anteil an dem erwarteten Produkt 54 höher (Abbildung 81). Somit ist eine selektive Abspaltung von Phacm mit PdCl₂ in Wasser möglich.

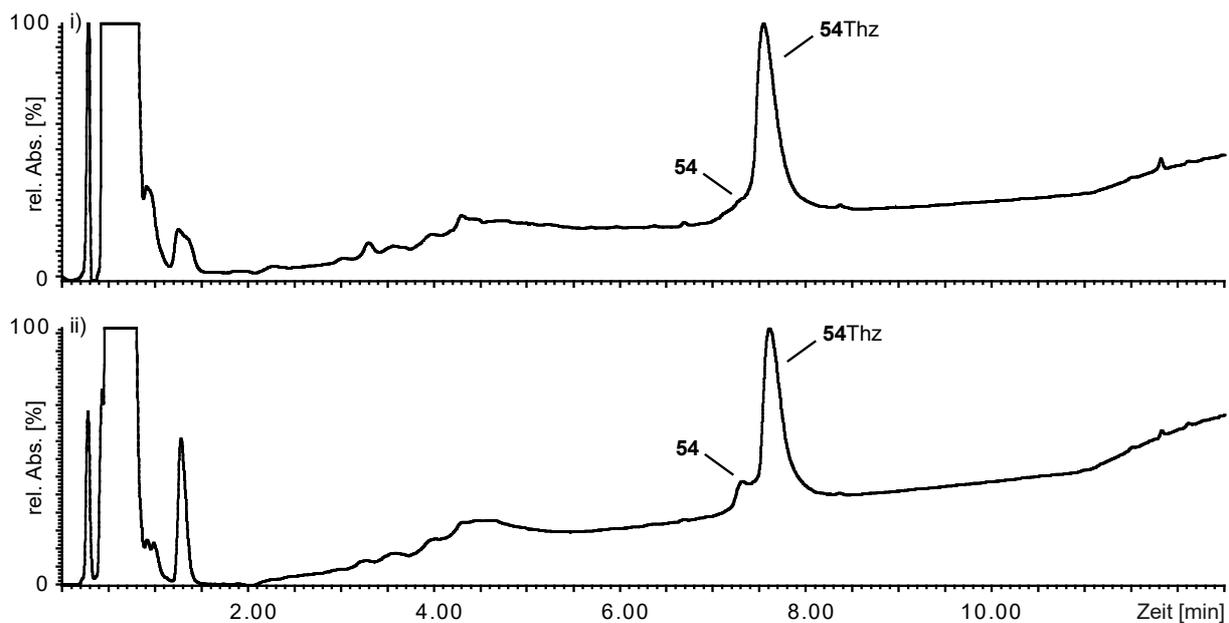


Abbildung 81: Thz-Öffnung und Phacm-Abspaltung zu EPO 98-166 (3xSH) 54 mit i) 7.5 eq PdCl₂ und ii) 15 eq PdCl₂ nach 5 min.

An EPO 98-166 (SAcM) **53** wurde ebenfalls die Entschützung von Cys-161 mit 7.5 eq PdCl₂ in H₂O bei 37 °C getestet (Abbildung 79).^[108] Bereits nach 5 min war eine vollständige Abspaltung der AcM-Gruppe erreicht (Abbildung 82). Somit sind die PhAcM- und AcM-Gruppe als Schutzgruppen für die nativen Cysteine von EPO geeignet.

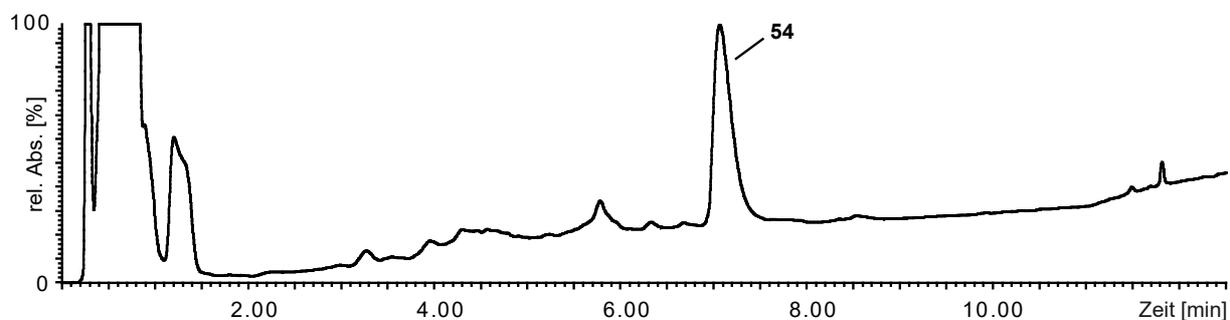


Abbildung 82: RP-UHPLC-Chromatogramm der AcM-Abspaltung zu EPO 98-166 (3xSH) **54**.

6.5 Synthese von doppelt glycosyliertem EPO 29-166 **59**

Die Darstellung von EPO 29-166 **59** sollte durch Ligation des EPO 29-97 Glycopeptidthioesters **48** mit dem EPO 98-166 Peptid **53** und anschließender Entschwefelung sowie AcM-Abspaltung versucht werden. Auch ein geeigneter Modus für die Entfernung der TFAc-Schutzgruppe an Lys-97 sollte gefunden werden. Die NCL von **48** (1 eq) mit **53** (1.2 eq) wurde in 8 M GdmCl bei pH 6.9 durchgeführt (Abbildung 83).

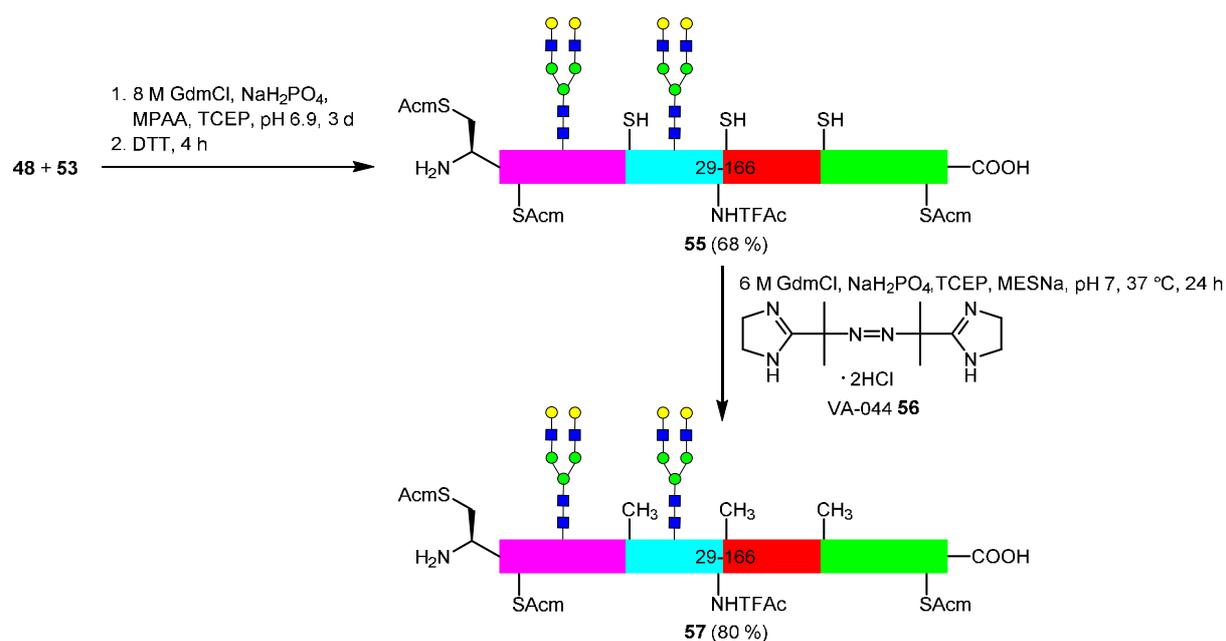


Abbildung 83: Synthese von EPO 29-166 (3xSAcM, TFAc) **55** und Entschwefelung.

Es wurde nach 3 d mit DTT reduziert und per RP-HPLC gereinigt. Das Ligationprodukt EPO 29-166 (3xSAcM, TFac) **55** wurde in guter Reinheit und einer Ausbeute von 68 % gewonnen (Abbildung 84). Auch bei der NCL blieb die TFac-Schutzgruppe erhalten und es wurde kein ϵ -Caprolactam beobachtet. Beim Einsatz einer gelfiltrierten Charge des Thioesters **48** (64 % Reinheit) wurde bei der NCL lediglich eine Ausbeute an **55** von 49 % erzielt.

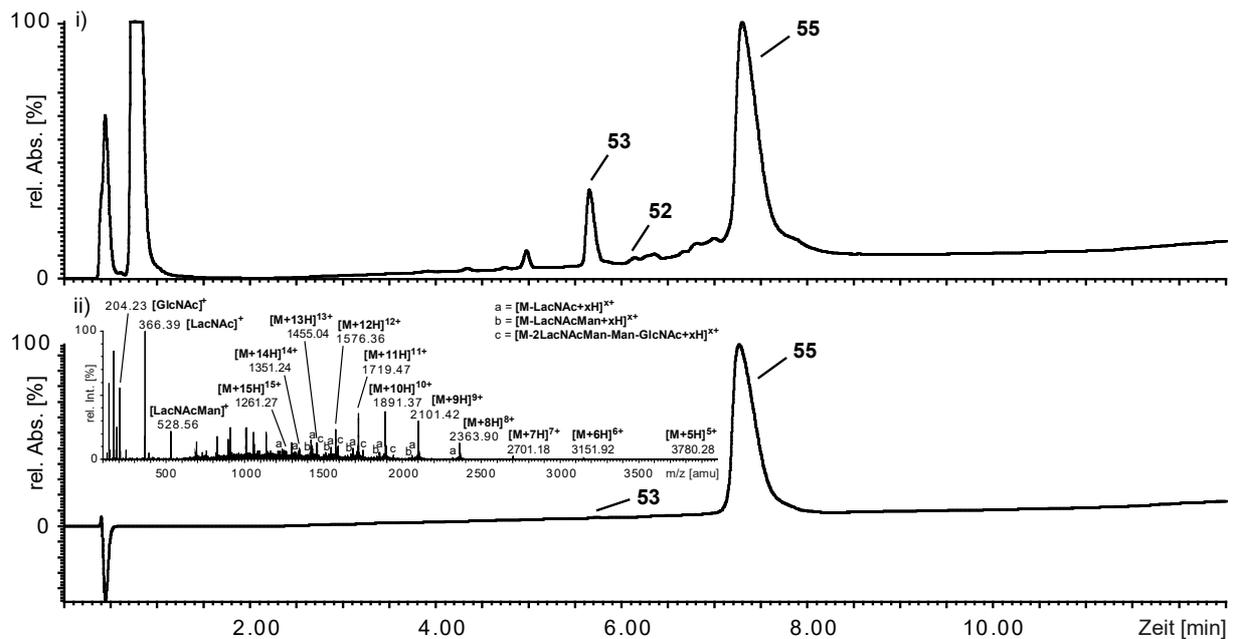


Abbildung 84: i) RP-UHPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **55** und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 29-166 (3xSAcM, TFac) **55**.

Am Ligationprodukt **55** wurde die Abspaltung der basenlabilen TFac-Schutzgruppe mit verschiedenen Reagenzien getestet (Daten nicht gezeigt).^[98,208,209,210] Bei Verwendung von Piperidin kam es bei **55** zur Aspartimidbildung an Asparagin.^[83,189] NaOH und LiOH führten zu einer β -Eliminierung von SAcM zu Dehydroalanin.^[178,211,212] Bei Natriumborhydrid war im Chromatogramm kein Peptid mehr zu sehen, möglicherweise aufgrund einer Komplexbildung.^[213,214] Der Einsatz von Imidazol bewirkte keinen Umsatz des Edukts **55**.^[209] Mit Ethylendiamin und Ethanolamin verlief die Abspaltung von TFac nur unvollständig.^[210] Die TFac-Abspaltung an **55** war somit ungünstig. Daher wurden zunächst die nicht-nativen Cysteine an den Ligationstellen 68, 98 und 128 von EPO 29-166 **55** zu den nativen Alaninen entschwefelt. Dies erfolgte radikalisch unter anaeroben Bedingungen im denaturierenden Phosphatpuffer bei pH 7 mit TCEP (0.9 M) und Natrium-2-sulfanylethansulfonat (MESNa) (0.6 M). Durch Zugabe des Radikalinitiators VA-044 **56** (15 mM, 60 eq bezogen auf **55**) wurde die Reaktion gestartet und bei 37 °C stark geschüttelt (Abbildung 83).^[116] Nach 24 h

war der Umsatz vollständig. Die RP-HPLC-Reinigung ergab das EPO 29-166 Glycopeptid **57** mit Ala-68, 98 und 128 in hoher Reinheit und einer Ausbeute von 80 % (Abbildung 85).

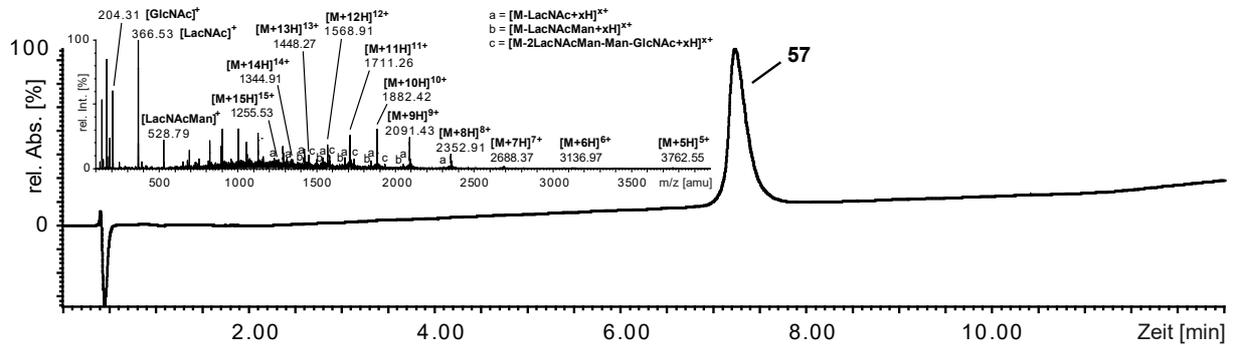


Abbildung 85: RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 29-166 (3xS_{Ac}M, 3xCH₃, T_{Fac}) **57**.

An dem Glycopeptid **57** wurde die T_{Fac}-Entfernung getestet (Daten nicht gezeigt). Wurde NaOH eingesetzt, so führte dies zur Eliminierung von S_{Ac}M.^[178,212] Ethylendiamin und Cysteamin ergaben nur eine unvollständige Entschützung.^[210] Somit war auch **57** kein günstiges Substrat für die Abspaltung der T_{Fac}-Gruppe. Daher wurde zunächst die Entschützung der nativen Cysteine-29, 33 und 161 von EPO 29-166 **57** angestrebt.

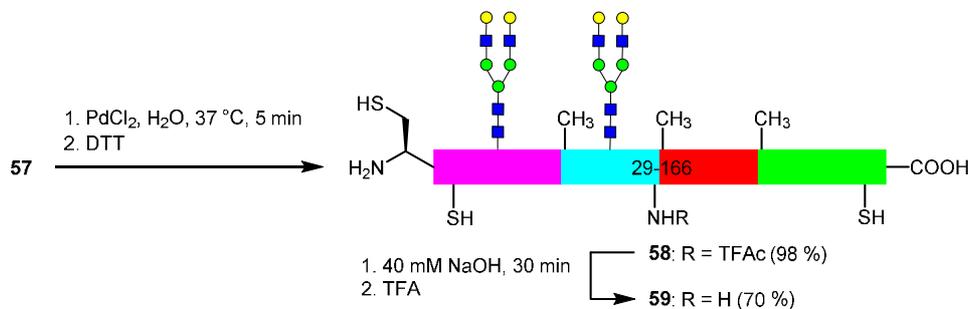


Abbildung 86: Abspaltung der AcM- und der T_{Fac}-Schutzgruppen an EPO 29-166 **57**.

Zur Abspaltung der AcM-Schutzgruppen wurden 15 eq PdCl₂ in H₂O bei 37 °C verwendet. Bereits nach 5 min waren die drei Cysteine vollständig entschützt (Abbildung 86). Zur Desaktivierung des Palladiums wurde DTT zugegeben und der Komplex durch starke Zentrifugation pelletiert. Nach Reinigung (RP-HPLC) wurde EPO 29-166 (3xSH, T_{Fac}) **58** in 98 % Ausbeute gewonnen (Abbildung 87). Da die Cysteine in **58** nicht mehr durch AcM geschützt waren, sollte die basische Abspaltung der T_{Fac}-Gruppe zu weniger Nebenreaktionen führen. Dieses wurde getestet durch Lösen von EPO 29-166 (T_{Fac}) **58** in 40 mM NaOH (pH 13) (Abbildung 86).^[178] Nach 30 min war Lys-97 vollständig entschützt und es trat

keine β -Eliminierung zu Dehydroalanin auf. Nach Ansäuern mit TFA und RP-HPLC-Reinigung wurde EPO 29-166 **59** in einer Ausbeute von 70 % erhalten (Abbildung 87).

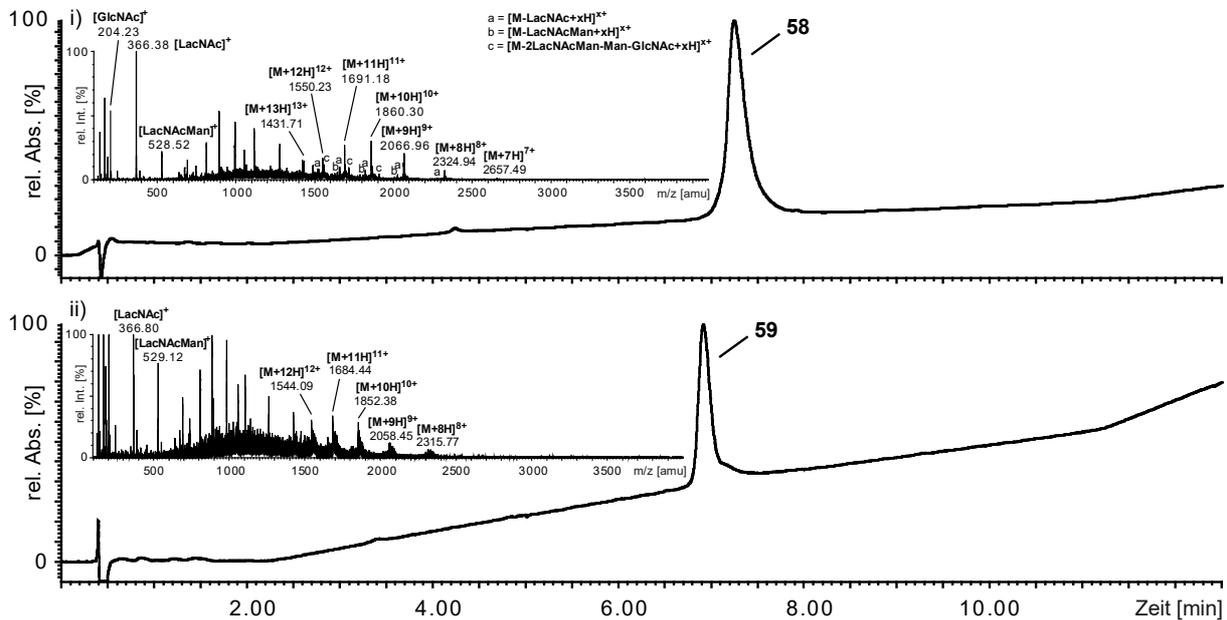


Abbildung 87: RP-UHPLC-MS von i) gereinigtem EPO 29-166 (3xSH, TFAc) **58** und ii) von gereinigtem EPO 29-166 (3xSH) **59**.

6.6 Ligation und Rückfaltung zu EPO (3xNona) **D**

Die Ligation des EPO 1-28 (Nona) Thioesters **B2** (1.6 eq) mit EPO 29-166 (2xNona) **59** (1 eq) wurde in 8 M GdmCl bei pH 6.9 mit MPAA und TCEP durchgeführt (Abbildung 88). Nach 3 d erfolgte eine LC-MS-Analyse der Reaktionsmischung, die das Ligationsprodukt **D^{red}** zeigte und den im Überschuss eingesetzten Thioester **B2**, ebenso wie die freie Säure **B2COOH** und das Thiolacton **B2Thiolacton**. Die EPO 1-28-Derivate entstanden während der NCL, da der eingesetzte Thioester **B2** durch RP-HPLC gereinigt war und ohne Nebenprodukte vorlag. Da noch restliches EPO 29-166 **59** vorhanden war, wurden nochmals 1.6 eq **B2** zugegeben. Nach einem weiteren Tag wurde die Reaktion per LC-MS überprüft, die jedoch nicht weiter fortgeschritten war (Abbildung 89). Daher wurde nach 4 d eine oxidative Rückfaltung zu EPO (3xNona) **D** durchgeführt. Hierbei wurde die Ligationmischung verdünnt und zunächst die Cysteine reduziert. Die Oxidation erfolgte durch ein Cystein-Cystin-*Shuffle*-System. Die Proteinfaltung wurde durch Dialyse mit sinkendem Anteil an GdmCl durchgeführt (Abbildung 88). Da die drei Zucker am Glycoprotein EPO **D^{red}** die Rückfaltung erleichtern sollten und um falsch gefaltete Intermediate nicht zu stabilisieren, wurde der Faltungshelfer Arginin weggelassen.

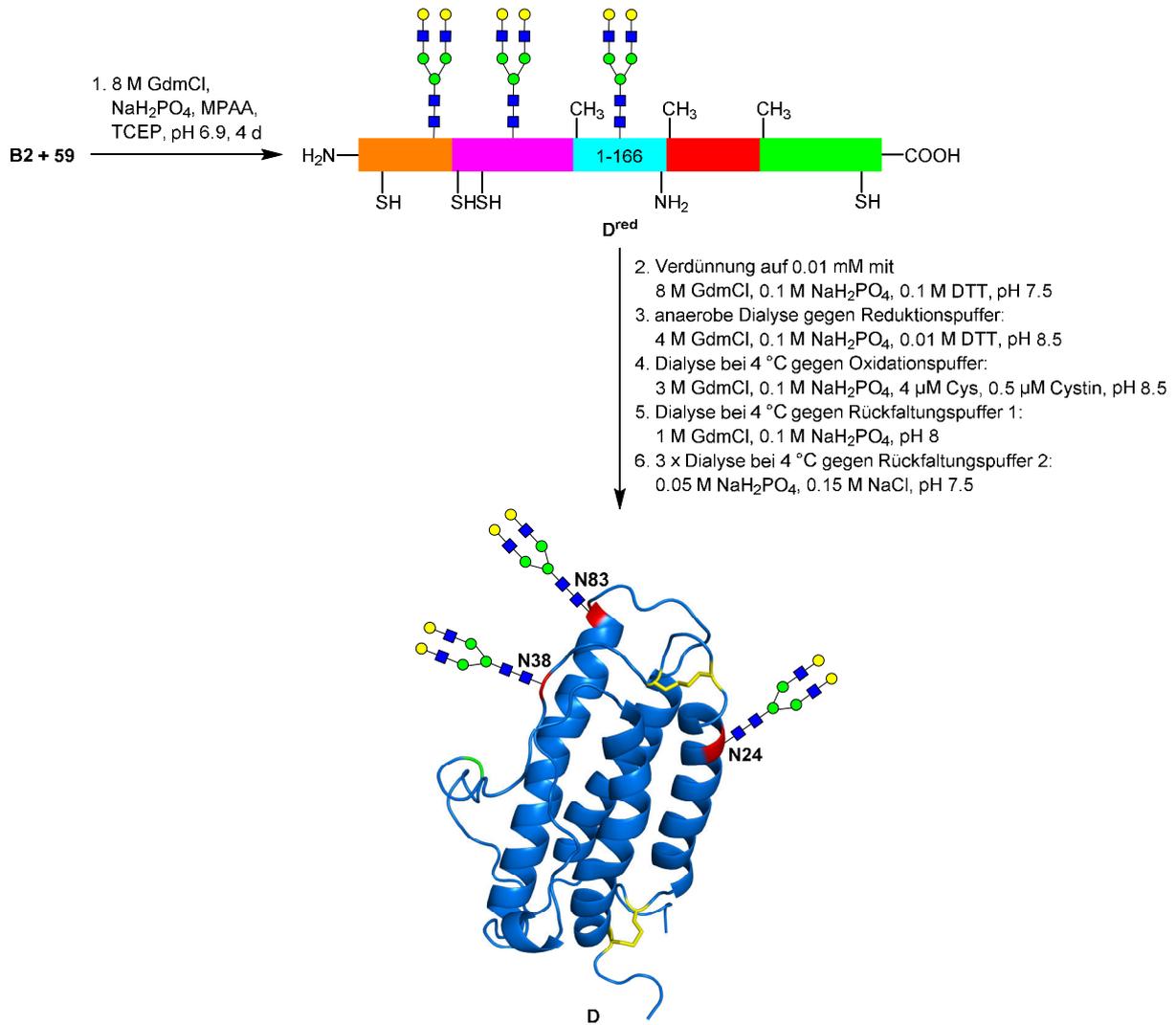


Abbildung 88: Synthese von EPO (3xNona) **D** mit nach der AcM/TFAc-Strategie synthetisiertem **59**.

Zur Abtrennung der Oligomere erfolgte eine Gelfiltration (Superdex 75). Da lediglich eine geringe Menge für die NCL und Rückfaltung eingesetzt wurde (100 % **D^{red}** entsprach 0.45 mg), war nicht mehr genug Substanz für eine LC-MS-Analyse der Produktfraktionen vorhanden, lediglich anhand der Retentionszeit konnte auf gefaltetes monomeres EPO (3xNona) **D** geschlossen werden (Abbildung 89). Auch die Oligomere **D^{Oligo}** wurden aufgrund der Retentionszeit zugeordnet. Bei den Peaks rechts neben **D^{Oligo}** und **D** könnte es sich um oligo- **59^{Oligo}** und monomeres EPO 29-166 (2xNona) **59** oder das Dimer der Säure von EPO 1-28 (Nona) **B2COOH**-Dimer handeln. Möglicherweise war der Überschuss an EPO 1-28 (Nona) Thioester **B2** (insgesamt 3.2 eq) hinderlich für die Rückfaltung und begünstigte den Substanzverlust. Die AcM/TFAc-Synthesestrategie ist nicht optimal und müsste mit größeren Mengen wiederholt werden um die Ergebnisse der Rückfaltung zu verifizieren.

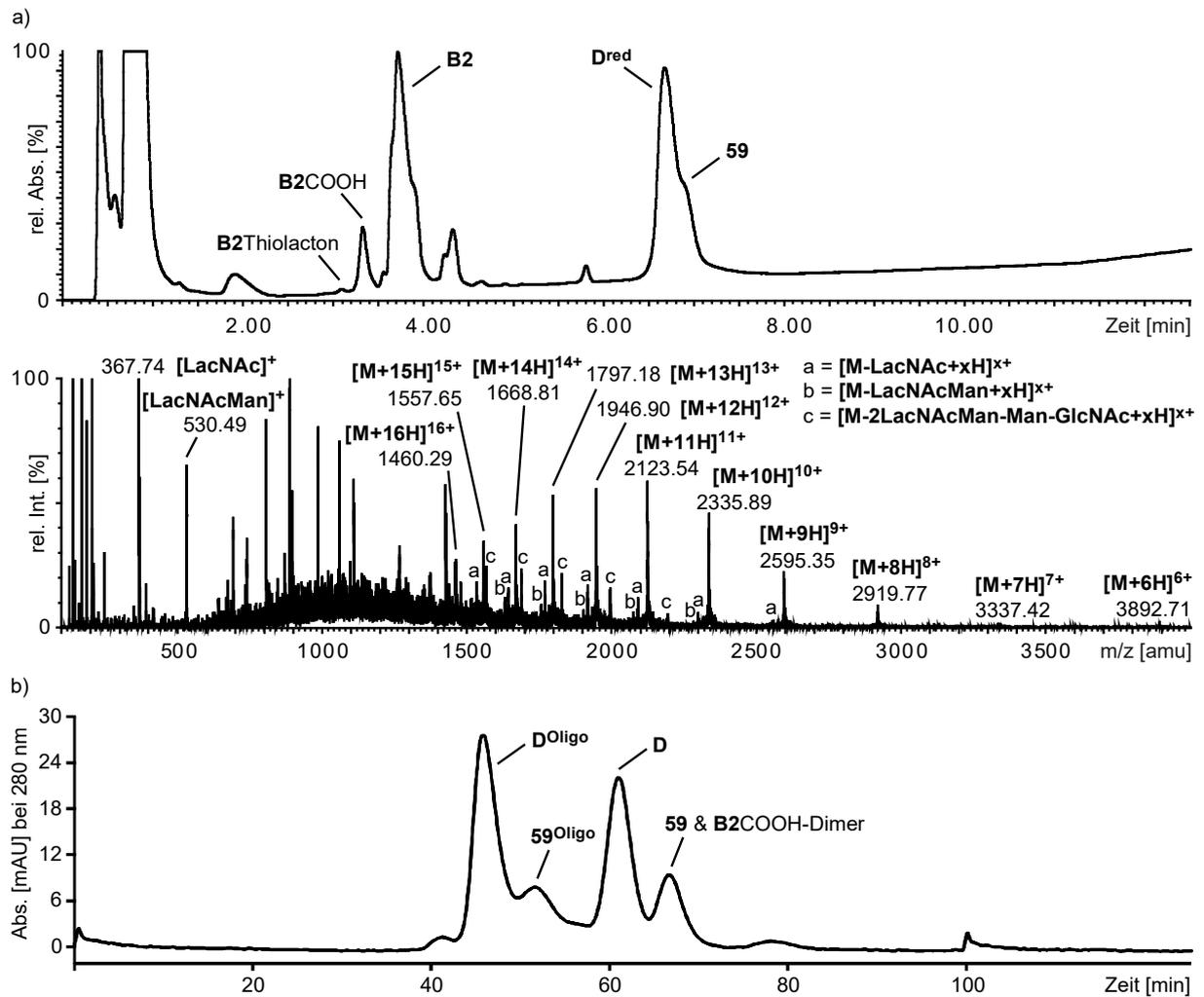


Abbildung 89: a) RP-UHPLC-MS der NCL zu EPO 1-166 (3xNona) D^{red} nach 4 d und b) UV-Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 75) des Rohprodukts **D** (Peaks anhand der Retentionszeit zugeordnet).

7 Synthese von dreifach glycosyliertem Erythropoietin nach der Acm-Strategie

Da die TFAc-Schutzgruppe an Lys-97 zahlreiche Probleme bereitete, wurde schließlich die Totalsynthese von dreifach *N*-glycosyliertem EPO mit freiem Lysin nach der Acm-Strategie versucht. Bei *Gross* trat bei der Synthese des EPO 29-97 Thioesters zu ca. 20 % eine ϵ -Caprolactambildung an Lys-97 auf.^[85] Die Umsetzung zum Thioester sollte daher optimiert werden, um diese Nebenreaktion zu vermeiden. EPO (3xNona) **D** sollte durch sequentielle Ligation der fünf Fragmente **B2-H2** und intermediäre Entschwefelung sowie Acm-Abspaltung zugänglich gemacht werden (Abbildung 90).

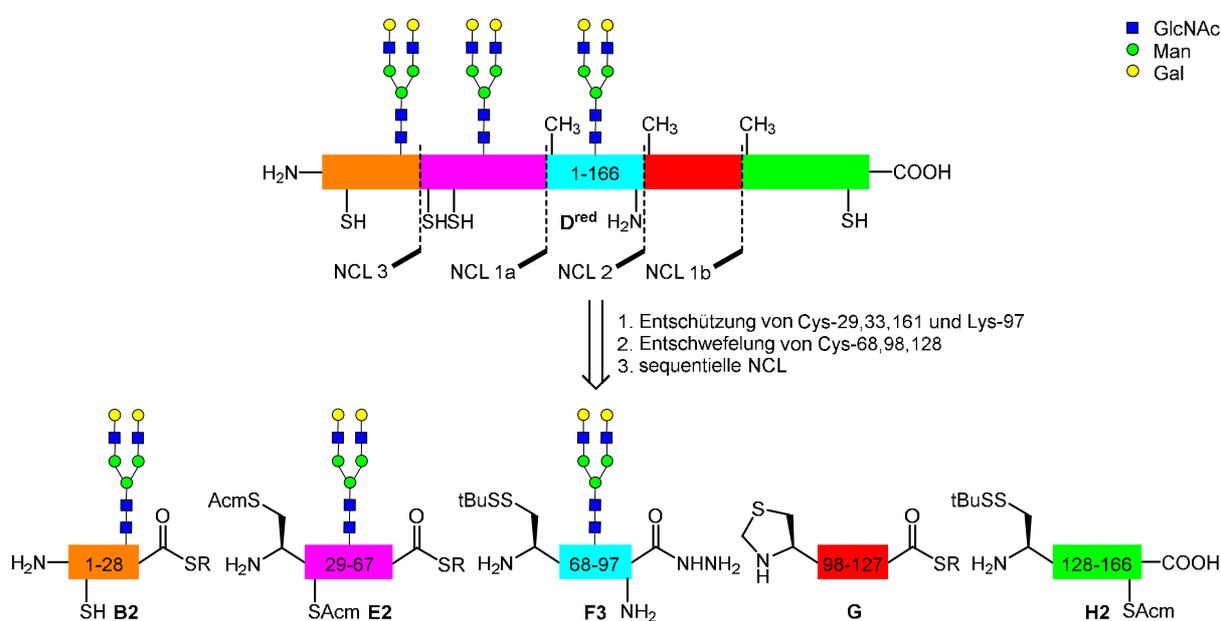


Abbildung 90: Retrosynthese von EPO (3xNona) **D** nach der Acm-Strategie.

7.1 Synthese des EPO 68-97 Glycopeptidhydrazids **F3**

Zur raschen Überprüfung der Synthesestrategie mit freiem Lys-97 wurde die TFAc-Schutzgruppe am EPO 68-97 (TFAc) Glycopeptidhydrazid **F2** mit 40 mM NaOH (pH 13) entfernt. Die Entschützung verlief im Gegensatz zu EPO 29-166 (TFAc) **55** und **57** nahezu ohne Nebenreaktionen und ohne β -Eliminierung des Disulfids an Cys-68. Nach 30 min war der Umsatz vollständig. Das Rohprodukt **F3** wurde nach Ansäuern mit Essigsäure per RP-HPLC gereinigt und ergab EPO 68-97 (Nona) **F3** in hoher Reinheit und einer Ausbeute von 68 % (Abbildung 91). Weiterhin wurde 0.5 M Piperidin/H₂O (pH 13) zur Abspaltung der

TFac-Gruppe verwendet. Eine Aspartimidbildung trat nicht auf, da keine freien Asparagine in der Sequenz vorhanden waren. Hierbei ergab sich allerdings nur eine Ausbeute von 44 % (Daten nicht gezeigt).

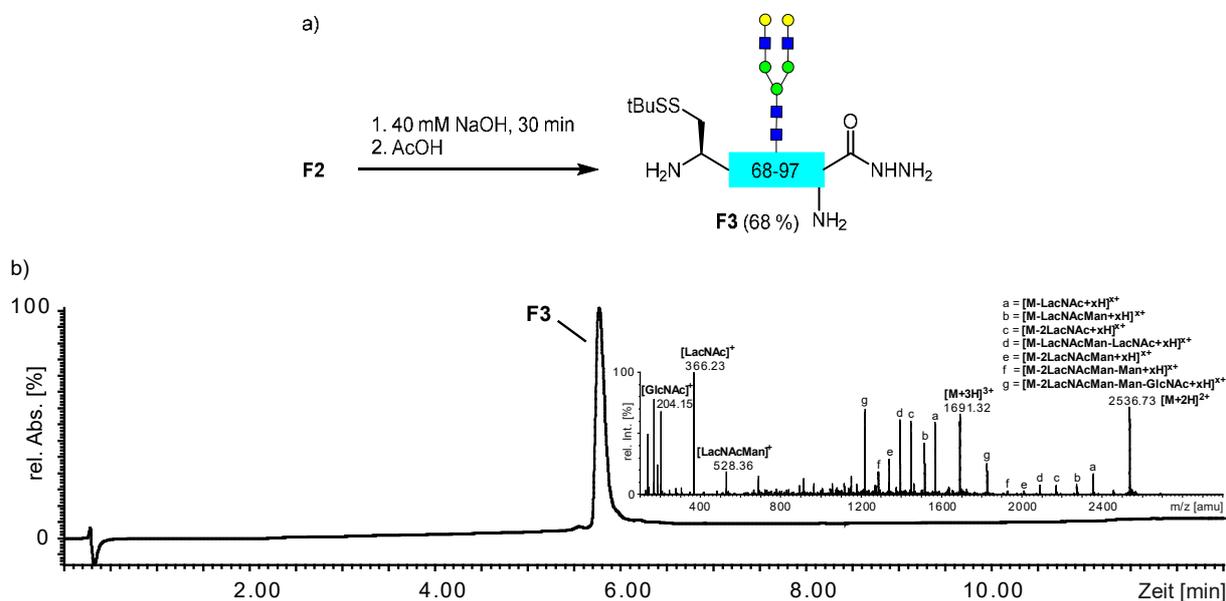


Abbildung 91: a) Synthese von EPO 68-97 (Nona) **F3** und b) RP-UHPLC-MS von gereinigtem **F3**.

7.2 Synthese des doppelt glycosylierten EPO 29-97 Thioesters **61**

Es folgte die Ligation des EPO 29-67 Thioesters **E2** (1 eq) mit dem EPO 68-97 Hydrazid **F3** (1.1 eq) in 8 M GdmCl bei pH 6.9. Nach 3 d wurde reduziert und per RP-HPLC gereinigt. Die Nebenprodukte wurden abgetrennt und das EPO 29-97 Glycopeptidhydrazid **60** in einer Ausbeute von 68 % erhalten (Abbildung 92). Das Hydrazid **60** mit freier Lys-97-Seitenkette wurde zum Thioester **61** umgesetzt. Die Reaktion wurde im denaturierenden Phosphatpuffer durch NaNO₂ bei pH 3 und -18 °C durchgeführt und anschließend MMBA bei pH 6 zugesetzt. Eine kontrollierte Kühlung des Eppendorf-Gefäßes im ersten Reaktionsschritt wurde durch ein Kältebad mit Eis/NaCl gewährleistet. Unter diesen Bedingungen trat keine Caprolactambildung des Lysins auf. Neben der intensiven Kühlung war ein kontrolliertes Anheben des pH-Werts von 3 auf 6 ohne Übertitration wichtig. Die Reinigung erfolgte per RP-HPLC, wobei nicht alle Verunreinigungen entfernt werden konnten. Der EPO 29-97 Thioester **61** wurde in 49 % Ausbeute erhalten.

Synthese von dreifach glycosyliertem Erythropoietin nach der Acm-Strategie

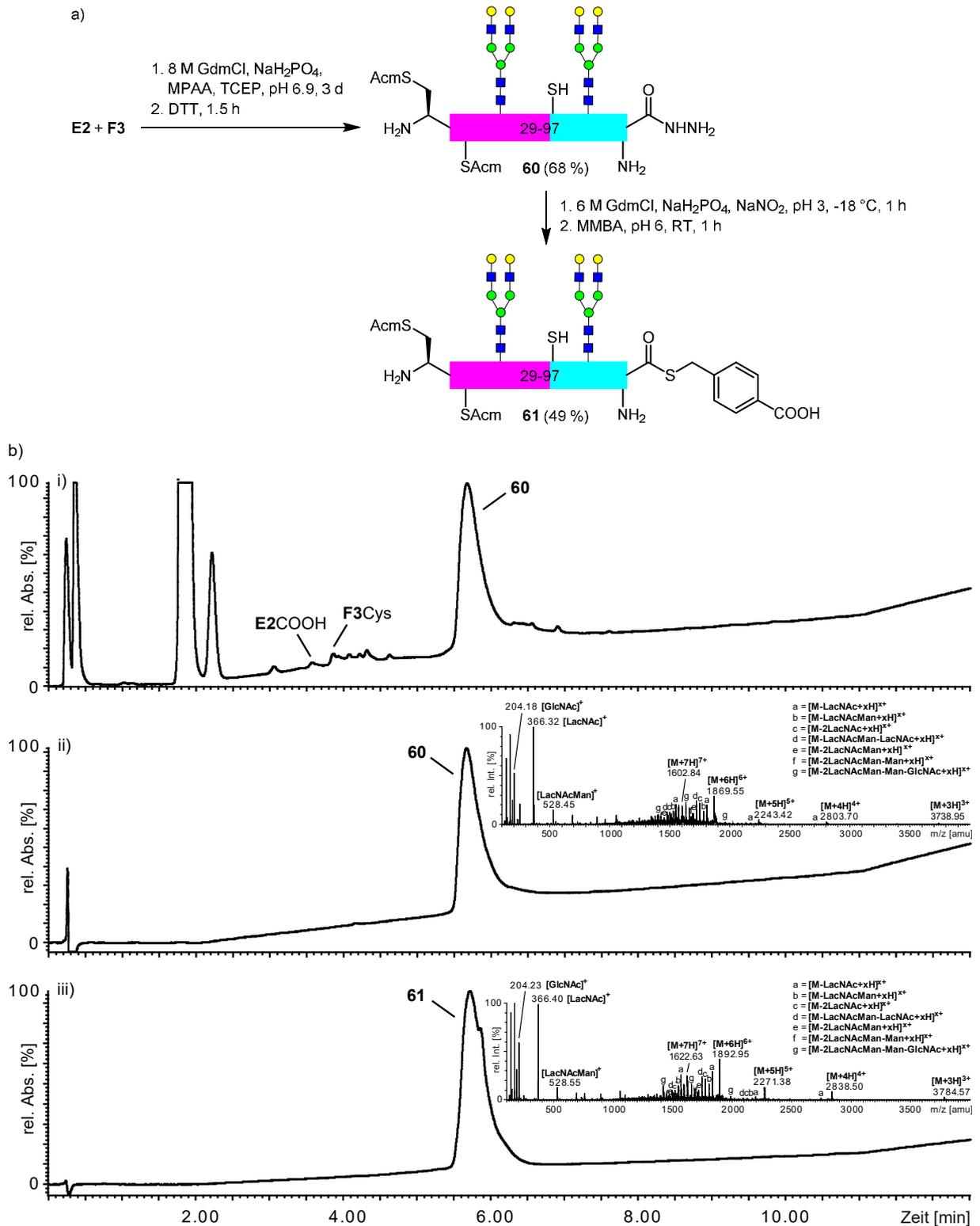


Abbildung 92: a) Synthese von EPO 29-97 Hydrazid **60** und Thioester **61** und b) i) RP-UHPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **60** und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem **60** und iii) von gereinigtem **61**.

7.3 Synthese von doppelt glycosyliertem EPO 29-166 (3xSH) 59

Die Ligation von **61** (1 eq) mit **53** (1.2 eq) fand in 8 M GdmCl statt (Abbildung 93). Der pH-Wert wurde auf 6.7 reduziert, um einer Cyclisierung des terminalen Lys-97 zum Caprolactam entgegenzuwirken.

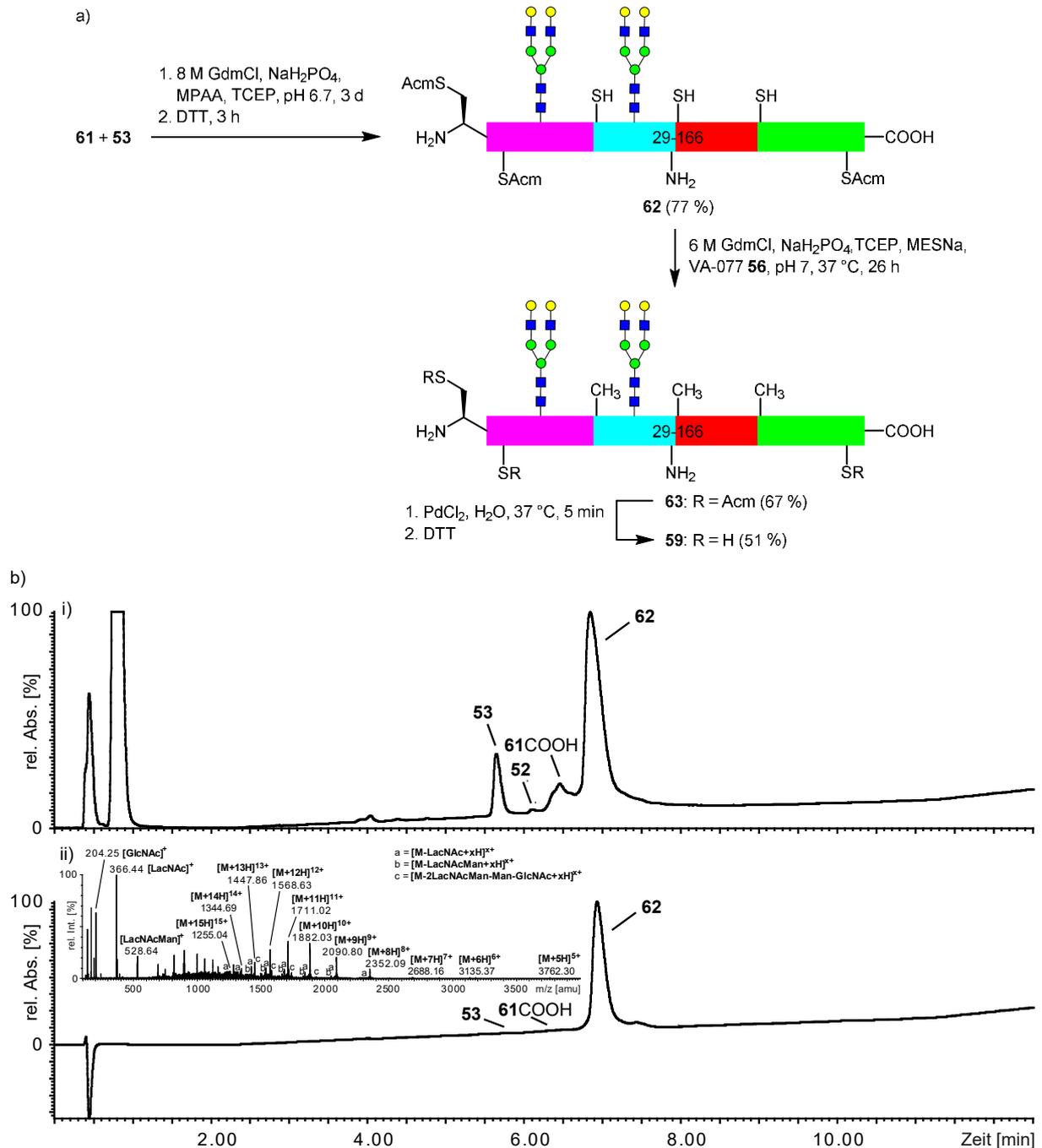


Abbildung 93: a) Synthese von EPO 29-166 (3xSAcm, 2xNona) **62**, Entschwefelung und Acm-Abspaltung und b) i) RP-UHPLC-Chromatogramm des Rohprodukts **62** und ii) RP-UHPLC-MS von gereinigtem **62**.

Unter diesen Bedingungen konnte kein ϵ -Caprolactam bei der Reaktion nachgewiesen werden. Nach 3 d wurde die Ligationsmischung per RP-HPLC gereinigt. EPO 29-166 **62** wurde in 77 % Ausbeute erhalten (Abbildung 93).

Am Ligationsprodukt **62** erfolgte eine Entschwefelung der nicht-nativen Cysteine-68, 98 und 128 bei pH 7 mit TCEP (0.9 M), MESNa (0.6 M) und VA-044 **56** (15 mM, 60 eq bezogen auf **62**). Die Reaktion wurde bei 37 °C stark geschüttelt und nach 24 h per RP-HPLC gereinigt. Die Analytik bei der Entschwefelung gestaltete sich schwierig, da Produkt **63** und Edukt **62** die gleiche Retentionszeit besaßen und lediglich anhand des Massenspektrums die Vollständigkeit der Reaktion überprüft werden konnte. Die Entschwefelung war vermutlich aufgrund von Zugabefehlern nicht vollständig, weshalb die Reaktion erneut mit den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde. Nach 2 h war **62** schließlich komplett entschwefelt und wurde nach 5 h per RP-HPLC gereinigt. EPO 29-166 **63** mit Ala-68, 98 und 128 wurde in einer Ausbeute von 67 % erhalten (Abbildung 94).

Die drei nativen Cysteine von EPO 29-166 **63** wurden anschließend mit 15 eq PdCl₂ in H₂O bei 37 °C entschützt. Die drei Acm-Schutzgruppen waren nach 5 min vollständig entfernt (Abbildung 93). Das Palladium wurde durch Zugabe von DTT deaktiviert und der Komplex durch starkes Zentrifugieren pelletiert. Die RP-HPLC-Reinigung des Rohprodukts **59** ergab EPO 29-166 (3xSH) **59** in 51 % Ausbeute (Abbildung 94).

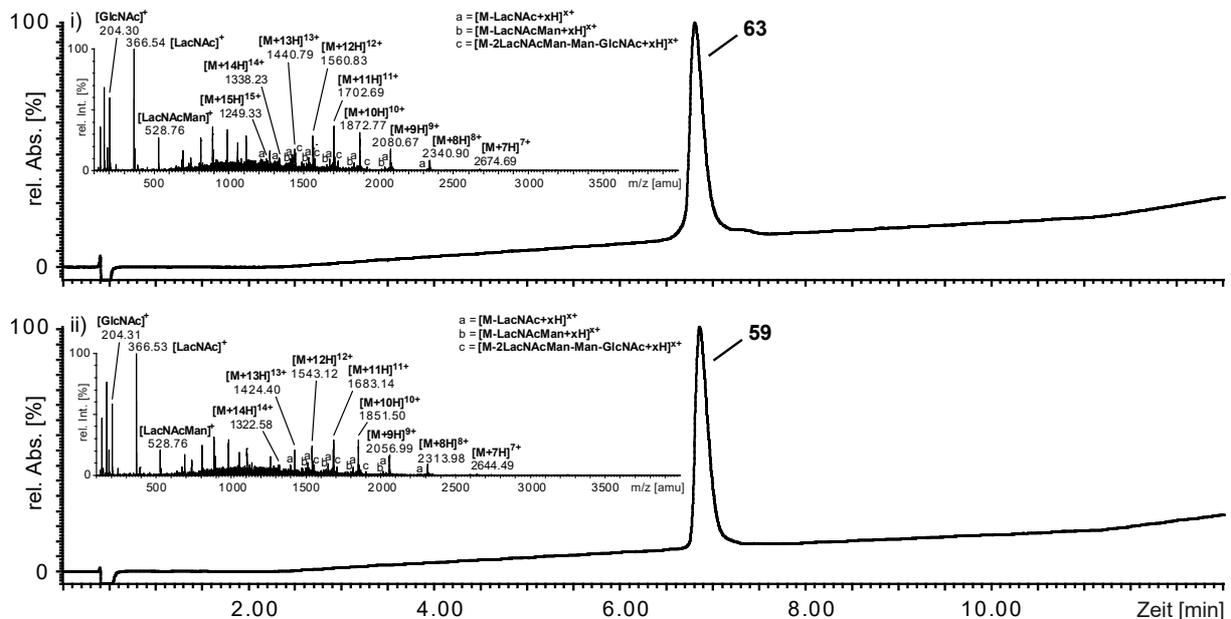


Abbildung 94: i) RP-UHPLC-MS von gereinigtem EPO 29-166 (3xSAcM) **63** und ii) von gereinigtem EPO 29-166 (3xSH) **59**.

7.4 Ligation und Rückfaltung zu EPO (3xNona) D

Die finale Ligation des EPO 1-28 Glycopeptidthioesters **B2** (1.6 eq) mit dem doppelt glycosylierten EPO 29-166 **59** (1 eq) zum Volllängenglycoprotein **D^{red}** erfolgte in 8 M GdmCl bei pH 6.9 (Abbildung 95). Im RP-UHPLC-Chromatogramm waren nach 3 d sowohl Produkt **D^{red}**, überschüssiger Thioester **B2** sowie freie Säure **B2COOH**, Thiolacton **B2Thiolacton** und EPO 29-166 **59** zu sehen. Es wurden weitere 1.6 eq **B2** zugegeben und die Reaktion nach 24 h kontrolliert, was jedoch keinen verbesserten Umsatz zeigte (Abbildung 96).

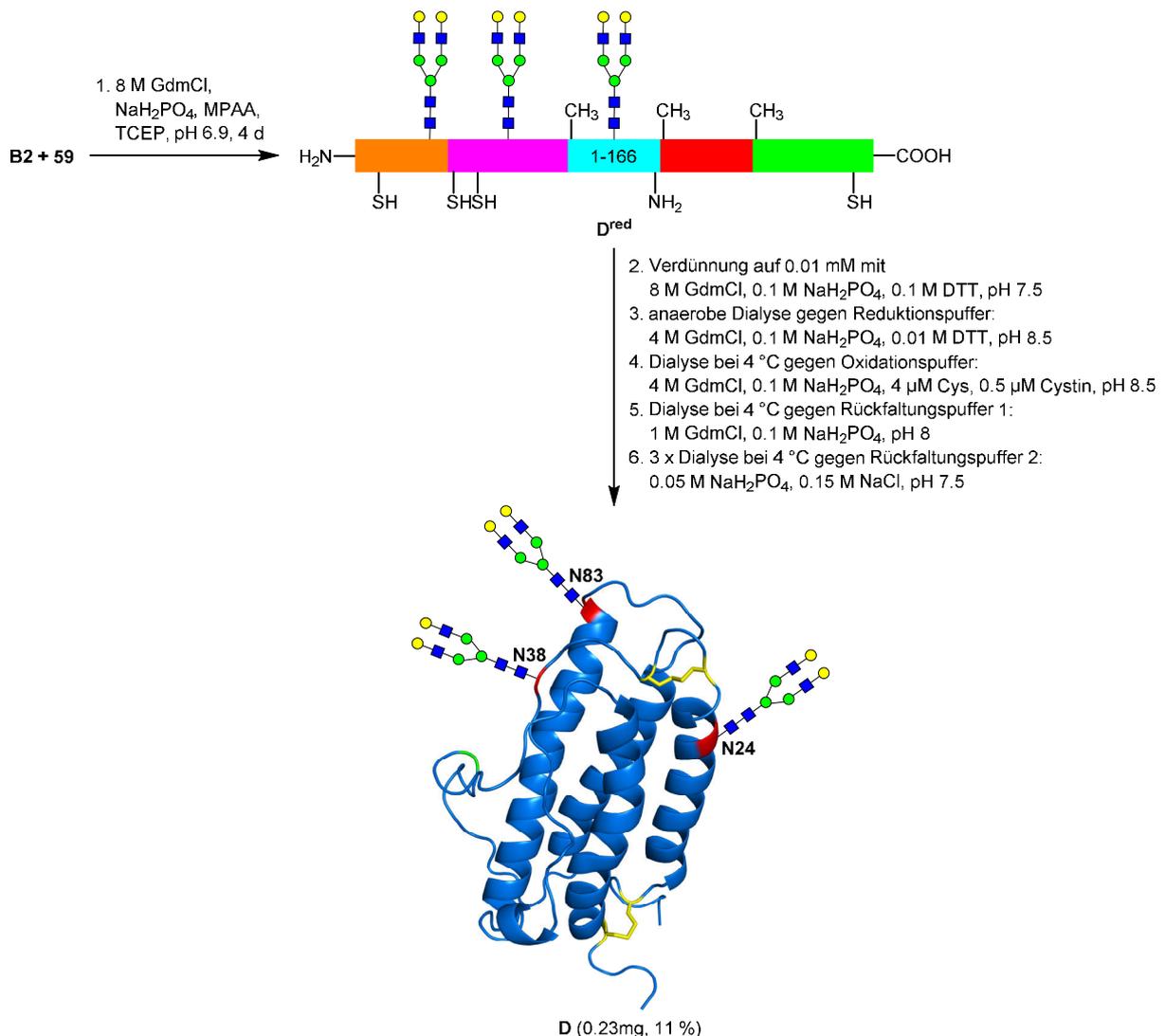


Abbildung 95: Synthese von EPO (3xNona) **D** mit nach der Acm-Strategie synthetisiertem **59**.

Daher wurde die Ligationmischung direkt zurückgefaltet. Nach Verdünnen der Mischung wurden die Cysteine reduziert und anschließend mithilfe eines Cystein-Cystin-Shuffles oxidiert. Die Faltung wurde durch graduelle Dialyse induziert (Abbildung 95). Es wurde auch

hier auf den Faltungshelfer Arginin verzichtet. Bei der Gelfiltration (Superdex 75) des Rohprodukts konnten die Oligomere **D**^{Oligo} und oligo-**59**^{Oligo} und monomeres EPO 29-166 (2xNona) **59**, sowie das Dimer der EPO 1-28 (Nona) Säure **B2**COOH-Dimer abgetrennt werden (Abbildung 96).

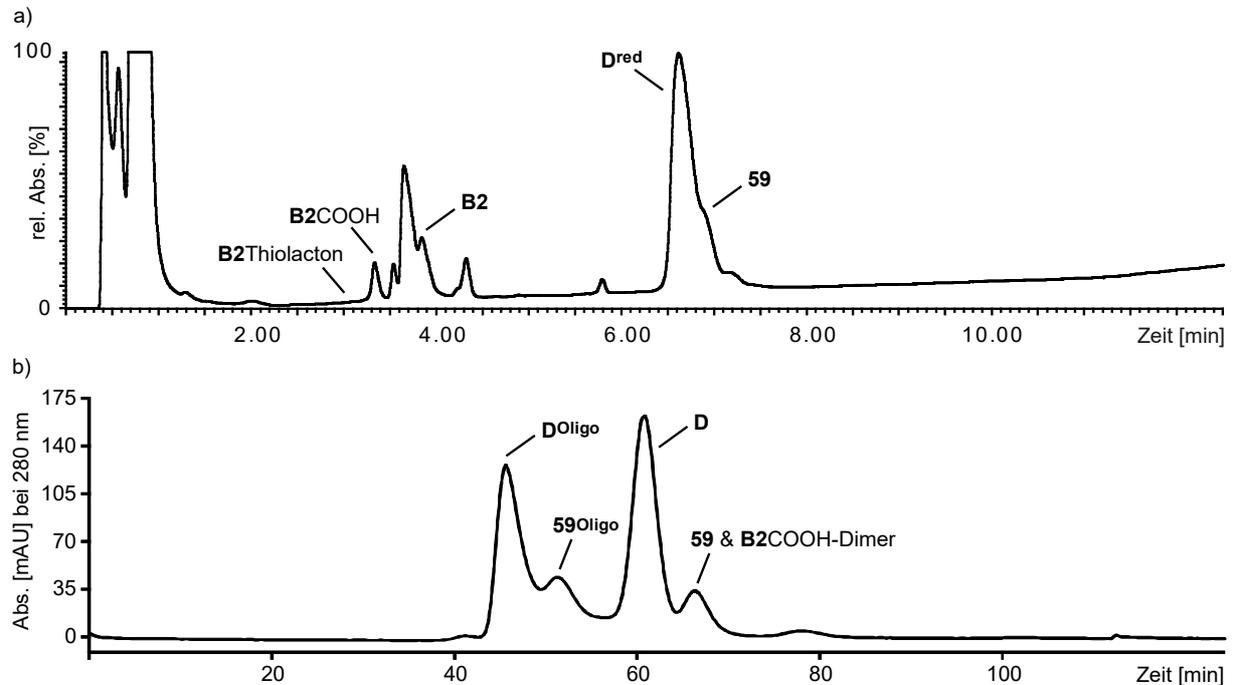


Abbildung 96: a) RP-UHPLC-Chromatogramm der NCL zu **D**^{red} nach 4 d und b) UV-Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 75) des Rohprodukts **D**.

Zur Entsalzung und Entfernung restlicher Verunreinigungen fand eine RP-HPLC-Reinigung statt, wonach EPO (3xNona) **D** in guter Reinheit und einer Ausbeute von 11 % bezogen auf **59** erhalten wurde. Auch hier könnte der hohe Überschuss an EPO 1-28 (Nona) Thioester **B2** (insgesamt 3.2 eq) die Rückfaltung negativ beeinflussen und so die Ausbeute reduzieren. Für die Gelfiltration wurde der Rückfaltungspuffer 2 (0.05 M NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl) als Laufmittel verwendet. Um auszuschließen, dass der niedrige Salzgehalt zu einer untypischen Peakverteilung führte und sich möglicherweise noch Produkt **D** in den weiteren Peaks verbarg, wurden die Gelfiltrationsfraktionen, die kein **D** enthielten, nochmals mit 0.5 M Arg im Laufmittel gelfiltriert. Es zeigte sich, dass die Gelfiltration ohne Arg zu einer besseren Auftrennung der Peaks führte (Daten nicht gezeigt). Die Reinheit von EPO (3xNona) **D** und die korrekte Masse wurden durch RP-UHPLC-MS und HR-MS bestätigt. Auch das SDS-Gel zeigte **D** und anhand des CD-Spektrums wurde korrekt gefaltetes Glycoprotein **D** nachgewiesen (Abbildung 97). Die Synthese von dreifach *N*-glycosyliertem EPO **D** nach der

Acm-Strategie konnte gezeigt werden und sollte auch die zukünftige Darstellung weiterer Glycoformen von EPO ermöglichen.

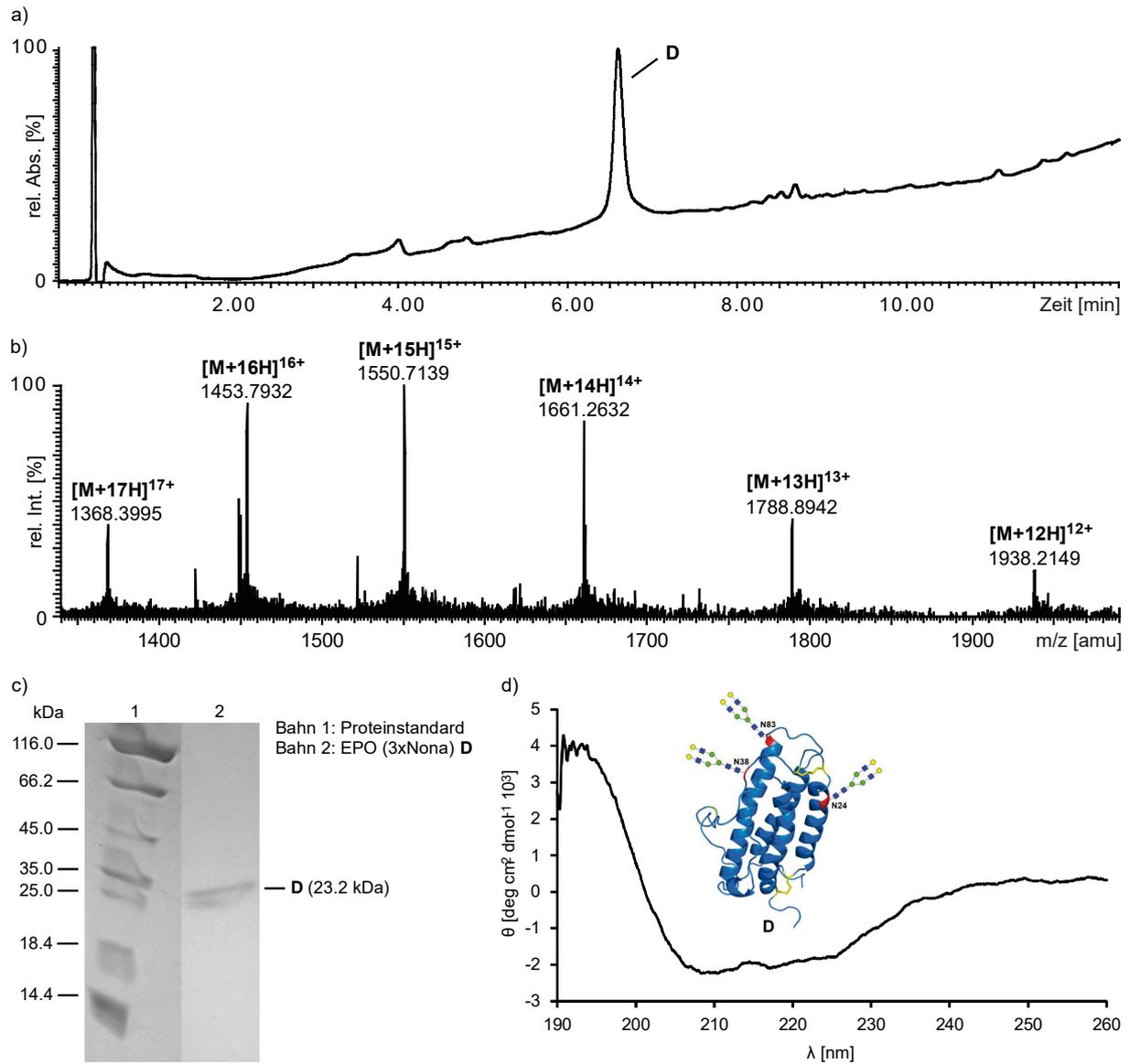
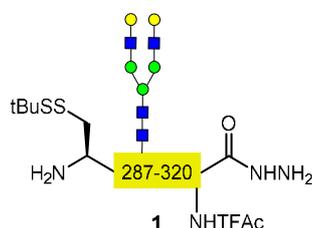


Abbildung 97: a) RP-UHPLC-Chromatogramm, b) HR-MS-Spektrum, c) SDS-PAGE (nicht reduzierend) und d) CD-Spektrum von gereinigtem EPO (3xNona) D.

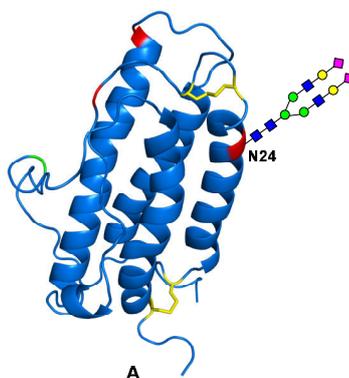
8 Zusammenfassung

Glycoproteine spielen eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Prozessen.^[13] Da natürlich vorkommende Glycoproteine stets eine Mikroheterogenität aufweisen, aber zur Erforschung von Struktur-Wirkungsbeziehungen homogene Glycoformen vonnöten sind, müssen letztere durch chemische und enzymatische Synthese dargestellt werden.^[20,24]

Das Immunoglobulin G1 weist in der Fc-Region ein *N*-Glycan auf.^[171] Das Fc 287-320 Glycopeptidhydrazid **1** wurde durch Fmoc-SPPS und Pseudoprolin-vermittelte *Lansbury*-Aspartylisierung dargestellt. Zur Vermeidung einer Cyclisierung des C-terminalen Lysins wurde eine TFAc-Schutzgruppe eingesetzt, deren Eignung für Ligationen bestätigt wurde.

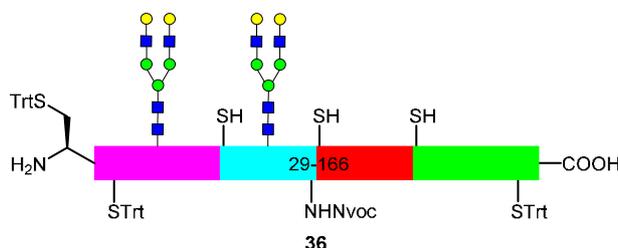


Erythropoietin regelt durch Stimulation der Erythropoese die Sauerstoffhomöostase im menschlichen Körper.^[125] Humanes Erythropoietin besitzt drei *N*-Glycane, deren Struktur die *in vivo*-Aktivität maßgeblich beeinflusst.^[12,152] Um monoglycosyliertes EPO **A** durch Semisynthese zu gewinnen, wurde das EPO 1-28 (Nona) Hydrazid **23** durch konvergente Glycopeptidsynthese dargestellt und der Zucker enzymatisch sialyliert. Nach Thioveresterung und anschließender NCL mit dem rekombinanten EPO 29-166 Peptidfragment **C** lieferte die oxidative Rückfaltung EPO (Undeca) **A** mit einem α -2,6-sialylierten komplexen *N*-Glycan an Asn-24 in 33 % Ausbeute.



Die Totalsynthesestrategie für dreifach glycosyliertes EPO **D** sah die sequentielle NCL der fünf Fragmente **B2-H2** mit Entschwefelung von drei Cysteinen vor. Hierfür wurden verschiedene Schutzgruppenstrategien untersucht.

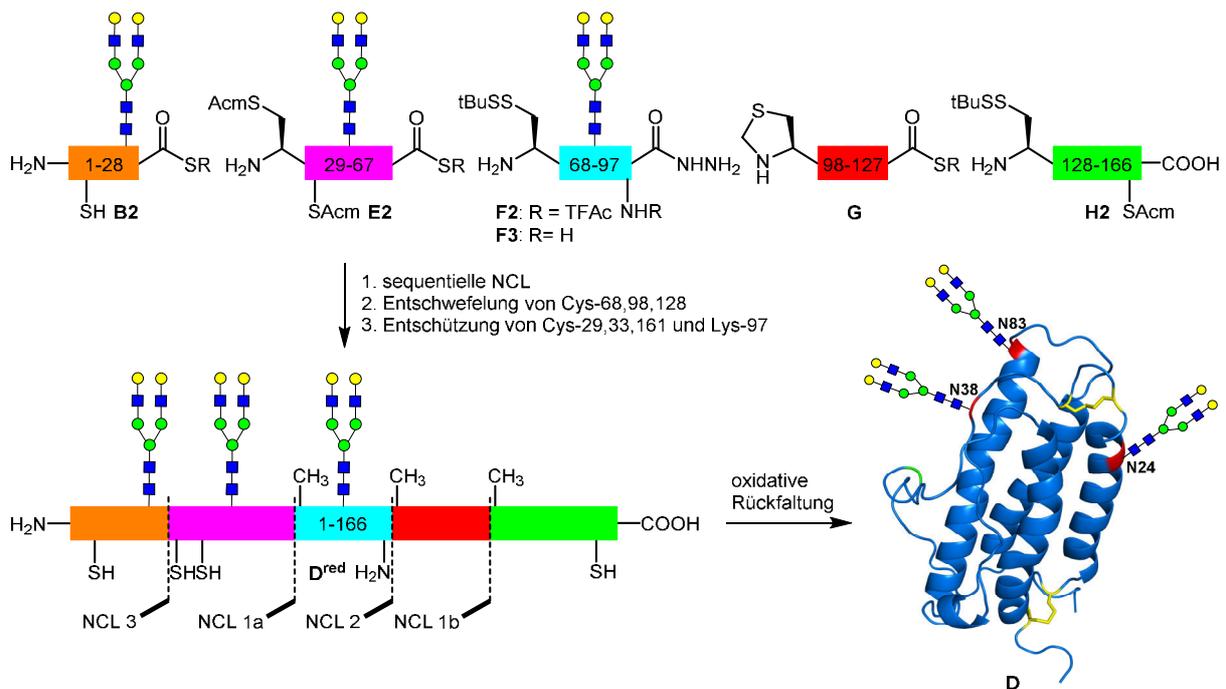
Bei der Trt/Nvoc-Strategie erfolgte der Schutz der nativen Cysteine-29, 33 und 161 durch eine säurelabile Tritylgruppe, die an den entschützten Peptiden nachträglich eingeführt wurde. Das C-terminale Lys-97 wurde durch eine Nvoc-Gruppe in der Seitenkette geschützt. Das EPO 29-67 (2xSTrt, Nona) Hydrazid **29** ergab aufgrund der hydrophoben Tritylschutzgruppen niedrige Ausbeuten bei der Retritylierung. Die Synthese des Peptidfragments EPO 98-166 (STrt) **33** erfolgte durch NCL. Das schwer lösliche doppelt glycosylierte EPO 29-97 (2xSTrt, Nvoc) Hydrazid **34** wurde nach Thioveresterung mit **33** verknüpft, wobei die Tritylgruppen die Isolierung von EPO 29-166 (3xSTrt, 2xNona, Nvoc) **36** erschwerten.



Aufgrund der Schwierigkeiten wurde die AcM/TFac-Strategie zur Darstellung von EPO mit drei komplexen *N*-Glycanen **D** angewandt. Das Glycopeptidhydrazid EPO 29-67 **40** wurde mit einer AcM-Schutzgruppe an Cys-29 und 33 synthetisiert. Die Labilität der AcM-Gruppe bei der palladiumkatalysierten Entschützung der Glycosylierungsstelle wurde durch die Verwendung einer PhiPr-Schutzgruppe umgangen. EPO 68-97 (Nona) **F2** wurde mit einem TFac-geschützten Lys-97 dargestellt. Die α -2,6-Sialylierung der biantennären *N*-Glycane an den Glycopeptidhydraziden **40** und **F2** gelang. Nach Umsetzung von **40** zum Thioester **E2** erfolgte die Ligation mit **F2** zum doppelt glycosylierten EPO 29-97 (2xSAcM, TFac) **47** und dessen Thioveresterung. An dem Peptid EPO 98-166 (Thz, SPhacm) **51** wurde die Entfernung beider Cys-Schutzgruppen mit PdCl₂ getestet. Hierbei wurde eine höhere Labilität von Phacm im Vergleich zu Thz festgestellt. An dem Ligationsprodukt EPO 29-166 (3xSAcM, 2xNona, TFac) **55** wurden die nicht-nativen Cysteine-68, 98 und 128 zu nativen Alaninen entschweifelt. Die Abspaltung der AcM-Gruppen an den drei verbliebenen Cysteinen mit PdCl₂ ergab EPO 29-166 (3xSH, 2xNona, TFac) **58**. Die basische Entfernung der TFac-Gruppe tendiert zu Nebenreaktionen, gelang jedoch schließlich an **58**. Der EPO 1-28 (Nona) Thioester **B2** und EPO 29-166 (3xSH, 2xNona)

59 wurden zum Volllängenglycoprotein **D^{red}** ligiert und zu EPO (3xNona) **D** oxidativ rückgefaltet.

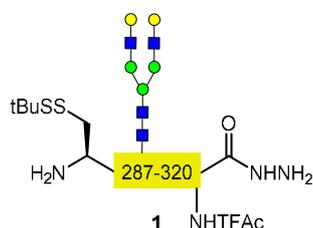
Da die Abspaltung der TFAc-Schutzgruppe mit zahlreichen Problemen verbunden war, wurde die Synthese von dreifach glycosyliertem EPO **D** nach der AcM-Strategie weiterverfolgt. Es wurde zunächst die TFAc-Gruppe an Lys-97 des EPO 68-97 (TFAc) Glycopeptidhydrazids **F2** entfernt, was sich an dieser Stelle als unproblematisch erwies. Durch Thioveresterung und sequentielle NCL wurde EPO 29-166 (3xSAcm, 2xNona) **62** erhalten. Eine ϵ -Caprolactambildung an Lys-97 trat nicht auf. Nach Entschwefelung und Abspaltung der AcM-Gruppen führten die NCL mit dem EPO 1-28 (Nona) Thioester **B2** und die folgende oxidative Rückfaltung zu dem gewünschten dreifach *N*-glycosylierten EPO **D**. Die Ausbeute betrug 11 %. Mit der AcM-Strategie wurde somit eine gangbare Vorgehensweise zur Totalsynthese von homogenem dreifach *N*-glycosylierten EPO etabliert.



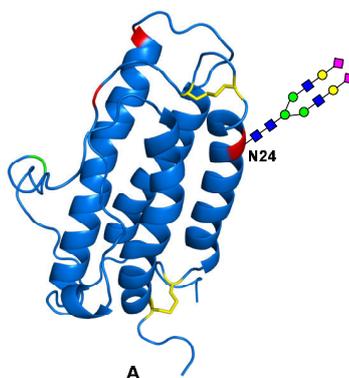
9 Summary

Glycoproteins play an important role at many biological processes.^[13] Since naturally occurring glycoproteins always exhibit microheterogeneity, but for structure-activity relationship studies homogeneous glycoforms are necessary, they need to be assembled by chemical and enzymatic synthesis.^[20,24]

Immunoglobulin G1 possesses one *N*-glycan in the Fc region.^[171] The Fc 287-320 glycopeptide hydrazide **1** was assembled by Fmoc-SPPS and pseudoproline-assisted *Lansbury* aspartylation. A TFAc protective group was used to prevent cyclization of the C-terminal lysine and its applicability for ligations was confirmed.

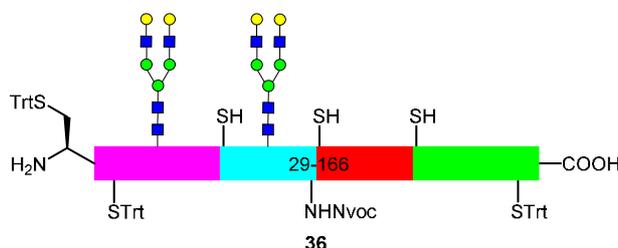


Erythropoietin regulates the oxygen homeostasis in the human body by stimulation of erythropoiesis.^[125] Human erythropoietin possesses three *N*-glycans whose structure influences the *in vivo* activity significantly.^[12,152] To obtain monoglycosylated EPO **A** through semisynthesis the EPO 1-28 (nona) hydrazide **23** was assembled by convergent glycopeptide synthesis and the sugar was sialylated enzymatically. After thioesterification and following ligation with the recombinant EPO 29-166 peptide fragment **C** oxidative refolding provided EPO (undeca) **A** with an α -2,6-sialylated complex *N*-glycan at Asn-24 in 33 % yield.



The total synthesis strategy for triglycosylated EPO **D** envisaged the sequential NCL of the five fragments **B2-H2** with desulfurization of three cysteines. Different protective group strategies were investigated.

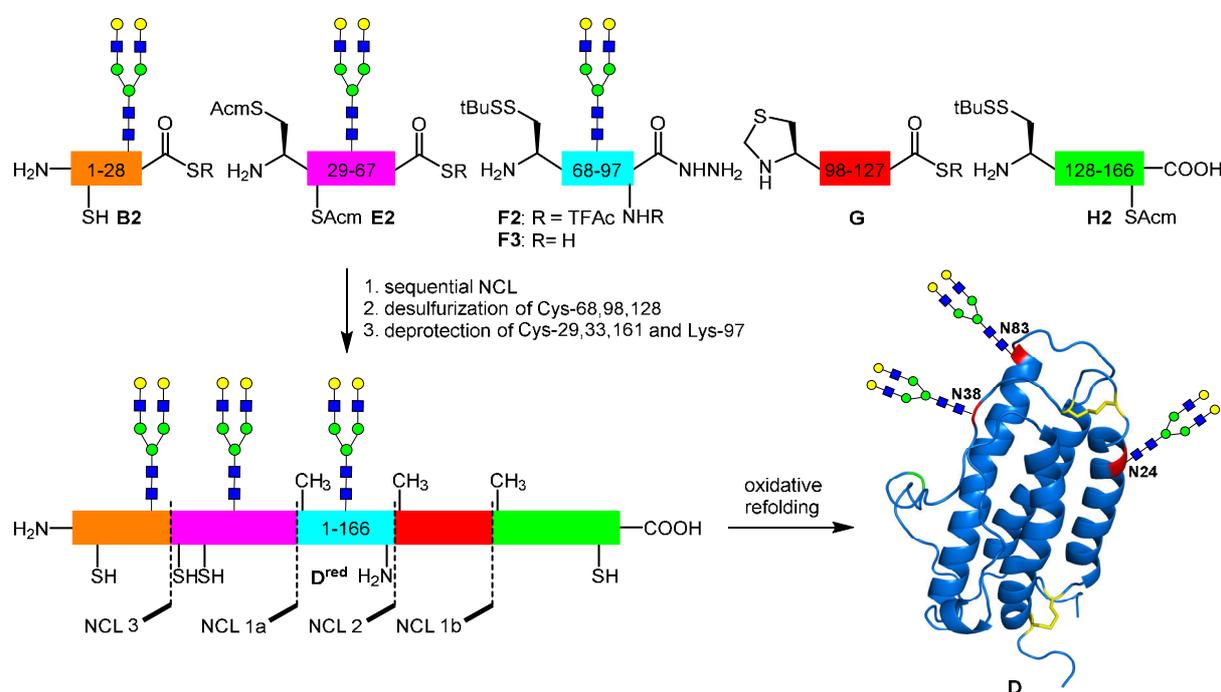
Within the Trt/Nvoc strategy protection of the native cysteines-29, 33 and 161 was maintained by an acid labile trityl group, which was introduced afterwards at the deprotected peptides. The C-terminal Lys-97 was protected by a Nvoc group in the side chain. EPO 29-67 (2xSTrt, nona) hydrazide **29** gave low yields at retritilation due to the hydrophobic trityl protective groups. The synthesis of the peptide fragment EPO 98-166 (STrt) **33** was carried out by NCL. The poorly soluble biglycosylated EPO 29-97 (2xSTrt, Nvoc) hydrazide **34** was connected to **33** after thioesterification, however, the trityl groups hampered the isolation of EPO 29-166 (3xSTrt, 2xNona, Nvoc) **36**.



Due to the difficulties the AcM/TFAc strategy was applied for assembling EPO with three complex *N*-glycans **D**. The glycopeptide hydrazide EPO 29-67 **40** was synthesized with an AcM protective group at Cys-29 and 33. The lability of the AcM group at palladium catalyzed deprotection of the glycosylation site was circumvented by use of a PhiPr protective group. EPO 68-97 (nona) **F2** was assembled with a TFAc protected Lys-97. The α -2,6-sialylation of the biantennary *N*-glycans at the glycopeptide hydrazides **40** and **F2** was successful. After conversion of **40** into the thioester **E2** ligation with **F2** to biglycosylated EPO 29-97 (2xSAcM, TFAc) **47** and its thioesterification was carried out. At the peptide EPO 98-166 (Thz, SPhacm) **51** removal of both Cys protective groups with PdCl₂ was tested. Here a higher lability of Phacm compared to Thz was observed. At the ligation product EPO 29-166 (3xSAcM, 2xnona, TFAc) **55** the non-native cysteines-68, 98 and 128 were desulfurized to native alanines. Removal of the AcM groups of the three remaining cysteines by PdCl₂ resulted in EPO 29-166 (3xSH, 2xnona, TFAc) **58**. Basic removal of the TFAc group tended to side reactions, but finally succeeded at **58**. The EPO 1-28 (nona) thioester **B2** and EPO 29-166 (3xSH, 2xnona) **59** were ligated to the full length glycoprotein **D**^{red} and oxidatively refolded to EPO (3xnona) **D**.

Summary

Because of numerous problems removing the TFAc protective group the synthesis of triglycosylated EPO **D** was pursued according to the Acm strategy. First of all the TFAc group at Lys-97 of the EPO 68-97 (TFAc) glycopeptide hydrazide **F2** was removed, which proved to be non-problematic at this step. By thioesterification and sequential NCL EPO 29-166 (3xSAcm, 2xnona) **62** was obtained. An ϵ -caprolactam formation at Lys-97 did not occur. After desulfurization and removal of the Acm groups NCL with the EPO 1-28 (nona) thioester **B2** and following oxidative refolding lead to the desired tri-*N*-glycosylated EPO **D**. The yield accounted for 11 %. Thus, with the Acm strategy a viable procedure for the total synthesis of homogeneous tri-*N*-glycosylated EPO was established.



10 Experimenteller Teil

10.1 Allgemeines

Geräte, Materialien und Chemikalien

Technische Lösungsmittel wurden vor der Verwendung durch Destillation gereinigt. Lösungsmittel von p. a.-Qualität wurden über ausgeglühtem Molekularsieb 4 Å gelagert. Die Absolutierung von DCM erfolgte mit Phosphorpentoxid und von MeOH mit Magnesium. Als Schutzgas kam Argon 5.0 zum Einsatz. Das verwendete Wasser war doppelt destilliert und über eine Millipore-Anlage filtriert. Acetonitril war von HPLC-Qualität. Die Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel sind als Volumenanteile (V:V) angegeben.

Für die quantitative UV-Bestimmung des Beladungsgrades eines Harzes wurde das Spektralphotometer Specord 2000 (Analytik Jena) eingesetzt.

Dünnschichtchromatographische Analysen erfolgten auf „Alugram Sil G/UV254“-Kieselgelplatten (0.2 mm Schichtdicke) der Firma Macherey-Nagel. Die Detektion fand durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder durch Eintauchen in eine Reagenzlösung und Erhitzen im Heißluftstrom statt. Die Reagenzlösung zur Detektion von Verbindungen mit Kohlenhydraten bestand aus 0.25 mL Resorcinmonomethylether in 250 mL Ethanol und 6.6 mL konzentrierter Schwefelsäure. Die Reinigung per Flash-Chromatographie wurde an einer Reveleris® iES Flash Chromatography-Anlage der Firma GRACE mit ELS-Detektion und UV-Absorptionsmessung bei 254 und 280 nm durchgeführt. Es wurden Reveleris® Silica 40 µm-Kartuschen verwendet.

Für die LC-MS-Analytik wurde ein LCT ESI-TOF-Massenspektrometer mit HPLC-Kupplung verwendet. Dazu wurden eine Agilent HP 1100 Anlage mit Photodiodendetektor von 200 bis 300 nm oder ein Waters ACQUITY UPLC H-Class System mit Photodiodenarray-Detektor eingesetzt. Die LC-Trennung erfolgte über die RP-Säulen YMC Hydrosphere C18 (120 Å, S-3 µm, 50 x 2.1 mm) (A I), YMC-Pack Pro C8 (120 Å, S-3 µm 50 x 2.1 mm) (A II), YMC-Ultra HT Hydrosphere C18 (120 Å, S-2 µm, 30 x 2.0 mm) (B I), YMC-Triart C8 (120 Å, S-1.9 µm, 30 x 2.0 mm) (B II), Fortis BIO C4 (300 Å, S-1.7 µm, 30 x 2.1 mm) (B III) und Supelco Discovery® BIO Wide Pore C5 (300 Å, S-5 µm, 50 x 2.1 mm) (B IV). Als Lösungsmittelsystem diente H₂O + 0.1 % HCOOH (Eluent A) und MeCN + 0.1 % HCOOH (Eluent B). Die Aufnahme hochauflösender Massenspektren erfolgte an einem Thermo Fisher Scientific Q Exactive™ Orbitrap Massenspektrometer.

Präparative Trennungen per RP-HPLC oder Gelpermeationschromatographie mit H₂O/MeCN + 0.1 % TFA oder H₂O/MeCN + 0.1 % HCOOH erfolgten an einer Pharmacia Äkta Basic

HPLC-Anlage mit einer Pharmacia Biotech P-900 Gradientenpumpe und einem Pharmacia Biotech UV-900 Detektor. Die UV-Absorption wurde bei 214, 254 und 280 nm detektiert. Die Gelpermeationschromatographie mit Puffer fand an einer Äkta-Purifier-Anlage statt.

Arbeiten unter Inertgasatmosphäre wurden in einer anaeroben Glovebox (Modell A) von COY Laboratory Products Inc. (Michigan, USA) unter Formiergas (95 % N₂, 5 % H₂) durchgeführt.

Bei der Rückfaltung kamen ZelluTrans/Roth V Series Dialyseschläuche (MWCO: 5 kDa) zum Einsatz. Ultrafiltrationen erfolgten in Thermo Fisher Scientific Pierce™ Protein Concentrators (20 mL, MWCO: 20 kDa) bei 4 °C und 4000 g in einer Thermo Fisher Scientific Heraeus™ Multifuge™ X-3 FR Zentrifuge oder in einer Ultrafiltrationszelle Amicon® 8010 der Firma Merck unter Verwendung einer Membran mit einem MWCO von 10 kDa.

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden 4-20 %-ige Tris/Glycin-Gradientengele (Anamed) eingesetzt. Es wurden 10 µg Protein in 15 µL Laufpuffer und 5 µL Probenpuffer Roti®-Load 3 (Lithiumdodecylsulfat) gelöst, 10 min bei 95 °C inkubiert und aufgetragen. Der Laufpuffer bestand aus 29 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS und wurde mit H₂O auf 1 L aufgefüllt. Die elektrophoretische Trennung fand bei 150 V über 90 min statt. Als Fixierlösung diente eine 20 %-ige Trichloressigsäurelösung und als Färbelösung Page Blue™ Protein Staining Solution. Zur Entfärbung wurde eine 4 %-ige NaCl-Lösung verwendet.

Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte mit einer Proteinkonzentration von 10 oder 24 µM in 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.5 in einer Hellma 165-QS Küvette (1.0 mm, 200 µL) an einem J-600 Spektropolarimeter (Jasco, Deutschland). Die Normierung der Spektren auf die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure [θ] erfolgte anhand von Gleichung 1 durch den Quotienten aus der gemessenen Elliptizität θ und dem Produkt aus der Schichtdicke der Küvette d, der Proteinkonzentration c und der Anzahl der Aminosäuren im Protein N_{AS}.^[215]

$$[\theta] \left[\frac{\text{deg cm}^2}{\text{dmol}} \right] = \frac{\theta[\text{mdeg}]}{d[\text{mm}] \cdot c[\text{M}] \cdot N_{AS}} \quad (1)$$

Das Trityl-ChemMatrix-Harz wurde von PCAS BioMatrix Inc. (Saint-Jean-sur-Richelieu, Kanada) erworben. Alle eingesetzten Reagenzien und Lösungsmittel wurden von Acros (Geel, Belgien), Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland), Bachem (Bubendorf, Schweiz), Carbolution (St. Ingbert, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Iris Biotech (Marktredwitz, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) oder TCI (Eschborn, Deutschland) bezogen.

Als Festphasenreaktoren wurden 20 mL-Polypropylenspritzen mit PE-Fritten (25 μm) von MultiSynTech GmbH (Witten, Deutschland) verwendet.

Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Alle Reaktionen finden bei RT statt, soweit nicht anders vermerkt. Die Festphasenpeptidsynthese erfolgt nach automatisiertem Standard-Fmoc-Protokoll am Tribute® Peptide Synthesizer der Firma Gyros Protein Technologies Inc. (Tucson, USA). Die Reaktionen finden in 45 mL-Reaktionsgefäßen unter Stickstoffatmosphäre und Schütteln statt. Am Anfang wird ein Quellschritt des Harzes in DMF für 3 x 5 min vorgenommen. Die Fmoc-Abspaltung erfolgt durch 20 % Piperidin/DMF. Die Vollständigkeit der Reaktion wird durch das IntelliSynth™ UV-Monitoring und Feedback Control System durch Absorptionsmessung bei 301 nm überprüft und die Dauer und Anzahl der einzelnen Entschützungs-schritte festgelegt und gegebenenfalls erhöht. Mit Ausnahme von nicht-cyclischen Cysteinderivaten wird für die Kupplungen der geschützten Aminosäuren eine äquimolare Menge an Aktivierungsreagenz und die doppelte Menge an DIPEA (0.4 M in DMF) eingesetzt. Nach der Fmoc-Entfernung oder Kupplung wird das Harz 6 x für je 30 s mit DMF und am Ende der Synthese zusätzlich 5 x mit DCM gewaschen.

Kupplungen von Cystein als symmetrisches Anhydrid

Bei nicht-cyclischen Cysteinderivaten erfolgt die Kupplung manuell als symmetrisches Anhydrid. Bei 0 °C werden 10 eq geschütztes Cystein in DMF/DCM gelöst und 10 min gerührt. Es werden 5 eq DIC zugegeben. Nach 20 min wird die Lösung filtriert und im Vakuum eingengt. Die Lösung mit dem gebildeten Anhydrid wird zum Harz gegeben und für 3 bis 4 h geschüttelt. Nach der Kupplung wird die Lösung entfernt und das Harz 6 x mit DMF gewaschen. Bei terminalen Cysteinen wird zusätzlich 5 x mit DCM gewaschen.

Bestimmung des Beladungsgrades des Harzes

Für die Fmoc-Bestimmung werden ca. 1 mg des Harzes mit 1.5 mL 20 % Piperidin/DMF versetzt und 15 min geschüttelt. Das Harz wird abzentrifugiert und die Absorption der 1:1-Verdünnung aus Überstand und 20 % Piperidin/DMF bei 290 nm gegen die Referenz (20 % Piperidin/DMF) gemessen. Der Beladungsgrad des Harzes B_H wird mithilfe von Gleichung 2 aus dem Quotienten des Absorptionswertes A_{290} (Differenz der Absorption der Probe und der Referenz) und der eingesetzten Menge an Harz m_{Harz} unter Annahme eines Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 5253 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt.

$$B_H \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{A_{290}}{m_{\text{Harz}} [\text{mg}] \cdot 1.75} \quad (2)$$

Die Berechnung des theoretischen Beladungsgrades $B_H(\text{theo})$ erfolgt anhand von Gleichung 3 mit dem zuletzt bestimmten Beladungsgrad B_H^0 und der Differenz aus dem Molekulargewicht der gekuppelten Aminosäure oder des Peptids M und dem Molekulargewicht der bei der Kupplung eliminierten Komponente X .

$$B_H(\text{theo}) \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{B_H^0 \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] \cdot 10^3}{10^3 + B_H^0 \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] \cdot (M \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] - X \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right])} \quad (3)$$

Analytische Entschützung

Für LC-MS-Analysen wird eine Testentschützung der geschützten Peptidylharze oder Peptide durchgeführt. Zu ca. 0.5 mg des Harzes bzw. 0.2 mg des geschützten Peptids werden 100 μL TFA/TES/ H_2O (96:2:2) gegeben und 1 h geschüttelt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt, der Rückstand in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ HCOOH gelöst und per LC-MS analysiert.

10.2 Versuche zu Kapitel 3

Boc-Cys(StBu)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Pro-Arg(Pbf)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OPhiPr)-Ser(tBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Val-Val-Ser(tBu)-Val-Leu-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Val-Leu-His(Trt)-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Trp(Boc)-Leu-Asn(Trt)-Gly-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Lys(TFAc)-Trt-Aminomethyl-ChemMatrix-Harz 3 (Fc 287-320 (OPhiPr, TFAc)-Trt-CM 3)

Im Glasreaktor werden 331.0 mg ($B_H = 0.42$ mmol/g, 0.14 mmol, 1 eq) Trt-CM-Harz **2** unter Argonatmosphäre in 6.3 mL DCM_{abs} 5 min vorgequollen. Es werden 700 μL AcBr zugegeben und die Mischung 3 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen der Lösung wird das Harz 8 x mit je 8 mL DCM_{abs} gewaschen und mit 2 mL DCM_{abs} versetzt. Unter Argon wird eine Lösung aus 322.8 mg (0.70 mmol, 5 eq) Fmoc-Lys(TFAc)-OH und 239.7 μL (1.40 mmol, 10 eq) DIPEA in 2 mL DCM_{abs} hinzugefügt und die Suspension 17.5 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz in eine 20 mL-Spritze überführt und 3 x mit DCM, 3 x je 2 min mit je 3.3 mL $\text{DCM}/\text{MeOH}/\text{DIPEA}$ (17:2:1) und 5 x mit DCM gewaschen. Der Beladungsgrad beträgt $B_H = 0.31$ mmol/g (89 %). Die Peptidelongation wird durch automatisierte Fmoc-SPPS durchgeführt. Für die Wasch- und Entschützungsschritte wird je ein Volumen von 3 mL verwendet. Die Kupplungen erfolgen mit 0.70 mmol (5 eq) Aminosäure, 289.6 mg

(0.70 mmol, 5 eq) HCTU und 3.5 mL (1.40 mmol, 10 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) für 45 min oder 0.42 mmol (3 eq) Aminosäure oder Pseudoprolindipeptid, 218.5 mg (0.42 mmol, 3 eq) PyBOP, 2.0 mL (0.80 mmol, 5.7 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) und 1.0 mL DMF für 1 h. Die Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Nach Kupplung von Lys-288 wird ein Beladungsgrad von $B_H = 0.10$ mmol/g bestimmt, was einer quantitativen Ausbeute (bezogen auf gekuppeltes Lys-320) entspricht. Cys-287 wird manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierfür werden 433.2 mg (1.40 mmol, 10 eq) Boc-Cys(StBu)-OH und 109.1 μ L (0.70 mmol, 5 eq) DIC in 24 mL DMF/DCM (1:3) eingesetzt und für 3.5 h gekuppelt. Nach der Festphasensynthese wird das Harz **3** in eine 20 mL-Spritze überführt und im Hochvakuum getrocknet.

Tabelle 1: Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese von Harz **3**.

Position	Aminosäure	m [mg]	Aktivierungsreagenz
Tyr-319	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	321.7	HCTU
Glu-318	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	297.8	HCTU
Lys-317	Fmoc-Lys(Boc)-OH	328.0	HCTU
Gly-316	Fmoc-Gly-OH	208.1	HCTU
Asn-315	Fmoc-Asn(Trt)-OH	417.9	HCTU
Leu-314	Fmoc-Leu-OH	247.4	HCTU
Trp-313	Fmoc-Trp(Boc)-OH	368.6	HCTU
Asp-312	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	288.0	HCTU
Gln-311	Fmoc-Gln(Trt)-OH	427.5	HCTU
His-310	Fmoc-His(Trt)-OH	433.8	HCTU
Leu-309	Fmoc-Leu-OH	247.4	HCTU
Val-308	Fmoc-Val-OH	237.6	HCTU
Leu-306, Thr-307	Fmoc-Leu-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	346.2	PyBOP
Val-305	Fmoc-Val-OH	237.6	HCTU
Ser-304	Fmoc-Ser(tBu)-OH	268.4	HCTU
Val-303	Fmoc-Val-OH	237.6	HCTU
Val-302	Fmoc-Val-OH	237.6	HCTU
Arg-301	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	454.1	HCTU
Tyr-300	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	321.7	HCTU
Ser-298, Thr-299	Fmoc-Ser(tBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	367.2	PyBOP

Experimenteller Teil

Asp-297	Fmoc-Asp(OPhiPr)-OH	331.5	PyBOP
Tyr-296	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	321.7	HCTU
Gln-295	Fmoc-Gln(Trt)-OH	427.5	HCTU
Glu-294	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	297.8	HCTU
Glu-293	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	297.8	HCTU
Arg-292	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	454.1	HCTU
Pro-291	Fmoc-Pro-OH	236.2	HCTU
Lys-290	Fmoc-Lys(Boc)-OH	328.0	HCTU
Thr-289	Fmoc-Thr(tBu)-OH	278.2	HCTU
Lys-288	Fmoc-Lys(Boc)-OH	328.0	HCTU
Cys-287	Boc-Cys(StBu)-OH ^[a]	433.2	DIC

^[a]manuelle Kupplung von 10 eq Cystein als symmetrisches Anhydrid

Es wird eine analytische Abspaltung und Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Peptid **3e** per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

H-Cys(StBu)-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asp-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys(TFAc)-OH 3e
(Fc 287-320 (TFAc), entschützt **3e**)

C₁₈₉H₂₉₃F₃N₅₀O₅₇S₂ (4298.83); ESI-MS: M_{ber} = 4296.10; M_{gef} = 717.98 (M+6H)⁶⁺, 860.99 (M+5H)⁵⁺, 1075.99 (M+4H)⁴⁺, 1434.63 (M+3H)³⁺, 2152.08 (M+2H)²⁺.

Boc-Cys(StBu)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Pro-Arg(Pbf)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OPhiPr)-Ser(tBu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Val-Val-Ser(tBu)-Val-Leu-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Val-Leu-His(Trt)-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Trp(Boc)-Leu-Asn(Trt)-Gly-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Lys(TFAc)-NHNHBoc 4
(Fc 287-320 (OPhiPr, TFAc) Boc-Hydrazid, geschützt **4**)

302.6 mg (B_H = 0.10 mmol/g, 30.26 μmol, 1 eq) Peptidylharz **3** werden 5 min in 5 mL DCM vorgequollen. Es werden 10 mL 20 % HFIP/DCM zugegeben und das Harz wird 30 min geschüttelt. Anschließend wird 5 x je 2 min mit je 8 mL 20 % HFIP/DCM gewaschen. Die Abspaltungs- und Waschlösungen werden in einem auf 0 °C gekühlten 500 mL-Kolben gesammelt und im Vakuum bei 5 °C eingengt. Zum Rückstand wird DCM gegeben und die Lösung erneut im Vakuum bei 5 °C eingengt. Dies wird 4 x wiederholt. Beim letzten Mal

wird die Lösung in einen 10 mL-Kolben überführt und nach Einengen der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Die Peptidylsäure wird in 1.3 mL DCM gelöst und bei 0 °C werden 23.4 mg (181.56 µmol, 6 eq) *tert*-Butylcarbazat, 20.5 mg (121.04 µmol, 4 eq) Cl-HOBt, 18.9 µL (121.04 µmol, 4 eq) DIC und 41.4 µL (242.08 µmol, 8 eq) DIPEA zugegeben (pH 9). Die Reaktionsmischung wird langsam unter Rühren auf RT erwärmt. Nach 18 h werden 300 mL DCM zugegeben und die organische Phase wird 3 x mit je 200 mL H₂O und 100 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt **4** per Flash-Chromatographie (Kartuschengröße: 12 g, 0 → 12 % MeOH/DCM, 40 min, 28 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **4** werden im Vakuum eingeeengt und aus 1,4-Dioxan lyophilisiert. Es wird eine analytische Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Hydrazid **4e** per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 180.1 mg (25.20 µmol, 83 %), weißer Feststoff, $R_f = 0.50$ (DCM/MeOH 10:1), C₃₇₆H₅₂₉F₃N₅₂O₇₄S₄ (7146.89).

H-Cys(StBu)-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asp-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys(TFAc)-NHNH₂ 4e
(Fc 287-320 (TFAc) Hydrazid, entschützt **4e**)

C₁₈₉H₂₉₅F₃N₅₂O₅₆S₂ (4312.86); ESI-MS: $M_{ber} = 4310.12$; $M_{gef} = 719.98$ (M+6H)⁶⁺, 863.43 (M+5H)⁵⁺, 1079.04 (M+4H)⁴⁺, 1438.70 (M+3H)³⁺, 2158.04 (M+2H)²⁺.

Boc-Cys(StBu)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Pro-Arg(Pbf)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Tyr(tBu)-Asp-Ser(tBu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Val-Val-Ser(tBu)-Val-Leu-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Val-Leu-His(Trt)-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Trp(Boc)-Leu-Asn(Trt)-Gly-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Lys(TFAc)-NHNHBoc 5
(Fc 287-320 (OH, TFAc) Boc-Hydrazid, geschützt **5**)

69.8 mg (9.77 µmol, 1 eq) Hydrazid **4** werden mit 21 mL 1 % TFA/DCM versetzt und für 30 min geschüttelt. Die Vollständigkeit des Umsatzes wird per DC (DCM/MeOH 10:1) kontrolliert. Es werden 400 mL DCM zugegeben und die organische Phase 3 x mit je 300 mL H₂O und 100 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt **5** aus 1,4-Dioxan lyophilisiert.

Ausbeute: 65.8 mg (9.36 µmol, 96 %), weißer Feststoff, $R_f = 0.44$ (DCM/MeOH 10:1),

C₃₆₇H₅₁₉F₃N₅₂O₇₄S₄ (7028.71).

O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-*O*-(2-desoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[*O*-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-(*O*-2-desoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-*O*-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-desoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-*O*-2-desoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosylamin **7**

(β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-[β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,6]-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-β-GlcNAc-NH₂ **7**) (Nona-NH₂ **7**)

5.0 mg (3.00 μmol, 1 eq) Nona-N₃ **6** werden unter Argonatmosphäre in 167 μL MeOH_{abs} gelöst und mit 10.8 μL (60.00 μmol, 20 eq) DIPEA, 36.1 μL (360.00 μmol, 120 eq) 1,3-Propandithiol sowie 167 μL MeOH_{abs} versetzt. Die Reaktion wird per DC (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1, 1 h 45 min) kontrolliert. Nach 3 h wird das Produkt **7** durch Zugabe von 14 mL eiskaltem Diethylether 20 min bei -24 °C ausgefällt und dann abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Diese Vorgehensweise wird zweimal wiederholt und das Glycosylamin **7** anschließend im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 4.9 mg (3.00 μmol, quant.), weißer Feststoff,

R_f = 0.14 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1), C₆₂H₁₀₅N₅O₄₅ (1640.51).

H-Cys(*StBu*)-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys(TFAc)-NHNH₂ **1**
(Fc 287-320 (Nona, TFAc) Hydrazid **1**)

Die Glycokupplung wird in 4 Teilreaktionen durchgeführt. Insgesamt 49.4 mg (7.03 μmol, 1 eq) Hydrazid **5** werden in 352 μL DMSO/DMF (1:1) gelöst und 12.0 μL (70.30 μmol, 10 eq) DIPEA, 6.7 mg (17.58 μmol, 2.5 eq) HATU und 2.4 mg (17.58 μmol, 2.5 eq) HOAt hinzugefügt und 5 min geschüttelt. 17.3 mg (10.55 μmol, 1.5 eq) frisch reduziertes Nona-NH₂ **7** werden zugegeben (pH 8) und 21 h bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wird das Gemisch mit 14 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum wird das Glycopeptid **1** durch Zugabe von 56 mL eiskaltem Diethylether 20 min bei -24 °C ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Nach Trocknung wird der Rückstand in 4 mL 20 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst. Die Reinigung des Rohprodukts **1**

erfolgt per RP-HPLC (Säule: YMC-Pack Pro C8 (250 x 20 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 49 min, 8 mL/min). Die Fraktionen mit dem Produkt **1** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 8.5 mg (1.43 μmol, 20 %), weißer Feststoff,

C₂₅₁H₃₉₈F₃N₅₇O₁₀₀S₂ (5935.36); ESI-MS: M_{ber} = 5931.72; M_{gef} = 999.00 (M+6H)⁶⁺, 1187.93 (M+5H)⁵⁺, 1484.84 (M+4H)⁴⁺, 1979.45 (M+3H)³⁺, 2968.95 (M+2H)²⁺.

*H-Cys(StBu)-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-NHNH₂ **8***
(Fc 287-320 (Nona) Hydrazid **8**)

Jeweils 0.2 mg (33.70 nmol, 1 eq) Glycopeptid **1** werden mit je 100 μL 0.5 M bzw. 1 M Piperidin/H₂O versetzt und 3 h geschüttelt. Anschließend wird die Lösung im Hochvakuum eingengt und das Rohprodukt **8** in je 1.5 mL 20 % MeCN/H₂O gelöst und lyophilisiert. Die Reaktion wird per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 0 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert. Vollständiger Umsatz ist nach 1 h erreicht.

C₂₄₉H₃₉₉N₅₇O₉₉S₂ (5839.35); ESI-MS: M_{ber} = 5835.74; M_{gef} = 973.68 (M+6H)⁶⁺, 1168.18 (M+5H)⁵⁺, 1460.23 (M+4H)⁴⁺, 1946.62 (M+3H)³⁺, 2919.35 (M+2H)²⁺.

*H-Cys(StBu)-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asp-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys(TFAc)-NHNH₂ **4e***
(Fc 287-320 (SStBu, TFAc) Hydrazid **4e**)

32.6 mg (4.64 μmol, 1 eq) Peptidhydrazid **5** werden mit 8 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) 2 h entschützt. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum erfolgt die Fällung mit 13 mL eiskaltem Diethylether für 20 min bei -24 °C. Der entstandene Feststoff wird abzentrifugiert und zweimal durch Wiederholung dieses Prozesses gewaschen. Der Überstand wird jeweils dekantiert. Nach Trocknung wird das Rohprodukt **4e** in 4 mL 40 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und per RP-HPLC (Säule: YMC-Pack Pro C8 (250 x 20 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 49 min, 8 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **4e** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 6.3 mg (1.46 μmol, 31 %), weißer Feststoff,

$C_{189}H_{295}F_3N_{52}O_{56}S_2$ (4312.86); ESI-MS: $M_{ber} = 4310.12$; $M_{gef} = 862.48$ ($M+5H$)⁵⁺, 1077.91 ($M+4H$)⁴⁺, 1437.04 ($M+3H$)³⁺, 2155.49 ($M+2H$)²⁺.

H-Cys-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asp-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys(TFAc)-NHNH₂ 9
(Fc 287-320 (SH, TFAc) Hydrazid **9**)

In einer anaeroben Glovebox werden 5.9 mg (1.37 μ mol, 1 eq) Hydrazid **4e** in 203 μ L Reduktionspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 25 mM TCEP, pH 6.9) gelöst. Nach Inkubation für 18 h 20 min wird mit 21.5 mg (75 μ mol, 0.4 M) TCEP nachaktiviert und weitere 3 h 40 min inkubiert. Nach Reaktionsende (22 h) wird die Mischung mit 797 μ L 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA versetzt und per Gelpermeationschromatographie (Säule: Superdex® Peptide 10/300 GL, 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 0.6 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit der Zielverbindung **9** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 \rightarrow 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 4.4 mg (1.04 μ mol, 76 %), weißer Feststoff,

$C_{185}H_{287}F_3N_{52}O_{56}S$ (4224.69); ESI-MS: $M_{ber} = 4222.09$; $M_{gef} = 845.80$ ($M+5H$)⁵⁺, 1057.05 ($M+4H$)⁴⁺, 1409.38 ($M+3H$)³⁺, 2113.62 ($M+2H$)²⁺.

H-Cys(Trt)-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asp-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys(TFAc)-NHNH₂ 10
(Fc 287-320 (STrt, TFAc) Hydrazid **10**)

Zu 4.4 mg (1.04 μ mol, 1 eq) Cys-Peptid **9** wird eine Lösung von 0.68 mg (2.60 μ mol, 2.5 eq) Triphenylmethanol in 104 μ L HFIP/AcOH (1:1) + 2 % TFA gegeben und die Mischung 2.5 h geschüttelt. Nach Reaktionsende wird das Gemisch im Hochvakuum eingengt. Das Rohprodukt **10** wird durch Zugabe von eiskaltem Diethylether 20 min bei -24 °C ausgefällt, danach abzentrifugiert und der Vorgang zweimal wiederholt. Der Überstand wird jeweils dekantiert. Nach Trocknung und Lösen in 1 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA erfolgt die Reinigung per RP-HPLC (Supelco Ascentis C18 (250 x 10 mm), 20 \rightarrow 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 50 min, 4 mL/min). Die Fraktion mit dem Produkt **10** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 \rightarrow 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.65 mg (0.15 μ mol, 14 %), weißer Feststoff,

$C_{204}H_{301}F_3N_{52}O_{56}S$ (4467.02); ESI-MS: $M_{ber} = 4464.20$; $M_{gef} = 1117.86$ ($M+4H$)⁴⁺, 1490.33

(M+3H)³⁺, 2234.86 (M+2H)²⁺.

H-Cys(Trt)-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asp-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys(TFAc)-SCH₂C₆H₄COOH
11

(Fc 287-320 (S_{Trt}, TFAc) MMBA **11**)

0.65 mg (0.15 μmol, 1 eq) Hydrazid **10** werden bei -24 °C in 46.9 μL Diazotierungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 3) gelöst. Nach 1 h werden 1.6 mg (9.30 μmol, 62 eq) MMBA hinzugefügt und der pH-Wert mit 13.95 μL (93 eq) 1 M NaOH auf pH 6 eingestellt. Nach 1 h bei RT werden 939 μL 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA zugegeben und das Rohprodukt **11** per Gelpermeationschromatographie (Säule: Superdex® Peptide 10/300 GL, 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 0.6 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **11** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.49 mg (0.11 μmol, 73 %), weißer Feststoff,

C₂₁₂H₃₀₅F₃N₅₀O₅₈S₂ (4603.18); ESI-MS: M_{ber} = 4600.18; M_{gef} = 1151.64 (M+4H)⁴⁺, 1535.27 (M+3H)³⁺, 2302.52 (M+2H)²⁺.

H-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Ala-Leu-Pro-Ala-Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Asp-Glu-Leu-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Pro-Gly-Lys-OH **13**

(Fc 321-447 **13**)

In einer anaeroben Glovebox werden 2.9 mg (0.20 μmol, 1 eq) Proteinfragment **13** mit 323 μL Entschützungspuffer (6 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.2 M MeONH₂, pH 3.4) versetzt und 22.5 h inkubiert. Anschließend werden 0.9 mg TCEP (Endkonzentration = 10 mM) zugegeben. Nach 30 min wird die Reaktionsmischung mit 677 μL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 20 → 40 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 29 min, 2 mL/min) gereinigt. Die Fraktion mit der Zielverbindung **13** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B III, 10 → 50 % B, 9 min,

0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 2.8 mg (0.20 μ mol, quant.), weißer Feststoff,

$C_{631}H_{986}N_{170}O_{194}S_4$ (14186.07); ESI-MS: $M_{ber} = 14177.14$; $M_{gef} = 835.80$ (M+17H)¹⁷⁺, 888.10 (M+16H)¹⁶⁺, 947.21 (M+15H)¹⁵⁺, 1014.72 (M+14H)¹⁴⁺, 1092.78 (M+13H)¹³⁺, 1183.66 (M+12H)¹²⁺, 1291.17 (M+11H)¹¹⁺, 1420.26 (M+10H)¹⁰⁺, 1577.85 (M+9H)⁹⁺, 1775.09 (M+8H)⁸⁺, 2028.32 (M+7H)⁷⁺, 2366.36 (M+6H)⁶⁺.

H-Cys(Trt)-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asp-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys(TFAc)-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Ala-Leu-Pro-Ala-Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Asp-Glu-Leu-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Pro-Gly-Lys-OH 14
(Fc 287-447 (S_{Trt}, TFAc) 14)

In einer anaeroben Glovebox werden 0.29 mg (63.00 nmol, 1 eq) Thioester **11** und 1.34 mg (94.50 nmol, 1.5 eq) Proteinfragment **13** in 23.7 μ L Ligationspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 15 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.9) gelöst. Nach 5 d werden 0.4 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) zugegeben. Nach 2 h wird die Reaktionsmischung mit 376 μ L 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 25 \rightarrow 40 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 19 min, 3 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **14** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B III, 20 \rightarrow 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.32 mg (17.18 nmol, 27 %), weißer Feststoff,

$C_{835}H_{1283}F_3N_{220}O_{250}S_5$ (18621.03); ESI-MS: $M_{ber} = 18609.30$; $M_{gef} = 1036.26$ (M+18H)¹⁸⁺, 1096.98 (M+17H)¹⁷⁺, 1165.57 (M+16H)¹⁶⁺, 1243.23 (M+15H)¹⁵⁺, 1332.02 (M+14H)¹⁴⁺, 1434.37 (M+13H)¹³⁺, 1553.78 (M+12H)¹²⁺, 1695.01 (M+11H)¹¹⁺, 1864.12 (M+10H)¹⁰⁺, 2071.13 (M+9H)⁹⁺, 2329.97 (M+8H)⁸⁺.

H-Cys(Trt)-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asp-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-

Ala-Leu-Pro-Ala-Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Asp-Glu-Leu-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Pro-Gly-Lys-OH 15

(Fc 287-447 (STrt) 15)

0.3 mg (16.11 nmol, 1 eq) Ligationsprodukt **14** werden mit 100 μ L 0.5 M Piperidin/H₂O versetzt (pH 13) und 3 h geschüttelt. Anschließend wird die Lösung im Hochvakuum eingengt und das Rohprodukt **15** in 1.5 mL 20 % MeCN/H₂O gelöst und lyophilisiert. Die Reaktion wird per RP-UHPLC-MS (Säule: B III, 20 \rightarrow 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert. Vollständiger Umsatz ist nach 1 h erreicht.

C₈₃₃H₁₂₈₄N₂₂₀O₂₄₉S₅ (18525.03); ESI-MS: M_{ber} = 18513.32; M_{gef} = 1088.91 (M+17H)¹⁷⁺, 1158.34 (M+16H)¹⁶⁺, 1235.63 (M+15H)¹⁵⁺, 1323.80 (M+14H)¹⁴⁺, 1425.59 (M+13H)¹³⁺, 1544.41 (M+12H)¹²⁺, 1684.38 (M+11H)¹¹⁺, 1852.73 (M+10H)¹⁰⁺, 2058.35 (M+9H)⁹⁺, 2315.76 (M+8H)⁸⁺.

10.3 Versuche zu Kapitel 4.1

Boc-Ala-Pro-Pro-Arg(Pbf)-Leu-Ile-Cys(Trt)-Asp(OtBu)-Ser($\psi^{Me,Me}pro$)-Arg(Pbf)-Val-Leu-Glu(OtBu)-Arg(Pbf)-Tyr(tBu)-Leu-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OAll)-Ile-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Thr(tBu)-Gly-Trt-Aminomethyl-ChemMatrix-Harz 16

(EPO 1-28 (OAll)-Trt-CM 16)

Im Glasreaktor werden 303.0 mg (B_H = 0.42 mmol/g, 0.13 mmol, 1 eq) Trt-CM-Harz **2** unter Argonatmosphäre mit 6.3 mL DCM_{abs} versetzt. Es werden 700 μ L AcBr zugegeben und die Mischung 3 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen der Lösung wird das Harz 8 x mit je 7 mL DCM_{abs} gewaschen und mit 2 mL DCM_{abs} versetzt. Unter Argon wird eine Lösung aus 193.2 mg (0.65 mmol, 5 eq) frisch aus 1,4-Dioxan lyophilisiertem Fmoc-Gly-OH und 222.5 μ L (1.30 mmol, 10 eq) DIPEA in 2 mL DCM_{abs} hinzugefügt und die Suspension 18 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz in eine 20 mL-Spritze überführt und 3 x mit DCM, 3 x je 2 min mit je 3.3 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) und 5 x mit DCM gewaschen. Der Beladungsgrad beträgt B_H = 0.36 mmol/g (95 %). Die Peptidelongation wird durch automatisierte Fmoc-SPPS durchgeführt. Für die Wasch- und Entschützungs-schritte wird je

ein Volumen von 3 mL verwendet. Die Kupplungen erfolgen mit 0.65 mmol (5 eq) Aminosäure, 268.9 mg (0.65 mmol, 5 eq) HCTU und 3.5 mL (1.40 mmol, 10.8 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) für 45 min oder 0.39 mmol (3 eq) Aminosäure oder Pseudoprolindipeptid, 202.9 mg (0.39 mmol, 3 eq) PyBOP, 2.0 mL (0.80 mmol, 6.2 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) und 1.0 mL DMF für 1 h. Cys-7 wird manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierfür werden 761.4 mg (1.30 mmol, 10 eq) Fmoc-Cys(Trt)-OH und 101.3 μ L (0.65 mmol, 5 eq) DIC in 24 mL DMF/DCM (1:3) eingesetzt und für 3.5 h gekuppelt. Die Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Nach Kupplung von Pro-2 wird ein Beladungsgrad von $B_H = 0.13$ mmol/g bestimmt (93 % bezogen auf gekuppeltes Gly-28). Nach der Festphasensynthese wird das Harz **16** in eine 20 mL-Spritze überführt und im Hochvakuum getrocknet.

Tabelle 2: Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese von Harz **16**.

Position	Aminosäure	m [mg]	Aktivierungsreagenz
Thr-27	Fmoc-Thr(tBu)-OH	258.4	HCTU
Ile-25, Thr-26	Fmoc-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	192.9	PyBOP
Asp-24	Fmoc-Asp(OAll)-OH	154.2	PyBOP
Glu-23	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	276.6	HCTU
Ala-22	Fmoc-Ala-OH	202.3	HCTU
Glu-21	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	276.6	HCTU
Lys-20	Fmoc-Lys(Boc)-OH	304.5	HCTU
Ala-19	Fmoc-Ala-OH	202.3	HCTU
Glu-18	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	276.6	HCTU
Leu-17	Fmoc-Leu-OH	229.7	HCTU
Leu-16	Fmoc-Leu-OH	229.7	HCTU
Tyr-15	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	298.7	HCTU
Arg-14	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	421.7	HCTU
Glu-13	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	276.6	HCTU
Leu-12	Fmoc-Leu-OH	229.7	HCTU
Val-11	Fmoc-Val-OH	220.6	HCTU
Arg-10	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	421.7	HCTU
Asp-8, Ser-9	Fmoc-Asp(OtBu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	209.9	PyBOP
Cys-7	Fmoc-Cys(Trt)-OH ^[a]	761.4	DIC

Experimenteller Teil

Ile-6	Fmoc-Ile-OH	229.7	HCTU
Leu-5	Fmoc-Leu-OH	229.7	HCTU
Arg-4	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	421.7	HCTU
Pro-3	Fmoc-Pro-OH	219.3	HCTU
Pro-2	Fmoc-Pro-OH	219.3	HCTU
Ala-1	Boc-Ala-OH	123.0	HCTU

^[a]manuelle Kupplung von 10 eq Cystein als symmetrisches Anhydrid

Es wird eine analytische Abspaltung und Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Peptid **16e** per RP-HPLC-MS (Säule: A I, 10 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

H-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asp(OAll)-Ile-Thr-Thr-Gly-OH 16e

(EPO 1-28 (OAll), entschützt 16e)

C₁₄₀H₂₃₂N₃₈O₄₅S (3199.68); ESI-MS: M_{ber} = 3197.68; M_{gef} = 640.92 (M+5H)⁵⁺, 800.56 (M+4H)⁴⁺, 1067.40 (M+3H)³⁺, 1600.79 (M+2H)²⁺.

Boc-Ala-Pro-Pro-Arg(Pbf)-Leu-Ile-Cys(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-Arg(Pbf)-Val-Leu-Glu(OtBu)-Arg(Pbf)-Tyr(tBu)-Leu-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OAll)-Ile-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Thr(tBu)-Gly-NHNHBoc 17

(EPO 1-28 (OAll) Boc-Hydrazid, geschützt 17)

316.2 mg (B_H = 0.13 mmol/g, 41.11 μmol, 1 eq) Peptidylharz **16** werden 5 min in 5 mL DCM vorgequollen. Es wird 10 x je 2 min mit je 10 mL 1.5 % TFA/2 % TES/DCM geschüttelt. Anschließend wird 6 x mit je 10 mL DCM gewaschen. Die Abspaltungs- und Waschlösungen werden in einem 250 mL-Kolben gesammelt, in dem 3.7 mL (21.38 mmol, 1.1 eq bezogen auf TFA) DIPEA vorgelegt sind (pH 6). Es werden noch 0.3 mL DIPEA hinzugefügt (pH 7). Die Lösung wird im Vakuum auf ca. 15 mL eingengt, in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt und auf 9.3 mL eingengt. Es werden 163.0 mg (1233.30 μmol, 30 eq) *tert*-Butylcarbazat, 139.4 mg (822.20 μmol, 20 eq) Cl-HOBt und 128.1 μL (822.20 μmol, 20 eq) DIC zugegeben (pH 9) und die Reaktionsmischung 4 d geschüttelt. Anschließend werden 250 mL DCM zugegeben und die organische Phase 3 x mit je 200 mL H₂O und 50 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt **17** per Flash-Chromatographie (Kartuschengröße: 2 x 12 g, 0 →

12 % MeOH/DCM, 40 min, 28 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **17** werden im Vakuum eingengt und aus 1,4-Dioxan lyophilisiert. Es wird eine analytische Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Hydrazid **17e** per RP-HPLC-MS (Säule: A I, 20 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 113.4 mg (22.74 μmol, 55 %), weißer Feststoff, $R_f = 0.43$ (DCM/MeOH 10:1), C₂₄₇H₃₈₄N₄₀O₅₉S₄ (4986.25).

H-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asp(OAll)-Ile-Thr-Thr-Gly-NHNH₂ 17e

(EPO 1-28 (OAll) Hydrazid, entschützt 17e)

C₁₄₀H₂₃₄N₄₀O₄₄S (3213.71); ESI-MS: $M_{ber} = 3211.70$; $M_{gef} = 643.65$ (M+5H)⁵⁺, 804.06 (M+4H)⁴⁺, 1072.08 (M+3H)³⁺, 1608.18 (M+2H)²⁺.

Boc-Ala-Pro-Pro-Arg(Pbf)-Leu-Ile-Cys(Trt)-Asp(OtBu)-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-Arg(Pbf)-Val-Leu-Glu(OtBu)-Arg(Pbf)-Tyr(tBu)-Leu-Leu-Glu(OtBu)-Ala-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Asp-Ile-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Thr(tBu)-Gly-NHNHBoc 19

(EPO 1-28 (OH) Boc-Hydrazid, geschützt 19)

Im Glaskolben mit Schraubverschluss werden zu 161.9 mg (32.47 μmol, 1 eq) Hydrazid **17** 24.4 mg (B = 0.4 mmol/g, 9.74 μmol, 0.3 eq) PdEnCat® und 18.7 mg (58.45 μmol, 1.8 eq) DCHT **18** gegeben und unter Argonatmosphäre mit 1.1 mL 10 % MeOH_{abs}/DCM_{abs} versetzt. Es werden 59.9 μL (487.05 μmol, 15 eq) PhSiH₃ hinzugefügt. Nach 17 h (DC: DCM/MeOH 10:1) werden die Katalysatorkügelchen abfiltriert und mit insgesamt 40 mL DCM und 20 mL 10 % MeOH/DCM gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt **19** per Flash-Chromatographie (Kartuschengröße: 12 g, 0 → 25 % MeOH/DCM, 35 min, 25 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt **19** werden im Vakuum eingengt und aus 1,4-Dioxan lyophilisiert. Es wird eine analytische Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Hydrazid **19e** per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 134.9 mg (27.27 μmol, 84 %), weißer Feststoff, $R_f = 0.39$ (DCM/MeOH 10:1), C₂₄₄H₃₈₀N₄₀O₅₉S₄ (4946.19).

H-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-

Glu-Ala-Glu-Asp-Ile-Thr-Thr-Gly-NHNH₂ 19e

(EPO 1-28 (OH) Hydrazid, entschützt 19e)

C₁₃₇H₂₃₀N₄₀O₄₄S (3173.64); ESI-MS: M_{ber} = 3171.67; M_{gef} = 793.73 (M+4H)⁴⁺, 1057.99 (M+3H)³⁺, 1586.99 (M+2H)²⁺.

H-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn(GlcNAc)-Ile-Thr-Thr-Gly-NHNH₂ 22

(EPO 1-28 (GlcNAc) Hydrazid 22)

a) Aktivierung mit HATU/HOAt

3.2 mg (0.65 µmol, 1 eq) Hydrazid **19** werden in 54.3 µL DMSO/DMF (1:1) gelöst und 0.28 µL (1.63 µmol, 2.5 eq) DIPEA, 0.62 mg (1.63 µmol, 2.5 eq) HATU und 0.22 mg (1.63 µmol, 2.5 eq) HOAt hinzugefügt. Es werden 0.36 mg (1.63 µmol, 2.5 eq) GlcNAc-NH₂ **21** zugegeben (pH 8). Nach 3 d wird das Reaktionsgemisch mit 1 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) versetzt und 2 h geschüttelt. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum wird das Glycopeptid **22** durch Zugabe von 14 mL eiskaltem Diethylether 20 min bei -24 °C ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Nach Trocknung wird das Rohprodukt **22** in 1 mL 20 % MeCN/H₂O gelöst und per RP-HPLC (Supelco Ascentis C18 (250 x 10 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 50 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt **22** werden lyophilisiert und per RP-HPLC-MS (Säule: A II, 10 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.84 mg (0.25 µmol, 38 %), weißer Feststoff,

C₁₄₅H₂₄₄N₄₂O₄₈S (3375.85); ESI-MS: M_{ber} = 3373.77; M_{gef} = 675.89 (M+5H)⁵⁺, 844.63 (M+4H)⁴⁺, 1126.16 (M+3H)³⁺, 1688.74 (M+2H)²⁺.

b) Aktivierung mit PyAOP

3.2 mg (0.65 µmol, 1 eq) Hydrazid **19** werden in 54.3 µL DMSO/DMF (1:1) gelöst und 0.28 µL (1.63 µmol, 2.5 eq) DIPEA und 0.85 mg (1.63 µmol, 2.5 eq) PyAOP hinzugefügt. Es werden 0.36 mg (1.63 µmol, 2.5 eq) GlcNAc-NH₂ **21** zugegeben (pH 8). Nach 2 d wird das Reaktionsgemisch mit 1 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) versetzt und 2 h geschüttelt. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum wird das Glycopeptid **22** durch Zugabe von 14 mL eiskaltem Diethylether 20 min bei -24 °C ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Dieser

Vorgang wird zweimal wiederholt. Der Überstand wird dekantiert. Nach Trocknung wird das Rohprodukt **22** in 1 mL 20 % MeCN/H₂O gelöst und per RP-HPLC (Supelco Ascentis C18 (250 x 10 mm), 10 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 50 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt **22** werden lyophilisiert und per RP-HPLC-MS (Säule: A II, 10 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.77 mg (0.23 μmol, 35 %), weißer Feststoff,

C₁₄₅H₂₄₄N₄₂O₄₈S (3375.85); ESI-MS: M_{ber} = 3373.77; M_{gef} = 676.17 (M+5H)⁵⁺, 844.67 (M+4H)⁴⁺, 1126.20 (M+3H)³⁺, 1688.98 (M+2H)²⁺.

c) Aktivierung mit DMTMM 20

2.0 mg (0.40 μmol, 1 eq) Hydrazid **19** werden in 33.3 μL DMSO/DMF (1:1) gelöst und mit 0.17 μL (1.00 μmol, 2.5 eq) DIPEA versetzt. Die Lösung wird auf -24 °C gekühlt und 0.28 mg (1.00 μmol, 2.5 eq) gekühltes DMTMM **20** hinzugefügt. Es werden 0.22 mg (1.00 μmol, 2.5 eq) gekühltes GlcNAc-NH₂ **21** zugegeben (pH 8) und 1 d bei -24 °C sowie 4 d bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 1 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) versetzt und 2 h geschüttelt. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum wird das Glycopeptid **22** durch Zugabe von 14 mL eiskaltem Diethylether 20 min bei -24 °C ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Nach Trocknung wird das Rohprodukt **22** in 1 mL 20 % MeCN/H₂O gelöst und per RP-HPLC (Supelco Ascentis C18 (250 x 10 mm), 10 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 50 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt **22** werden lyophilisiert und per RP-HPLC-MS (Säule: A II, 10 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.43 mg (0.13 μmol, 33 %), weißer Feststoff,

C₁₄₅H₂₄₄N₄₂O₄₈S (3375.85); ESI-MS: M_{ber} = 3373.77; M_{gef} = 676.02 (M+5H)⁵⁺, 844.79 (M+4H)⁴⁺, 1126.35 (M+3H)³⁺, 1689.10 (M+2H)²⁺.

*H-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Thr-Gly-NHNH₂ 23
(EPO 1-28 (Nona) Hydrazid 23)*

Die Glycokupplung wird in 2 Teilreaktionen durchgeführt. Insgesamt 39.4 mg (7.97 μmol, 1 eq) Hydrazid **19** werden in 398 μL DMSO/DMF (1:1) gelöst und 13.6 μL (79.70 μmol,

10 eq) DIPEA, 7.6 mg (19.93 μmol , 2.5 eq) HATU und 2.7 mg (19.93 μmol , 2.5 eq) HOAt hinzugefügt. 19.6 mg (11.95 μmol , 1.5 eq) frisch reduziertes Nona-NH₂ **7** werden zugegeben (pH 8) und das Gemisch wird bei 25 °C 3 d geschüttelt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 20 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum wird das Glycopeptid **23** durch Zugabe von 28 mL eiskaltem Diethylether 20 min bei -24 °C ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Nach Trocknung wird der Rückstand in 4 mL 20 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst. Die Reinigung des Rohprodukts **23** erfolgt per RP-HPLC (Säule: YMC-Pack Pro C8 (250 x 20 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 49 min, 8 mL/min). Die Fraktion mit dem Produkt **23** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 7.9 mg (1.65 μmol , 21 %), weißer Feststoff,

C₁₉₉H₃₃₃N₄₅O₈₈S (4796.14); ESI-MS: M_{ber} = 4793.27; M_{gef} = 1199.85 (M+4H)⁴⁺, 1598.93 (M+3H)³⁺, 2398.36 (M+2H)²⁺.

*H-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Thr-Gly-SCH₂C₆H₄COOH **B2***

*(EPO 1-28 (Nona) MMBA **B2**)*

3.9 mg (0.81 μmol , 1 eq) Glycopeptidhydrazid **23** werden bei -24 °C in 253.1 μL Diazotierungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 3) gelöst. Nach 1 h werden 8.4 mg (50.22 μmol , 62 eq) MMBA hinzugefügt und der pH-Wert mit 75.33 μL (93 eq) 1 M NaOH auf pH 6 eingestellt. Nach 1 h bei RT werden 1171 μL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA zugegeben und das Rohprodukt **B2** per Gelpermeationschromatographie (Säule: Superdex® Peptide 10/300 GL, 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 0.6 mL/min) gereinigt. Nach Gefriertrocknung wird der Thioester **B2** in 1 mL 20 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und 2 x per RP-HPLC (Säule: YMC Hydrosphere C18 (150 x 10 mm), 20 → 40 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 29 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **B2** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 2.5 mg (0.51 μmol , 63 %), weißer Feststoff,

C₂₀₇H₃₃₇N₄₃O₉₀S₂ (4932.30); ESI-MS: M_{ber} = 4929.26; M_{gef} = 1234.10 (M+4H)⁴⁺, 1645.04

(M+3H)³⁺, 2467.39 (M+2H)²⁺.

H-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn[(Neu5Ac)₂(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Thr-Gly-NHNH₂ 24

(EPO 1-28 (Undeca) Hydrazid 24)

0.86 mg (0.18 μmol, 1 eq) Glycopeptid **23** werden in 30 μL Tris-HCl-Puffer (200 mM, pH 9) gelöst. Es werden 0.36 mg (0.54 μmol, 3 eq) CMP-Neu5Ac, 4.5 μL alkalische Phosphatase (0.1 U/μL) und 10.5 μL ST6 (*Photobacterium damsela*, 2.3 mU/μL) zugegeben (Enkonzentration an **23** = 4 mM) und bei 30 °C geschüttelt. Es wird 3 x nach je 15 min mit je 3 eq CMP-Neu5Ac nachaktiviert. Die Reaktion wird per RP-UHPLC-MS analysiert (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) und zeigt nach 1 h vollständigen Umsatz. Nach 1 h 45 min werden 0.7 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) hinzugefügt und die Reaktion 30 min geschüttelt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 955 μL 20 % MeCN/H₂O verdünnt und per Gelpermeationschromatographie (Säule: Superdex® Peptide 10/300 GL, 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH, 0.6 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **24** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.75 mg (0.14 μmol, 78 %), weißer Feststoff,

C₂₂₁H₃₆₇N₄₇O₁₀₄S (5378.65); ESI-MS: M_{ber} = 5375.46; M_{gef} = 1345.10 (M+4H)⁴⁺, 1792.92 (M+3H)³⁺, 2690.48 (M+2H)²⁺.

H-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn[(Neu5Ac)₂(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Thr-Gly-SCH₂C₆H₄COOH B1

(EPO 1-28 (Undeca) MMBA B1)

1.5 mg (0.28 μmol, 1 eq) Glycopeptidhydrazid **24** werden bei -24 °C in 87.5 μL Diazotierungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 3) gelöst. Nach 1 h werden 2.9 mg (17.36 μmol, 62 eq) MMBA hinzugefügt und der pH-Wert mit 26.04 μL (93 eq) 1 M NaOH auf pH 6 eingestellt. Nach 1 h bei RT werden 886 μL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH zugegeben und das Rohprodukt **B1** per Gelpermeationschromatographie (Säule: Superdex® Peptide 10/300 GL, 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH, 0.6 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **B1** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I,

10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.90 mg (162.95 nmol, 58 %), weißer Feststoff,

C₂₂₉H₃₇₁N₄₅O₁₀₆S₂ (5514.82); ESI-MS: M_{ber} = 5511.45; M_{gef} = 1379.61 (M+4H)⁴⁺, 1839.12 (M+3H)³⁺, 2758.05 (M+2H)²⁺.

10.4 Versuche zu Kapitel 4.2

H-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn[(Neu5Ac)₂(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Thr-Gly-Cys-Ala-Glu-His-Cys-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Met-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH A
(EPO (Undeca) A)

Ligation zu EPO 1-166 (Undeca) A^{red}

In einer anaeroben Glovebox werden 0.90 mg (162.95 nmol, 1.1 eq) Glycopeptidthioester **B1** und 2.26 mg (148.14 nmol, 1 eq) Proteinfragment **C** in 59.26 µL Ligationpuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 15 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.9) gelöst (Endkonzentration an C = 2.5 mM). Die Inkubation erfolgt für 4 d.

Rückfaltung und Oxidation zu EPO (Undeca) A

Alle verwendeten Puffer werden nach Filtration eingesetzt. Nach 4 d wird die Reaktionsmischung in der Glovebox mit 14.75 mL Verdünnungspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.5 M Arg, 0.1 M DTT, pH 7.5) auf 0.01 mM (bezogen auf C) verdünnt und in einen Dialyseschlauch überführt. Es wird 22 h gegen 1 L Reduktionspuffer (4 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.5 M Arg, 0.01 M DTT, pH 8.5) anaerob dialysiert. Alle weiteren Dialysen erfolgen unter aeroben Bedingungen bei 4 °C. Nach der Dialyse gegen 1 L Oxidationspuffer (4 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.5 M Arg, 4 µM Cys, 0.5 µM Cystin, pH 8.5) für 30 h wird gegen 1 L Rückfaltungspuffer 1 (1 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.5 M Arg, pH 8) für 21 h und

3 x gegen je 0.5 L Rückfaltungspuffer 2 (0.05 M NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl, 0.5 M Arg, pH 7.5) für 22 h, 24 h und 20 h dialysiert. Anschließend wird das Dialysat in einen Protein Concentrator überführt und bei 4 °C und 4000 g auf ca. 1.4 mL konzentriert. Es folgt die Reinigung per Gelpermeationschromatographie (HiLoad™ 16/600 Superdex 75 prep grade, Rückfaltungspuffer 2, 1 mL/min). Die Monomerenfraktion A wird auf ca. 2.1 mL konzentriert und in 2 Portionen per RP-HPLC (Säule: Supelco Discovery® BIO Wide Pore C5 (150 x 4.6 mm), 30 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH, 20 min, 1 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen A werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B III, 30 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min), HR-MS (Direkteinlass), SDS-PAGE und CD-Spektroskopie charakterisiert.

Ausbeute: 1.00 mg (48.55 nmol, 33 %), weißer Feststoff,

C₈₉₉H₁₄₄₉N₂₃₉O₃₀₂S₅ (20598.1520), HR-MS: M_{ber} = 20585.3977; M_{gef} = 1145.4774 (M+18H)¹⁸⁺, 1212.6229 (M+17H)¹⁷⁺, 1288.3475 (M+16H)¹⁶⁺, 1374.2363 (M+15H)¹⁵⁺, 1472.1804 (M+14H)¹⁴⁺, 1585.4268 (M+13H)¹³⁺, 1717.1306 (M+12H)¹²⁺.

10.5 Versuche zu Kapitel 5.1

Boc-Cys(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-His(Trt)-Cys(Trt)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Asp(OPhiPr)-Ile-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Val-Pro-Asp(OtBu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Lys(Boc)-Val-Asn(Trt)-Phe-Tyr(tBu)-Ala-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Nle-Glu(OtBu)-Val-(Dmb)Gly-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Ala-Val-Glu(OtBu)-Val-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Leu-Trt-Aminomethyl-ChemMatrix-Harz 25

(EPO 29-67 (2xSTrt, OPhiPr)-Trt-CM 25)

Im Glasreaktor werden 406.6 mg (B_H = 0.42 mmol/g, 0.17 mmol, 1 eq) Trt-CM-Harz 2 unter Argonatmosphäre mit 7.2 mL DCM_{abs} versetzt. Es werden 800 µL AcBr zugegeben und die Mischung 3 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen der Lösung wird das Harz 8 x mit je 7 mL DCM_{abs} gewaschen und mit 2 mL DCM_{abs} versetzt. Unter Argon wird eine Lösung aus 300.4 mg (0.85 mmol, 5 eq) Fmoc-Leu-OH und 291.0 µL (1.70 mmol, 10 eq) DIPEA in 2 mL DCM_{abs} hinzugefügt und die Suspension 18 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz in eine 20 mL-Spritze überführt und 3 x mit DCM, 3 x je 2 min mit je 3.3 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) und 5 x mit DCM gewaschen. Der Beladungsgrad beträgt B_H = 0.26 mmol/g (70 %). Die Peptidelongation wird durch automatisierte Fmoc-SPPS durchgeführt. Für die Wasch- und Entschützungs-schritte wird je ein Volumen von 4 mL verwendet. Die Kupplungen

erfolgen mit 0.85 mmol (5 eq) Aminosäure, 351.6 mg (0.85 mmol, 5 eq) HCTU und 4.5 mL (1.80 mmol, 10.6 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) für 45 min oder 0.51 mmol (3 eq) Aminosäure oder Pseudoprolindipeptid, 265.4 mg (0.51 mmol, 3 eq) PyBOP, 2.5 mL (1.00 mmol, 5.9 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) und 1.5 mL DMF für 1 h. Die Kupplung von Val-56 wird mit 577.0 mg (1.70 mmol, 10 eq) Fmoc-Val-OH, 703.3 mg (1.70 mmol, 10 eq) HCTU und 8.5 mL (3.40 mmol, 20 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) für 1.5 h durchgeführt. Cys-33 und 29 werden manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierfür werden 995.7 mg (1.70 mmol, 10 eq) Fmoc-Cys(Trt)-OH bzw. 788.1 mg (1.70 mmol, 10 eq) Boc-Cys(Trt)-OH und 132.4 μ L (0.85 mmol, 5 eq) DIC in 24 mL DMF/DCM (1:3) eingesetzt und für 3 h gekuppelt. Die Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Nach der Festphasensynthese wird das Harz **25** in eine 20 mL-Spritze überführt und im Hochvakuum getrocknet.

Tabelle 3: Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese von Harz **25**.

Position	Aminosäure	m [mg]	Aktivierungsreagenz
Gly-66	Fmoc-Gly-OH	252.7	HCTU
Gln-65	Fmoc-Gln(Trt)-OH	519.1	HCTU
Trp-64	Fmoc-Trp(Boc)-OH	447.6	HCTU
Val-63	Fmoc-Val-OH	288.5	HCTU
Glu-62	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	361.7	HCTU
Val-61	Fmoc-Val-OH	288.5	HCTU
Ala-60	Fmoc-Ala-OH	264.6	HCTU
Gln-59	Fmoc-Gln(Trt)-OH	519.1	HCTU
Gln-58	Fmoc-Gln(Trt)-OH	519.1	HCTU
Gly-57	Fmoc-(Dmb)Gly-OH	228.0	PyBOP
Val-56	Fmoc-Val-OH ^[a]	577.0	HCTU
Glu-55	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	361.7	HCTU
Nle-54	Fmoc-Nle-OH	300.4	HCTU
Arg-53	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	551.5	HCTU
Lys-52	Fmoc-Lys(Boc)-OH	398.2	HCTU
Trp-51	Fmoc-Trp(Boc)-OH	447.6	HCTU
Ala-50	Fmoc-Ala-OH	264.6	HCTU
Tyr-49	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	390.7	HCTU

Experimenteller Teil

Phe-48	Fmoc-Phe-OH	329.3	HCTU
Asn-47	Fmoc-Asn(Trt)-OH	507.2	HCTU
Val-46	Fmoc-Val-OH	288.5	HCTU
Lys-45	Fmoc-Lys(Boc)-OH	398.2	HCTU
Asp-43, Thr-44	Fmoc-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	281.6	PyBOP
Pro-42	Fmoc-Pro-OH	286.8	HCTU
Val-41	Fmoc-Val-OH	288.5	HCTU
Ile-39, Thr-40	Fmoc-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	252.2	PyBOP
Asp-38	Fmoc-Asp(OPhPr)-OH	241.5	PyBOP
Glu-37	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	361.7	HCTU
Asn-36	Fmoc-Asn(Trt)-OH	507.2	HCTU
Leu-35	Fmoc-Leu-OH	300.4	HCTU
Ser-34	Fmoc-Ser(tBu)-OH	325.9	HCTU
Cys-33	Fmoc-Cys(Trt)-OH ^[b]	995.7	DIC
His-32	Fmoc-His(Trt)-OH	526.7	HCTU
Glu-31	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	361.7	HCTU
Ala-30	Fmoc-Ala-OH	264.6	HCTU
Cys-29	Boc-Cys(Trt)-OH ^[b]	788.1	DIC

^[a]Kupplung unter Verwendung von doppelten Mengen und doppelter Kupplungsdauer

^[b]manuelle Kupplung von 10 eq Cystein als symmetrisches Anhydrid

Es wird eine analytische Abspaltung und Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Peptid **25e** per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

H-Cys-Ala-Glu-His-Cys-Ser-Leu-Asn-Glu-Asp-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-OH 25e
(EPO 29-67, entschützt **25e**)

C₁₉₉H₃₀₃N₅₃O₆₁S₂ (4478.04); ESI-MS: M_{ber} = 4475,17; M_{gef} = 896.65 (M+5H)⁵⁺, 1120.38 (M+4H)⁴⁺, 1493.63 (M+3H)³⁺, 2240.04 (M+2H)²⁺.

Boc-Cys(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-His(Trt)-Cys(Trt)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Asp(OPhPr)-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Val-Pro-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Lys(Boc)-Val-Asn(Trt)-Phe-Tyr(tBu)-Ala-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Nle-Glu(OtBu)-Val-(Dmb)Gly-Gln(Trt)-

Gln(Trt)-Ala-Val-Glu(OtBu)-Val-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Leu-NHNHBoc **26**

(EPO 29-67 (2xStrt, OPhiPr) Boc-Hydrazid, geschützt **26**)

434.2 mg ($B_H(\text{theo}) = 0.09$ mmol/g (bezogen auf gekuppeltes Leu-67), 39.08 μmol , 1 eq) Peptidylharz **25** werden 5 min in 5 mL DCM vorgequollen. Es werden 10 mL 20 % HFIP/DCM zugegeben und die Mischung wird 30 min geschüttelt. Anschließend wird 5 x je 2 min mit je 8 mL 20 % HFIP/DCM gewaschen. Die Abspaltungs- und Waschlösungen werden in einem auf 0 °C gekühlten 500 mL-Kolben gesammelt und im Vakuum bei 5 °C eingengt. Zum Rückstand wird DCM gegeben und die Lösung erneut im Vakuum bei 5 °C eingengt. Dies wird insgesamt 4 x wiederholt. Beim letzten Mal wird die Lösung in einen 10 mL-Kolben überführt und nach Einengen der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Die Peptidylsäure wird in 1.9 mL DCM gelöst und bei 0 °C werden 34.1 mg (258.02 μmol , 6.6 eq) *tert*-Butylcarbazat, 29.2 mg (172.17 μmol , 4.4 eq) Cl-HOBt, 26.8 μL (172.17 μmol , 4.4 eq) DIC und 29.5 μL (172.17 μmol , 4.4 eq) DIPEA zugegeben (pH 9). Die Reaktionsmischung wird langsam unter Rühren auf RT erwärmt. Nach 20 h werden 300 mL DCM zugegeben und die organische Phase 3 x mit je 200 mL H₂O und 100 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt **26** per Flash-Chromatographie (Kartuschengröße: 12 g, 0 → 12 % MeOH/DCM, 40 min, 28 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **26** werden im Vakuum eingengt und aus 1,4-Dioxan lyophilisiert. Es wird eine analytische Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Hydrazid **26e** per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 218.5 mg (27.23 μmol , 70 %), weißer Feststoff, $R_f = 0.44$ (DCM/MeOH 10:1), C₄₄₆H₅₆₅N₅₅O₇₇S₃ (8024.91).

H-Cys-Ala-Glu-His-Cys-Ser-Leu-Asn-Glu-Asp-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-NHNH₂
26e

(EPO 29-67 Hydrazid, entschützt **26e**)

C₁₉₉H₃₀₅N₅₅O₆₀S₂ (4492.07); ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 4489.19$; $M_{\text{gef}} = 900.57$ (M+5H)⁵⁺, 1125.22 (M+4H)⁴⁺, 1500.02 (M+3H)³⁺, 2249.70 (M+2H)²⁺.

Boc-Cys(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-His(Trt)-Cys(Trt)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Asp-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Val-Pro-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Lys(Boc)-Val-Asn(Trt)-Phe-Tyr(tBu)-Ala-

Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Nle-Glu(OtBu)-Val-(Dmb)Gly-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Ala-Val-Glu(OtBu)-Val-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Leu-NHNHBoc **27**

(EPO 29-67 (2xSTrt, OH) Boc-Hydrazid, geschützt **27**)

50.1 mg (6.24 μmol , 1 eq) Hydrazid **26** werden mit 7.5 mL 1 % TFA/DCM versetzt und 70 min geschüttelt. Die Vollständigkeit des Umsatzes wird per DC (DCM/MeOH 10:1) kontrolliert. Das Produkt **27** wird durch Zugabe von 41 mL eiskaltem Diethylether 1 h bei $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgefällt und anschließend 40 min abzentrifugiert (4000 rpm). Der Überstand wird dekantiert. Das Waschen erfolgt durch nochmalige Zugabe von 41 mL eiskaltem Diethylether, Ausfällen bei $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min und Zentrifugation für 10 min. Die Überstände werden 1 d bei $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, der Feststoff anschließend 40 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Trocknung werden die Produktfraktionen **27** vereint und aus 1,4-Dioxan lyophilisiert.

Ausbeute: 47.0 mg (5.94 μmol , 95 %), weißer Feststoff, $R_f = 0.40$ (DCM/MeOH 10:1), $\text{C}_{437}\text{H}_{555}\text{N}_{55}\text{O}_{77}\text{S}_3$ (7906.74).

H-Cys-Ala-Glu-His-Cys-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-NHNH₂ **28**

(EPO 29-67 (2xSH, Nona) Hydrazid **28**)

48.9 mg (6.18 μmol , 1 eq) Hydrazid **27** werden in 354 μL DMSO/DMF (1:1) gelöst und 10.6 μL (61.80 μmol , 10 eq) DIPEA, 5.9 mg (15.45 μmol , 2.5 eq) HATU und 2.1 mg (15.45 μmol , 2.5 eq) HOAt hinzugefügt. 15.2 mg (9.27 μmol , 1.5 eq) frisch reduziertes Nona-NH₂ **7** werden zugegeben (pH 8) und die Mischung 21 h bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 6 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum wird das Glycopeptid **28** durch Zugabe von 14 mL eiskaltem Diethylether 20 min bei $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Nach Trocknung werden 1/3 und 2/3 des Rohprodukts **28** aus 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA lyophilisiert. 1/3 des Rohprodukts werden in 4 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und per RP-HPLC (Säule: Supelco Ascentis C18 (250 x 10 mm), 20 \rightarrow 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 50 min, 4 mL/min) gereinigt. Die restlichen 2/3 des Rohprodukts werden in 5.5 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.4 % TFA gelöst und per RP-HPLC (Säule: YMC-Pack Pro C8 (250 x 20 mm), 20 \rightarrow 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 79 min, 8 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen

mit dem Produkt **28** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 3.7 mg (0.61 μmol, 10 %), weißer Feststoff,

C₂₆₁H₄₀₈N₆₀O₁₀₄S₂ (6114.57); ESI-MS: M_{ber} = 6110.79; M_{gef} = 1222.79 (M+5H)⁵⁺, 1528.31 (M+4H)⁴⁺, 2037.48 (M+3H)³⁺.

H-Cys(Trt)-Ala-Glu-His-Cys(Trt)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-NHNH₂
29

(EPO 29-67 (2xSTrt, Nona) Hydrazid **29**)

Zu 2.8 mg (0.46 μmol, 1 eq) Glycopeptid **28** wird eine Lösung von 0.42 mg (1.61 μmol, 3.5 eq) Triphenylmethanol in 92 μL HFIP/AcOH (1:1) + 2 % TFA gegeben und das Gemisch 5 h geschüttelt. Nach Reaktionsende wird die Reaktionsmischung mit 4 mL 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA versetzt und per RP-HPLC (Supelco Ascentis C18 (250 x 10 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 50 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt **29** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.48 mg (72.74 nmol, 16 %), weißer Feststoff,

C₂₉₉H₄₃₆N₆₀O₁₀₄S₂ (6599.21); ESI-MS: M_{ber} = 6595.01; M_{gef} = 1649.61 (M+4H)⁴⁺, 2199.20 (M+3H)³⁺.

10.6 Versuche zu Kapitel 5.2

*Boc-Thz-Val-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-Gly-Leu-Arg(Pbf)-Ser(tBu)-Leu-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Thr(tBu)-Leu-Leu-Arg(Pbf)-Ala-Leu-(Dmb)Gly-Ala-Gln(Dmcp)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Ile-Ser(tBu)-Pro-Pro-Asp(OtBu)-Ala-Ala-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-Ala-Trt-Aminomethyl-ChemMatrix-Harz **30***
(EPO 98-127-Trt-CM **30**)

Im Glasreaktor werden 302.8 mg (B_H = 0.42 mmol/g, 0.13 mmol, 1 eq) Trt-CM-Harz **2** unter Argonatmosphäre mit 6.3 mL DCM_{abs} versetzt. Es werden 700 μL AcBr zugegeben und die Mischung 3 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen der Lösung wird das Harz 8 x mit je 7 mL DCM_{abs} gewaschen und mit 2 mL DCM_{abs} versetzt. Unter Argon wird eine Lösung aus

202.3 mg (0.65 mmol, 5 eq) frisch aus 1,4-Dioxan lyophilisiertem Fmoc-Ala-OH und 222.5 μ L (1.30 mmol, 10 eq) DIPEA in 2 mL DCM_{abs} hinzugefügt und die Suspension 19 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz in eine 20 mL-Spritze überführt und 3 x mit DCM, 3 x je 2 min mit je 3.3 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) und 5 x mit DCM gewaschen. Der Beladungsgrad beträgt $B_H = 0.37$ mmol/g (quant.). Die Peptidelongation wird durch automatisierte Fmoc-SPPS durchgeführt. Für die Wasch- und Entschützungs-schritte wird je ein Volumen von 3 mL verwendet. Die im Folgenden verwendeten Äquivalente beziehen sich auf $B_H = 0.37$ mmol/g. Die Kupplungen erfolgen mit 0.55 mmol (5 eq) Aminosäure, 227.5 mg (0.55 mmol, 5 eq) HCTU und 3 mL (1.20 mmol, 10.9 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) für 45 min oder 0.33 mmol (3 eq) Aminosäure oder Pseudoprolindipeptid, 171.7 mg (0.33 mmol, 3 eq) PyBOP, 1.5 mL (0.6 mmol, 5.5 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) und 1.5 mL DMF für 1 h. Die Kupplung von Leu-112 wird mit 388.7 mg (1.10 mmol, 10 eq) Fmoc-Leu-OH, 455.1 mg (1.10 mmol, 10 eq) HCTU und 5.5 mL (2.20 mmol, 20 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) für 1.5 h durchgeführt. Die Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Nach Kupplung von Val-99 wird ein Beladungsgrad von $B_H = 0.11$ mmol/g bestimmt (73 % bezogen auf gekuppeltes Ala-127). Nach der Festphasensynthese wird das Harz **30** in eine 20 mL-Spritze überführt und im Hochvakuum getrocknet.

Tabelle 4: Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese von Harz **30**.

Position	Aminosäure	m [mg]	Aktivierungsreagenz
Ala-125, Ser-126	Fmoc-Ala-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	144.7	PyBOP
Ala-124	Fmoc-Ala-OH	171.2	HCTU
Asp-123	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	226.3	HCTU
Pro-122	Fmoc-Pro-OH	185.6	HCTU
Pro-121	Fmoc-Pro-OH	185.6	HCTU
Ser-120	Fmoc-Ser(tBu)-OH	210.9	HCTU
Ile-119	Fmoc-Ile-OH	194.4	HCTU
Ala-118	Fmoc-Ala-OH	171.2	HCTU
Glu-117	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	234.0	HCTU
Lys-116	Fmoc-Lys(Boc)-OH	257.7	HCTU
Gln-115	Fmoc-Gln(Dmcp)-OH	148.7	PyBOP
Ala-114	Fmoc-Ala-OH	171.2	HCTU
Gly-113	Fmoc-(Dmb)Gly-OH	147.7	PyBOP

Experimenteller Teil

Leu-112	Fmoc-Leu-OH ^[a]	388.7	HCTU
Ala-111	Fmoc-Ala-OH	171.2	HCTU
Arg-110	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	356.8	HCTU
Leu-109	Fmoc-Leu-OH	194.4	HCTU
Leu-108	Fmoc-Leu-OH	194.4	HCTU
Thr-107	Fmoc-Thr(tBu)-OH	218.6	HCTU
Leu-105, Thr-106	Fmoc-Leu-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	163.2	PyBOP
Ser-104	Fmoc-Ser(tBu)-OH	210.9	HCTU
Arg-103	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	356.8	HCTU
Leu-102	Fmoc-Leu-OH	194.4	HCTU
Gly-101	Fmoc-Gly-OH	163.5	HCTU
Val-99, Ser-100	Fmoc-Val-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	153.9	PyBOP
Cys-98	Boc-Thz-OH	77.0	PyBOP

^[a]Kupplung unter Verwendung von doppelten Mengen und doppelter Kupplungsdauer

Es wird eine analytische Abspaltung und Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Peptid **30e** per RP-HPLC-MS (Säule: A I, 10 → 60 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

H-Thz-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-OH 30e

(EPO 98-127, entschützt **30e**)

C₁₂₉H₂₂₂N₃₈O₄₂S (3009.48); ESI-MS: M_{ber} = 3007.61; M_{gef} = 753.46 (M+4H)⁴⁺, 1003.97 (M+3H)³⁺, 1506.02 (M+2H)²⁺.

H-Thz-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-S(CH₂)₂COOC₄H₉ G

(EPO 98-127 nBu-3-McP **G**)

247.6 mg (B_H = 0.11 mmol/g, 27.24 μ mol, 1 eq) Peptidylharz **30** werden 5 min in 5 mL DCM vorgequollen. Es wird 10 x je 2 min mit je 7 mL 1.5 % TFA/2 % TES/DCM geschüttelt. Anschließend wird 6 x mit je 7 mL DCM gewaschen. Die Abspaltungs- und Waschlösungen werden in einem 250 mL-Kolben gesammelt, in dem 2.0 mL (11.84 mmol, 1.1 eq bezogen auf TFA) DIPEA vorgelegt sind. Es werden noch 2.0 mL DIPEA hinzugefügt (pH 9). Die Lösung wird im Vakuum auf ca. 10 mL eingengt, in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt und auf

6.2 mL eingeengt. Es werden 132.7 mg (817.2 μmol , 30 eq) *n*-Butyl-3-mercaptopropionsäure, 92.4 mg (544.8 μmol , 20 eq) Cl-HOBt und 84.9 μL (544.8 μmol , 20 eq) DIC zugegeben (pH 9) und die Reaktionsmischung 8 d geschüttelt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 25 mL TFA/TES/H₂O/*n*Bu-3-McP (95:2:2:1) versetzt und 2 h geschüttelt. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum wird der Thioester **G** durch Zugabe von 40 mL eiskaltem Diethylether 1 d bei -24 °C ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Dieser Vorgang wird zweimal mit je 49 mL eiskaltem Diethylether bei -24 °C für je 30 min wiederholt. Die Überstände werden 1 d bei -24 °C belassen, der Feststoff anschließend abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Trocknung werden die Fraktionen vereint und aus 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH lyophilisiert. Das Rohprodukt **G** wird in 6 mL 50 % MeCN/H₂O gelöst und in 2 Portionen per RP-HPLC (Säule: YMC-Pack Pro C8 (250 x 20 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 49 min, 8 mL/min) gereinigt. Nach Gefriertrocknung wird der Thioester **G** in 3 mL 50 % MeCN/H₂O gelöst und nochmals per RP-HPLC (Säule: YMC Hydrosphere C18 (150 x 10 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 50 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt **G** werden lyophilisiert und per RP-HPLC-MS (Säule: A II, 10 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 36.2 mg (11.48 μmol , 42 %), weißer Feststoff,

C₁₃₆H₂₃₄N₃₈O₄₃S₂ (3153.71); ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 3151.67$; $M_{\text{gef}} = 789.12$ (M+4H)⁴⁺, 1051.44 (M+3H)³⁺, 1577.25 (M+2H)²⁺.

*Boc-Cys(StBu)-Pro-Leu-Arg(Pbf)-Thr(tBu)-Ile-Thr(tBu)-Ala-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Phe-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Arg(Pbf)-Val-Tyr(tBu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Asn(Dmcp)-Phe-Leu-Arg(Pbf)-Gly-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Gly-Glu(OtBu)-Ala-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Thr(tBu)-Gly-Asp(OtBu)-Arg(Pbf)-Trt-Aminomethyl-ChemMatrix-Harz **31** (EPO 128-166 (STrt)-Trt-CM **31**)*

Im Glasreaktor werden 299.8 mg ($B_{\text{H}} = 0.42$ mmol/g, 0.13 mmol, 1 eq) Trt-CM-Harz **2** unter Argonatmosphäre mit 6.3 mL DCM_{abs} 5 min vorgequollen. Es werden 700 μL AcBr zugegeben und die Mischung 3 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen der Lösung wird das Harz 8 x mit je 7 mL DCM_{abs} gewaschen und mit 2 mL DCM_{abs} versetzt. Unter Argon wird eine Lösung aus 421.7 mg (0.65 mmol, 5 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-OH und 222.5 μL (1.30 mmol, 10 eq) DIPEA in 2 mL DCM_{abs} hinzugefügt und die Suspension 19 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz in eine 20 mL-Spritze überführt und 3 x mit DCM, 3 x je 2 min

mit je 3.3 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) und 5 x mit DCM gewaschen. Der Beladungsgrad beträgt $B_H = 0.29$ mmol/g (88 %). Die Peptidelongation wird durch automatisierte Fmoc-SPPS durchgeführt. Für die Wasch- und Entschützungs-schritte wird je ein Volumen von 3 mL verwendet. Die Kupplungen erfolgen mit 0.65 mmol (5 eq) Aminosäure, 268.9 mg (0.65 mmol, 5 eq) HCTU und 3.5 mL (1.40 mmol, 10.8 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) für 45 min. Cys-161 und 128 werden manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierfür werden 761.4 mg (1.30 mmol, 10 eq) Fmoc-Cys(Trt)-OH bzw. 402.3 mg (1.30 mmol, 10 eq) Boc-Cys(StBu)-OH und 101.3 μ L (0.65 mmol, 5 eq) DIC in 22 mL DMF/DCM (1:3.4) eingesetzt und für 3 h gekuppelt. Die Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Nach Kupplung von Pro-129 wird ein Beladungsgrad von $B_H = 0.07$ mmol/g bestimmt (70 % bezogen auf gekuppeltes Arg-166). Nach der Festphasensynthese wird das Harz **31** in eine 20 mL-Spritze überführt und im Hochvakuum getrocknet.

Tabelle 5: Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese von Harz **31**.

Position	Aminosäure	m [mg]	Aktivierungsreagenz
Asp-165	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	267.5	HCTU
Gly-164	Fmoc-Gly-OH	193.2	HCTU
Thr-163	Fmoc-Thr(tBu)-OH	258.4	HCTU
Arg-162	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	421.7	HCTU
Cys-161	Fmoc-Cys(Trt)-OH ^[a]	761.4	DIC
Ala-160	Fmoc-Ala-OH	202.3	HCTU
Glu-159	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	276.6	HCTU
Gly-158	Fmoc-Gly-OH	193.2	HCTU
Tyr-156, Thr-157	Fmoc-Tyr(tBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	390.5	HCTU
Leu-155	Fmoc-Leu-OH	229.7	HCTU
Lys-154	Fmoc-Lys(Boc)-OH	304.5	HCTU
Leu-153	Fmoc-Leu-OH	229.7	HCTU
Lys-152	Fmoc-Lys(Boc)-OH	304.5	HCTU
Gly-151	Fmoc-Gly-OH	193.2	HCTU
Arg-150	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	421.7	HCTU
Leu-149	Fmoc-Leu-OH	229.7	HCTU
Phe-148	Fmoc-Phe-OH	251.8	HCTU
Asn-147	Fmoc-Asn(Dmcp)-OH	283.7	HCTU

Experimenteller Teil

Tyr-145, Ser-146	Fmoc-Tyr(tBu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	381.4	HCTU
Val-144	Fmoc-Val-OH	220.6	HCTU
Arg-143	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	421.7	HCTU
Phe-142	Fmoc-Phe-OH	251.8	HCTU
Leu-141	Fmoc-Leu-OH	229.7	HCTU
Lys-140	Fmoc-Lys(Boc)-OH	304.5	HCTU
Arg-139	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	421.7	HCTU
Phe-138	Fmoc-Phe-OH	251.8	HCTU
Asp-136, Thr-137	Fmoc-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	358.9	HCTU
Ala-135	Fmoc-Ala-OH	202.3	HCTU
Thr-134	Fmoc-Thr(tBu)-OH	258.4	HCTU
Ile-133	Fmoc-Ile-OH	229.7	HCTU
Thr-132	Fmoc-Thr(tBu)-OH	258.4	HCTU
Arg-131	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	421.7	HCTU
Leu-130	Fmoc-Leu-OH	229.7	HCTU
Pro-129	Fmoc-Pro-OH	219.3	HCTU
Cys-128	Boc-Cys(StBu)-OH ^[a]	402.3	DIC

^[a] manuelle Kupplung von 10 eq Cystein als symmetrisches Anhydrid

Es wird eine analytische Abspaltung und Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Peptid **31e** per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

H-Cys(StBu)-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH
31e

(EPO 128-166, entschützt **31e**)

C₂₀₇H₃₃₇N₆₁O₅₅S₃ (4656.53); ESI-MS: M_{ber} = 4653.46; M_{gef} = 666.05 (M+7H)⁷⁺, 776.87 (M+6H)⁶⁺, 932.22 (M+5H)⁵⁺, 1165.01 (M+4H)⁴⁺, 1553.26 (M+3H)³⁺, 2329.71 (M+2H)²⁺.

H-Cys(StBu)-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Trt)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH **H1**

(EPO 128-166 (STrt) **H1**)

104.1 mg ($B_H = 0.07$ mmol/g, 7.29 μ mol, 1 eq) Peptidylharz **31** werden 5 min in 5 mL DCM vorgequollen. Anschließend wird 2 h mit 7 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) entschützt und danach 3 x mit je 1 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) je 10 min gewaschen. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum erfolgt die Fällung mit 13 mL eiskaltem Diethylether bei -24 °C für 20 min. Der Feststoff wird abzentrifugiert und zweimal durch Wiederholung dieses Prozesses gewaschen. Der Überstand wird jeweils dekantiert. Nach Trocknung wird das Peptid **31e** mit 729 μ L HFIP und 7.59 mg (29.16 μ mol, 4 eq) Triphenylmethanol versetzt und 2.5 h geschüttelt. Anschließend wird das Gemisch im Hochvakuum eingengt. Das Rohprodukt **H1** wird durch Zugabe von eiskaltem Diethylether 20 min bei -24 °C ausgefällt, danach abzentrifugiert und durch zweimalige Wiederholung gewaschen. Der Überstand wird jeweils dekantiert. Nach Trocknung und Lösen in 6 mL 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA erfolgt die Reinigung in 2 Portionen per RP-HPLC (Säule: YMC-Pack Pro C8 (250 x 20 mm), 30 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 49 min, 8 mL/min). Die Fraktionen mit dem Produkt **H1** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 17.4 mg (3.55 μ mol, 49 %), weißer Feststoff,

C₂₂₆H₃₅₁N₆₁O₅₅S₃ (4898.85); ESI-MS: $M_{ber} = 4895.57$; $M_{gef} = 700.58$ (M+7H)⁷⁺, 817.11 (M+6H)⁶⁺, 980.43 (M+5H)⁵⁺, 1225.44 (M+4H)⁴⁺, 1633.99 (M+3H)³⁺, 2450.66 (M+2H)²⁺.

H-Thz-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Cys-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Trt)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH 32

(EPO 98-166 (Thz, STrt) **32**)

In einer anaeroben Glovebox werden 11.6 mg (3.67 μ mol, 1.2 eq) Thioester **G** in 350 μ L Ligationspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 15 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.9) 25 min inkubiert. Die Lösung wird anschließend zu 15.0 mg (3.06 μ mol, 1 eq) Peptidfragment **H1** gegeben und 400 μ L Ligationspuffer hinzugefügt. Nach 6 d werden 11.6 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) zugegeben. Nach 21 h wird die Mischung mit 7.25 mL 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und in 2 Portionen per RP-HPLC (YMC-Pack Pro C8 (250 x 20 mm), 30 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 49 min, 8 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **32** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B II, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 14.3 mg (1.83 μmol , 60 %), weißer Feststoff,

$\text{C}_{351}\text{H}_{563}\text{N}_{99}\text{O}_{96}\text{S}_3$ (7802.14); ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 7797.14$; $M_{\text{gef}} = 710.22$ (M+11H)¹¹⁺, 781.34 (M+10H)¹⁰⁺, 868.08 (M+9H)⁹⁺, 976.55 (M+8H)⁸⁺, 1115.88 (M+7H)⁷⁺, 1301.76 (M+6H)⁶⁺, 1561.92 (M+5H)⁵⁺, 1952.22 (M+4H)⁴⁺, 2602.87 (M+3H)³⁺.

H-Cys-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Cys-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Trt)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH 33

(EPO 98-166 (STrt) 33)

In einer anaeroben Glovebox werden 5.1 mg (0.65 μmol , 1 eq) Ligationsprodukt **32** mit 1.0 mL Entschützungspuffer (6 M GdmCl, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.2 M MeONH₂, pH 3.4) versetzt und 19 h inkubiert. Anschließend werden 15.7 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) zugegeben. Nach 4 h wird die Mischung mit 2.0 mL 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 30 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 20 min, 3 mL/min) gereinigt. Die Fraktion mit der Zielverbindung **33** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B II, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 4.4 mg (0.86 μmol , 86 %), weißer Feststoff,

$\text{C}_{350}\text{H}_{563}\text{N}_{99}\text{O}_{96}\text{S}_3$ (7790.13); ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 7785.14$; $M_{\text{gef}} = 708.59$ (M+11H)¹¹⁺, 779.51 (M+10H)¹⁰⁺, 865.91 (M+9H)⁹⁺, 974.09 (M+8H)⁸⁺, 1113.20 (M+7H)⁷⁺, 1298.58 (M+6H)⁶⁺, 1558.09 (M+5H)⁵⁺, 1947.51 (M+4H)⁴⁺, 2596.70 (M+3H)³⁺.

10.7 Versuche zu Kapitel 5.3

H-Cys(Trt)-Ala-Glu-His-Cys(Trt)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Cys-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(Nvoc)-NHNH₂ 34

(EPO 29-97 (2xSTrt, 2xNona, Nvoc) Hydrazid 34)

Das von Graf durch NCL von 2.9 mg (0.43 μmol , 1.1 eq) Glycopeptidthioester **E1** und 2.1 mg (0.40 μmol , 1 eq) Glycopeptidhydrazid **F1** synthetisierte und mit 30 % MeCN/H₂O +

0.1 % TFA ausgefällte Ligationsprodukt **34** wird aus AcOH lyophilisiert, in 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und nochmals lyophilisiert. Das Rohprodukt **34** wird erneut in 1 mL 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und in 2 Portionen geteilt. Anschließend werden je 7.7 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) zugegeben und 2 h bzw. 30 min geschüttelt. Die Reinigung erfolgt jeweils per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 30 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 59 min, 2 mL/min bzw. YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 30 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 39 min, 3 mL/min). Die Produktfraktionen **34** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B III, 30 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.50 mg (42.41 nmol, 11 %), weißer Feststoff,

C₅₂₀H₇₈₈N₁₀₆O₁₉₈S₃ (11788.75); ESI-MS: M_{ber} = 11781.40; M_{gef} = 1686.33 (M+7H)⁷⁺, 1967.54 (M+6H)⁶⁺, 2360.43 (M+5H)⁵⁺, 2949.57 (M+4H)⁴⁺, 3931.24 (M+3H)³⁺.

*H-Cys(Trt)-Ala-Glu-His-Cys(Trt)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Cys-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(Nvoc)-SCH₂C₆H₄COOH **35***

*(EPO 29-97 (2xSTrt, 2xNona, Nvoc) MMBA **35**)*

0.50 mg (42.41 nmol, 1 eq) Hydrazid **34** werden bei -24 °C in 13.25 µL Diazotierungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 3) gelöst. Nach 1 h werden 0.44 mg (2.63 µmol, 62 eq) MMBA hinzugefügt und der pH-Wert mit 3.94 µL (93 eq) 1 M NaOH auf pH 6 eingestellt. Nach 1 h bei RT wird 1 mL 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA zugegeben und das Rohprodukt **35** per Gelpermeationschromatographie (Säule: Superdex® Peptide 10/300 GL, 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 0.6 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **35** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B III, 30 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.31 mg (26.00 nmol, 61 %), weißer Feststoff,

C₅₂₈H₇₉₂N₁₀₄O₂₀₀S₄ (11924.91); ESI-MS: M_{ber} = 11917.39; M_{gef} = 1989.85 (M+6H)⁶⁺, 2387.87 (M+5H)⁵⁺, 2984.31 (M+4H)⁴⁺, 3977.64 (M+3H)³⁺.

*H-Cys(Trt)-Ala-Glu-His-Cys(Trt)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Cys-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(Nvoc)-Cys-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Cys-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Trt)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH **36***
(EPO 29-166 (3xS_{Trt}, 2xNona, Nvoc) **36**)

In der anaeroben Glovebox werden 0.31 mg (26.00 nmol, 1 eq) Thioester **35** und 0.30 mg (39.00 nmol, 1.5 eq) Peptidfragment **33** in 7.1 μ L Ligationspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 15 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.9) gelöst. Nach 7 d werden 1.1 mg DTT (Endkonzentration = 1 M) zugegeben. Nach 23 h wird die Mischung mit 1 mL 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 30 \rightarrow 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 39 min, 3 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **36** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B III, 20 \rightarrow 70 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.25 mg (12.79 nmol, 49 %), weißer Feststoff,

C₈₇₀H₁₃₄₇N₂₀₃O₂₉₄S₆ (19546.83); ESI-MS: M_{ber} = 19534.50; M_{gef} = 1630.48 (M+12H)¹²⁺, 1778.77 (M+11H)¹¹⁺, 1956.33 (M+10H)¹⁰⁺, 2174.10 (M+9H)⁹⁺.

10.8 Versuche zu Kapitel 6.1

*Boc-Cys(Acm)-Ala-Glu(OtBu)-His(Trt)-Cys(Acm)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Asp(OPhiPr)-Ile-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Val-Pro-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Lys(Boc)-Val-Asn(Trt)-Phe-Tyr(tBu)-Ala-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Nle-Glu(OtBu)-Val-(Dmb)Gly-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Ala-Val-Glu(OtBu)-Val-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Leu-Trt-Aminomethyl-ChemMatrix-Harz **37***
(EPO 29-67 (2xSAcm, OPhiPr)-Trt-CM **37**)

Im Glasreaktor werden 403.6 mg (B_H = 0.30 mmol/g, 0.12 mmol, 1 eq) Trt-CM-Harz **2** unter Argonatmosphäre mit 7.2 mL DCM_{abs} 5 min vorgequollen. Es werden 800 μ L AcBr zugegeben und 3 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen der Lösung wird das Harz 8 x mit je

8 mL DCM_{abs} gewaschen und mit 2 mL DCM_{abs} versetzt. Unter Argon wird eine Lösung aus 212.0 mg (0.60 mmol, 5 eq) Fmoc-Leu-OH und 205.4 µL (1.20 mmol, 10 eq) DIPEA in 2 mL DCM_{abs} hinzugefügt und die Suspension 18 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz in eine 20 mL-Spritze überführt und 3 x mit DCM, 3 x je 2 min mit je 3.3 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) und 5 x mit DCM gewaschen. Der Beladungsgrad beträgt $B_H = 0.27$ mmol/g (quant.). Die Peptidelongation wird durch automatisierte Fmoc-SPPS durchgeführt. Für die Wasch- und Entschützungs-schritte wird je ein Volumen von 4 mL verwendet. Die Kupplungen erfolgen mit 0.60 mmol (5 eq) Aminosäure, 248.2 mg (0.60 mmol, 5 eq) HCTU und 3.0 mL (1.20 mmol, 10 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) und 1.0 mL DMF für 45 min oder 0.36 mmol (3 eq) Aminosäure oder Pseudoprolindipeptid, 187.3 mg (0.36 mmol, 3 eq) PyBOP, 2.0 mL (0.8 mmol, 6.7 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) und 2.0 mL DMF für 1 h. Die Kupplung von Val-56 wird mit 407.3 mg (1.20 mmol, 10 eq) Fmoc-Val-OH, 496.4 mg (1.20 mmol, 10 eq) HCTU und 6.0 mL (2.40 mmol, 20 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) für 1.5 h durchgeführt. Cys-33 und 29 werden manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierfür werden 497.4 mg (1.20 mmol, 10 eq) Fmoc-Cys(Acm)-OH bzw. 350.8 mg (1.20 mmol, 10 eq) Boc-Cys(Acm)-OH und 93.5 µL (0.60 mmol, 5 eq) DIC in 22 mL DMF/DCM (1:3.4) eingesetzt und für 3.5 h gekuppelt. Die Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Nach Kupplung von Ala-30 wird ein Beladungsgrad von $B_H = 0.06$ mmol/g bestimmt (67 % bezogen auf gekuppeltes Leu-67). Nach der Festphasensynthese wird das Harz **37** in eine 20 mL-Spritze überführt und im Hochvakuum getrocknet.

Tabelle 6: Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese von Harz **37**.

Position	Aminosäure	m [mg]	Aktivierungsreagenz
Gly-66	Fmoc-Gly-OH	178.4	HCTU
Gln-65	Fmoc-Gln(Trt)-OH	366.4	HCTU
Trp-64	Fmoc-Trp(Boc)-OH	316.0	HCTU
Val-63	Fmoc-Val-OH	203.6	HCTU
Glu-62	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	255.3	HCTU
Val-61	Fmoc-Val-OH	203.6	HCTU
Ala-60	Fmoc-Ala-OH	186.8	HCTU
Gln-59	Fmoc-Gln(Trt)-OH	366.4	HCTU
Gln-58	Fmoc-Gln(Trt)-OH	366.4	HCTU
Gly-57	Fmoc-(Dmb)Gly-OH	160.9	PyBOP

Experimenteller Teil

Val-56	Fmoc-Val-OH ^[a]	407.3	HCTU
Glu-55	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	255.3	HCTU
Nle-54	Fmoc-Nle-OH	212.0	HCTU
Arg-53	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	389.3	HCTU
Lys-52	Fmoc-Lys(Boc)-OH	281.1	HCTU
Trp-51	Fmoc-Trp(Boc)-OH	316.0	HCTU
Ala-50	Fmoc-Ala-OH	186.8	HCTU
Tyr-49	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	275.8	HCTU
Phe-48	Fmoc-Phe-OH	232.4	HCTU
Asn-47	Fmoc-Asn(Trt)-OH	358.0	HCTU
Val-46	Fmoc-Val-OH	203.6	HCTU
Lys-45	Fmoc-Lys(Boc)-OH	281.1	HCTU
Asp-43, Thr-44	Fmoc-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	198.8	PyBOP
Pro-42	Fmoc-Pro-OH	202.4	HCTU
Val-41	Fmoc-Val-OH	203.6	HCTU
Ile-39, Thr-40	Fmoc-Ile-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	178.1	PyBOP
Asp-38	Fmoc-Asp(OPhiPr)-OH	170.5	PyBOP
Glu-37	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	255.3	HCTU
Asn-36	Fmoc-Asn(Trt)-OH	358.0	HCTU
Leu-35	Fmoc-Leu-OH	212.0	HCTU
Ser-34	Fmoc-Ser(tBu)-OH	203.0	HCTU
Cys-33	Fmoc-Cys(Acm)-OH ^[b]	497.4	DIC
His-32	Fmoc-His(Trt)-OH	371.8	HCTU
Glu-31	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	255.3	HCTU
Ala-30	Fmoc-Ala-OH	186.8	HCTU
Cys-29	Boc-Cys(Acm)-OH ^[b]	350.8	DIC

^[a]Kupplung unter Verwendung von doppelten Mengen und doppelter Kupplungsdauer

^[b]manuelle Kupplung von 10 eq Cystein als symmetrisches Anhydrid

Es wird eine analytische Abspaltung und Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Peptid **37e** per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asp-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-

Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-OH 37e

(EPO 29-67 (2xSAcm), entschützt **37e**)

C₂₀₅H₃₁₃N₅₅O₆₃S₂ (4620.20); ESI-MS: M_{ber} = 4617.24; M_{gef} = 925.65 (M+5H)⁵⁺, 1156.80 (M+4H)⁴⁺, 1541.96 (M+3H)³⁺, 2312.31 (M+2H)²⁺.

Nebenprodukt: H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-OH 37e-Asp

(EPO 29-67 (2xSAcm) - Asp-38, entschützt **37e-Asp**)

C₂₀₁H₃₀₈N₅₄O₆₀S₂ (4505.11); ESI-MS: M_{ber} = 4502.22; M_{gef} = 902.64 (M+5H)⁵⁺, 1127.68 (M+4H)⁴⁺, 1503.37 (M+3H)³⁺, 2255.13 (M+2H)²⁺.

*Boc-Cys(Acm)-Ala-Glu(OtBu)-His(Trt)-Cys(Acm)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Asp(OPhPr)-Ile-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Val-Pro-Asp(OtBu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Lys(Boc)-Val-Asn(Trt)-Phe-Tyr(tBu)-Ala-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Nle-Glu(OtBu)-Val-(Dmb)Gly-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Ala-Val-Glu(OtBu)-Val-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Leu-NHNHBoc **38***

(EPO 29-67 (2xSAcm, OPhPr) Boc-Hydrazid, geschützt **38**)

429.1 mg (B_H = 0.06 mmol/g, 25.75 μmol, 1 eq) Peptidylharz **37** werden 5 min in 5 mL DCM vorgequollen. Es werden 10 mL 20 % HFIP/DCM zugegeben und 30 min geschüttelt. Anschließend wird 5 x je 2 min mit je 8 mL 20 % HFIP/DCM gewaschen. Die Abspaltungs- und Waschlösungen werden in einem auf 0 °C gekühlten 500 mL-Kolben gesammelt und im Vakuum bei 5 °C eingeengt. Zum Rückstand wird DCM gegeben und die Lösung erneut im Vakuum bei 5 °C eingeengt. Dies wird insgesamt 4 x wiederholt. Beim letzten Mal wird die Lösung in einen 10 mL-Kolben überführt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Die Peptidylsäure wird in 1.9 mL DCM gelöst und bei 0 °C werden 34.0 mg (257.26 μmol, 10 eq) *tert*-Butylcarbazat, 29.1 mg (171.58 μmol, 6.7 eq) Cl-HOBt, 26.7 μL (171.58 μmol, 6.7 eq) DIC und 29.4 μL (171.58 μmol, 6.7 eq) DIPEA zugegeben (pH 9). Die Reaktionsmischung wird langsam unter Rühren auf RT erwärmt. Nach 19 h werden 300 mL DCM zugegeben und die organische Phase 3 x mit je 200 mL H₂O und 100 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt **38** per Flash-Chromatographie (Kartuschengröße: 12 g, 0 → 12 % MeOH/DCM, 40 min, 28 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **38** werden im Vakuum eingeengt und aus 1,4-Dioxan lyophilisiert. Es wird eine analytische Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Hydrazid **38e** per RP-UHPLC-MS (Säule: B I,

10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 240.8 mg (31.34 μmol, > 100 %), weißer Feststoff, $R_f = 0.43$ (DCM/MeOH 10:1), $C_{414}H_{547}N_{57}O_{79}S_3$ (7682.43).

H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asp-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-NHNH₂ 38e

(EPO 29-67 (2xSAcm) Hydrazid, entschützt **38e**)

$C_{205}H_{315}N_{57}O_{62}S_2$ (4634.23); ESI-MS: $M_{ber} = 4631.27$; $M_{gef} = 928.72$ (M+5H)⁵⁺, 1160.19 (M+4H)⁴⁺, 1546.61 (M+3H)³⁺, 2319.79 (M+2H)²⁺.

Nebenprodukt: H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-NHNH₂ 38e-Asp

(EPO 29-67 (2xSAcm) Hydrazid - Asp-38, entschützt **38e-Asp**)

$C_{201}H_{310}N_{56}O_{59}S_2$ (4519.14); ESI-MS: $M_{ber} = 4516.24$; $M_{gef} = 905.47$ (M+5H)⁵⁺, 1131.62 (M+4H)⁴⁺, 1508.39 (M+3H)³⁺, 2262.33 (M+2H)²⁺.

*Boc-Cys(Acm)-Ala-Glu(OtBu)-His(Trt)-Cys(Acm)-Ser(tBu)-Leu-Asn(Trt)-Glu(OtBu)-Asp-Ile-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Val-Pro-Asp(OtBu)-Thr(ψ^{Me,Me}pro)-Lys(Boc)-Val-Asn(Trt)-Phe-Tyr(tBu)-Ala-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Nle-Glu(OtBu)-Val-(Dmb)Gly-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Ala-Val-Glu(OtBu)-Val-Trp(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Leu-NHNHBoc **39***

(EPO 29-67 (2xSAcm, OH) Boc-Hydrazid, geschützt **39**)

69.8 mg (9.09 μmol, 1 eq) von *Hessefort* erhaltenes Hydrazid **38** werden mit 4.6 mL 1 % TFA/DCM versetzt und 10 min geschüttelt. Anschließend wird das Produkt **39** durch Zugabe von 45 mL eiskaltem Diethylether 20 min bei -24 °C ausgefällt und 30 min abzentrifugiert (4000 rpm). Der Überstand wird dekantiert. Das Waschen erfolgt durch nochmalige Zugabe von 45 mL eiskaltem Diethylether, Ausfällen bei -24 °C für 20 min und Zentrifugation für 10 min. Nach Trocknung wird das Produkt **39** aus 1,4-Dioxan lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (15 μg in 3 μL DMF; Säule: B II, 95 → 100 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 64.1 mg (8.47 μmol, 93 %), weißer Feststoff,

$C_{405}H_{537}N_{57}O_{79}S_3$ (7564.25); ESI-MS: $M_{ber} = 7558.89$; $M_{gef} = 2522.42$ (M+3H)³⁺, 2529.97

(M+2H+Na)³⁺, 2537.08 (M+H+2Na)³⁺, 2544.32 (M+3Na)³⁺, 2550.55 (M+2Na+K)³⁺, 3783.31 (M+2H)²⁺, 3793.90 (M+H+Na)²⁺, 3804.89 (M+2Na)²⁺, 3814.14 (M+Na+K)²⁺.

H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-NHNH₂
40

(EPO 29-67 (2xSAcm, Nona) Hydrazid 40)

31.8 mg (4.20 μmol, 1.5 eq) Hydrazid **39** werden in 93.3 μL DMSO/DMF (1:1) gelöst und 7.2 μL (42.00 μmol, 15 eq) DIPEA, 4.0 mg (10.50 μmol, 3.75 eq) HATU und 1.4 mg (10.50 μmol, 3.75 eq) HOAt hinzugefügt. 4.6 mg (2.80 μmol, 1 eq) frisch reduziertes Nona-NH₂ **7** werden zugegeben (pH 8) und die Mischung wird 35 h bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 5 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum wird das Glycopeptid **40** durch Zugabe von 14 mL eiskaltem Diethylether 20 min bei -24 °C ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Nach Trocknung wird das Rohprodukt **40** in 3.9 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und per RP-HPLC (Säule: YMC-Pack Pro C8 (250 x 20 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 79 min, 8 mL/min) gereinigt. Die Fraktion mit dem Produkt **40** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 5.00 mg (0.80 μmol, 29 %), weißer Feststoff,

C₂₆₇H₄₁₈N₆₂O₁₀₆S₂ (6256.73); ESI-MS: M_{ber} = 6252.87; M_{gef} = 1252.64 (M+5H)⁵⁺, 1565.60 (M+4H)⁴⁺, 2087.11 (M+3H)³⁺, 3130.19 (M+2H)²⁺.

H-Cys-Ala-Glu-His-Cys-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-NHNH₂
41

(EPO 29-67 (2xSH, Nona) Hydrazid 41)

1.9 mg Pd^{II}Cl₂ werden in 608 μL H₂O suspendiert und 1 d bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Anschließend wird der Feststoff abzentrifugiert und 7.3 μL des braunen Überstands (22.7 μg Pd^{II}Cl₂, 127.90 nmol, 10 eq) zu einer Lösung von 0.08 mg (12.79 nmol, 1 eq) Glycopeptid **40** in 21.2 μL H₂O gegeben. Die gelbe Lösung wird bei 37 °C stark

geschüttelt (1000 rpm). Die Reaktion wird per RP-UHPLC-MS (Überstand nach DTT-Zugabe und Pelletieren; Säule: B I, 0 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert. Vollständiger Umsatz ist nach 5 min erreicht.

$C_{261}H_{408}N_{60}O_{104}S_2$ (6114.57); ESI-MS: $M_{ber} = 6110.79$; $M_{gef} = 1224.50$ (M+5H)⁵⁺, 1530.55 (M+4H)⁴⁺, 2040.28 (M+3H)³⁺, 3059.63 (M+2H)²⁺.

H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-SCH₂C₆H₄COOH **E2**

(EPO 29-67 (2xSAcm, Nona) MMBA **E2**)

4.9 mg (0.78 μmol, 1 eq) Glycopeptidhydrazid **40** werden bei -24 °C in 243.8 μL Diazotierungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 3) gelöst. Nach 1 h werden 8.1 mg (48.36 μmol, 62 eq) MMBA hinzugefügt und der pH-Wert mit 72.54 μL (93 eq) 1 M NaOH auf pH 6 eingestellt. Die Reaktion wird 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend werden 1180 μL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA zugegeben und das Rohprodukt **E2** per RP-HPLC (Säule: YMC Hydrosphere C18 (150 x 10 mm), 20 → 40 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 29 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **E2** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 2.9 mg (0.45 μmol, 58 %), weißer Feststoff,

$C_{275}H_{422}N_{60}O_{108}S_3$ (6392.89); ESI-MS: $M_{ber} = 6388.85$; $M_{gef} = 1278.18$ (M+5H)⁵⁺, 1597.38 (M+4H)⁴⁺, 2129.88 (M+3H)³⁺, 3194.32 (M+2H)²⁺.

H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Neu5Ac)₂(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-NHNH₂ **42**

(EPO 29-67 (2xSAcm, Undeca) Hydrazid **42**)

0.53 mg (84.71 nmol, 1 eq) Glycopeptid **40** werden in 62.8 μL H₂O und 101.7 μL Tris-HCl-Puffer (200 mM, pH 9) gelöst. Es werden 1.34 mg (2.03 μmol, 24 eq) CMP-Neu5Ac und 4.95 μL ST6 (*Photobacterium damsela*, 0.3 mU/μL) zugegeben (Enkonzentration an **40** =

0.5 mM) und bei 30 °C geschüttelt. Die Reaktion wird per RP-UHPLC-MS analysiert (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) und zeigt nach 23 h einen Umsatz von 93 %. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 1330 µL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH verdünnt und per RP-HPLC (Säule: YMC Hydrosphere C18 (150 x 10 mm), 20 → 40 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH, 24 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **42** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.39 mg (57.02 nmol, 67 %), weißer Feststoff,

C₂₈₉H₄₅₂N₆₄O₁₂₂S₂ (6839.24); ESI-MS: M_{ber} = 6835.06; M_{gef} = 1366.90 (M-5H)⁵⁻, 1709.44 (M-4H)⁴⁻, 2279.31 (M-3H)³⁻.

10.9 Versuche zu Kapitel 6.2

*Boc-Cys(StBu)-Leu-Leu-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-Glu(OtBu)-Ala-Val-Leu-Arg(Pbf)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Leu-Leu-Val-Asp(OAll)-Ser(tBu)-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-Gln(Trt)-Pro-Trp(Boc)-Glu(OtBu)-Pro-Leu-Gln(Trt)-Leu-His(Trt)-Val-Asp(OtBu)-Lys(TFAc)-Trt-Aminomethyl-ChemMatrix-Harz **43** (EPO 68-97 (OAll, TFAc)-Trt-CM **43**)*

Im Glasreaktor werden 411.8 mg (B_H = 0.42 mmol/g, 0.17 mmol, 1 eq) Trt-CM-Harz **2** unter Argonatmosphäre mit 7.2 mL DCM_{abs} versetzt. Es werden 800 µL AcBr zugegeben und die Mischung 3.5 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen der Lösung wird das Harz 8 x mit je 8 mL DCM_{abs} gewaschen und mit 2 mL DCM_{abs} versetzt. Unter Argon wird eine Lösung aus 394.7 mg (0.85 mmol, 5 eq) Fmoc-Lys(TFAc)-OH und 291.0 µL (1.70 mmol, 10 eq) DIPEA in 2 mL DCM_{abs} hinzugefügt und die Suspension 18 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz in eine 20 mL-Spritze überführt und 3 x mit DCM, 3 x je 2 min mit je 3.3 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) und 5 x mit DCM gewaschen. Der Beladungsgrad beträgt B_H = 0.24 mmol/g (69 %). Die Peptidelongation wird durch automatisierte Fmoc-SPPS durchgeführt. Für die Wasch- und Entschützungs-schritte wird je ein Volumen von 4 mL verwendet. Die Kupplungen erfolgen mit 0.85 mmol (5 eq) Aminosäure, 351.6 mg (0.85 mmol, 5 eq) HCTU und 4.5 mL (1.80 mmol, 10.6 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) für 45 min. Die Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Nach Kupplung von Leu-69 wird ein Beladungsgrad von B_H = 0.07 mmol/g bestimmt (64 % bezogen auf gekuppeltes Lys-97). Cys-68 wird manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierfür werden 526.1 mg (1.70 mmol, 10 eq) Boc-Cys(StBu)-OH und 145.5 µL (0.85 mmol, 5 eq)

DIC in 22 mL DMF/DCM (1:3.4) eingesetzt und für 3.5 h gekuppelt. Nach der Festphasensynthese wird das Harz **43** in eine 20 mL-Spritze überführt und im Hochvakuum getrocknet.

Tabelle 7: Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese von Harz **43**.

Position	Aminosäure	m [mg]	Aktivierungsreagenz
Asp-96	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	349.8	HCTU
Val-95	Fmoc-Val-OH	288.5	HCTU
His-94	Fmoc-His(Trt)-OH	526.7	HCTU
Leu-93	Fmoc-Leu-OH	300.4	HCTU
Gln-92	Fmoc-Gln(Trt)-OH	519.1	HCTU
Leu-91	Fmoc-Leu-OH	300.4	HCTU
Pro-90	Fmoc-Pro-OH	286.8	HCTU
Glu-89	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	361.7	HCTU
Trp-88	Fmoc-Trp(Boc)-OH	447.6	HCTU
Pro-87	Fmoc-Pro-OH	286.8	HCTU
Gln-86	Fmoc-Gln(Trt)-OH	519.1	HCTU
Ser-84, Ser-85	Fmoc-Ser(tBu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH	434.0	HCTU
Asp-83	Fmoc-Asp(OAll)-OH	336.1	HCTU
Val-82	Fmoc-Val-OH	288.5	HCTU
Leu-81	Fmoc-Leu-OH	300.4	HCTU
Leu-80	Fmoc-Leu-OH	300.4	HCTU
Ala-79	Fmoc-Ala-OH	264.6	HCTU
Gln-78	Fmoc-Gln(Trt)-OH	519.1	HCTU
Gly-77	Fmoc-Gly-OH	252.7	HCTU
Arg-76	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	551.5	HCTU
Leu-75	Fmoc-Leu-OH	300.4	HCTU
Val-74	Fmoc-Val-OH	288.5	HCTU
Ala-73	Fmoc-Ala-OH	264.6	HCTU
Glu-72	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	361.7	HCTU
Leu-70, Ser-71	Fmoc-Leu-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH	408.4	HCTU
Leu-69	Fmoc-Leu-OH	300.4	HCTU
Cys-68	Boc-Cys(StBu)-OH ^[a]	526.1	DIC

^[a]manuelle Kupplung von 10 eq Cystein als symmetrisches Anhydrid

Es wird eine analytische Abspaltung und Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Peptid **43e** per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

H-Cys(StBu)-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asp(OAll)-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(TFAc)-OH 43e

(EPO 68-97 (OAll, TFAc), entschützt 43e)

C₁₅₈H₂₅₃F₃N₄₀O₄₆S₂ (3570.11); ESI-MS: M_{ber} = 3567.81; M_{gef} = 893.84 (M+4H)⁴⁺, 1191.41 (M+3H)³⁺, 1786.75 (M+2H)²⁺.

Boc-Cys(StBu)-Leu-Leu-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-Glu(OtBu)-Ala-Val-Leu-Arg(Pbf)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Leu-Leu-Val-Asp(OAll)-Ser(tBu)-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-Gln(Trt)-Pro-Trp(Boc)-Glu(OtBu)-Pro-Leu-Gln(Trt)-Leu-His(Trt)-Val-Asp(OtBu)-Lys(TFAc)-NHNHBoc 44

(EPO 68-97 (OAll, TFAc) Boc-Hydrazid, geschützt 44)

302.0 mg (B_H = 0.07 mmol/g, 21.14 μmol, 1 eq) Peptidylharz **43** werden 10 min in 5 mL DCM vorgequollen. Es wird 10 x je 2 min mit je 10 mL 1.5 % TFA/2 % TES/DCM geschüttelt. Anschließend wird 6 x mit je 10 mL DCM gewaschen. Die Abspaltungs- und Waschlösungen werden in einem 250 mL-Kolben gesammelt, in dem pro Abspaltungsschritt jeweils 366 μL (2.14 mmol, 1.1 eq bezogen auf TFA pro Abspaltungsschritt) DIPEA vorgelegt werden. Die Lösung wird im Vakuum auf ca. 15 mL eingengt, in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt und auf 8.8 mL eingengt. Es werden 154.6 mg (1.17 mmol, 55 eq) *tert*-Butylcarbazat, 132.3 mg (0.78 mmol, 37 eq) Cl-HOBt und 121.5 μL (0.78 mmol, 37 eq) DIC zugegeben (pH 9) und die Reaktionsmischung wird 4 d geschüttelt. Anschließend werden 250 mL DCM zugegeben und die organische Phase 3 x mit je 200 mL H₂O und 50 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt **44** per Flash-Chromatographie (Kartuschengröße: 12 g, 0 → 12 % MeOH/DCM, 40 min, 28 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **44** werden im Vakuum eingengt und aus 1,4-Dioxan lyophilisiert. Es wird eine analytische Entschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Hydrazid **44e** per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 145.6 mg (26.91 μmol, > 100 %), weißer Feststoff, R_f = 0.43 (DCM/MeOH 10:1), C₂₈₄H₃₉₁F₃N₄₂O₅₄S₃ (5410.67).

H-Cys(StBu)-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asp(OAll)-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(TFAc)-NHNH₂ 44e

(EPO 68-97 (OAll, TFAc) Hydrazid, entschützt 44e)

C₁₅₈H₂₅₅F₃N₄₂O₄₅S₂ (3584.14); ESI-MS: M_{ber} = 3581.84; M_{gef} = 896.61 (M+4H)⁴⁺, 1195.13 (M+3H)³⁺, 1792.53 (M+2H)²⁺.

Boc-Cys(StBu)-Leu-Leu-Ser($\psi^{Me,Me}$ pro)-Glu(OtBu)-Ala-Val-Leu-Arg(Pbf)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Leu-Leu-Val-Asp-Ser(tBu)-Ser($\psi^{Me,Me}$ pro)-Gln(Trt)-Pro-Trp(Boc)-Glu(OtBu)-Pro-Leu-Gln(Trt)-Leu-His(Trt)-Val-Asp(OtBu)-Lys(TFAc)-NHNHBoc 45

(EPO 68-97 (OH, TFAc) Boc-Hydrazid, geschützt 45)

Im Glaskolben mit Schraubverschluss werden zu 135.0 mg (24.95 μ mol, 1 eq) Hydrazid **44** 18.7 mg (B = 0.4 mmol/g, 7.49 μ mol, 0.3 eq) PdEnCat® und 14.4 mg (44.91 μ mol, 1.8 eq) DCHT **18** gegeben und unter Argonatmosphäre mit 832 μ L 10 % MeOH_{abs}/DCM_{abs} versetzt. Es werden 46.0 μ L (374.25 μ mol, 15 eq) PhSiH₃ hinzugefügt und die Suspension wird 20 h geschüttelt. Anschließend werden die Katalysatorkügelchen abfiltriert und mit insgesamt 40 mL 10 % MeOH/DCM und 40 mL DCM und gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt **45** per Flash-Chromatographie (Kartuschengröße: 12 g, 0 \rightarrow 25 % MeOH/DCM, 35 min, 25 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt **45** werden im Vakuum eingengt und aus 1,4-Dioxan lyophilisiert. Es wird eine analytische Testentschützung mit TFA/TES/H₂O (96:2:2) durchgeführt und das Hydrazid **45e** per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 \rightarrow 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 122.6 mg (22.83 μ mol, 92 %), weißer Feststoff, R_f = 0.41 (DCM/MeOH 10:1), C₂₈₁H₃₈₇F₃N₄₂O₅₄S₃ (5370.60).

H-Cys(StBu)-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asp-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(TFAc)-NHNH₂ 45e

(EPO 68-97 (OH, TFAc) Hydrazid, entschützt 45e)

C₁₅₅H₂₅₁F₃N₄₂O₄₅S₂ (3544.08); ESI-MS: M_{ber} = 3541.80; M_{gef} = 886.54 (M+4H)⁴⁺, 1181.29 (M+3H)³⁺, 1771.52 (M+2H)²⁺.

H-Cys(StBu)-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(TFAc)-NHNH₂ F2

(EPO 68-97 (Nona, TFAc) Hydrazid F2)

35.1 mg (6.54 μmol , 1 eq) Hydrazid **45** werden in 327 μL DMSO/DMF (1:1) gelöst und 11.2 μL (65.4 μmol , 10 eq) DIPEA, 6.2 mg (16.35 μmol , 2.5 eq) HATU und 2.2 mg (16.35 μmol , 2.5 eq) HOAt hinzugefügt. 16.1 mg (9.81 μmol , 1.5 eq) frisch reduziertes Nona-NH₂ **7** werden zugegeben (pH 8) und 20 h bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 7 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum wird das Glycopeptid **F2** durch Zugabe von 14 mL eiskaltem Diethylether 20 min bei -24 °C ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Nach Trocknung wird das Rohprodukt **F2** in 4 mL 40 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und per RP-HPLC (Säule: YMC-Pack Pro C8 (250 x 20 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 79 min, 8 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt **F2** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 9.3 mg (1.80 μmol , 28 %), weißer Feststoff,

C₂₁₇H₃₅₄F₃N₄₇O₈₉S₂ (5166.57); ESI-MS: M_{ber} = 5163.40; M_{gef} = 1721.38 (M+3H)³⁺, 2581.19 (M+2H)²⁺.

H-Cys(StBu)-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-

*Asn[(Neu5Ac)₂(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(TFAc)-NHNH₂ **46***

(EPO 68-97 (Undeca, TFAc) Hydrazid 46)

2.9 mg (0.56 μmol , 1 eq) Glycopeptid **F2** werden in 79.3 μL H₂O und 168 μL Tris-HCl-Puffer (200 mM, pH 9) gelöst. Es werden 4.4 mg (6.72 μmol , 12 eq) CMP-Neu5Ac und 32.7 μL ST6 (*Photobacterium damsela*, 1.2 mU/ μL) zugegeben (Enkonzentration an **F2** = 2 mM) und die Mischung wird bei 30 °C geschüttelt. Die Reaktion wird per RP-UHPLC-MS analysiert (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) und zeigt nach 3 h einen Umsatz von 92 %. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 1 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH verdünnt und per RP-HPLC (Säule: YMC Hydrosphere C18 (150 x 10 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % HCOOH, 29 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **46** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 1.8 mg (0.31 μmol , 55 %), weißer Feststoff,

C₂₃₉H₃₈₈F₃N₄₉O₁₀₅S₂ (5749.09); ESI-MS: M_{ber} = 5745.59; M_{gef} = 1436.52 (M-4H)⁴⁺, 1915.80 (M-3H)³⁻.

10.10 Versuche zu Kapitel 6.3

H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Cys-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(TFAc)-NHNH₂ 47
(EPO 29-97 (2xSAcm, 2xNona, TFAc) Hydrazid 47)

In einer anaeroben Glovebox werden 2.9 mg (0.45 µmol, 1 eq) Thioester **E2** und 2.6 mg (0.50 µmol, 1.1 eq) Hydrazid **F2** in 123.0 µL Ligationpuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 15 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.9) gelöst. Nach 3 d werden 1.9 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) zugegeben. Nach 2 h wird mit 1377 µL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 20 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 39 min, 3 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **47** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B II, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 4.0 mg (0.35 µmol, 78 %), weißer Feststoff,

C₄₈₀H₇₆₀F₃N₁₀₇O₁₉₅S₃ (11303.09); ESI-MS: M_{ber} = 11296.20; M_{gef} = 1615.52 (M+7H)⁷⁺, 1884.66 (M+6H)⁶⁺, 2261.16 (M+5H)⁵⁺, 2826.45 (M+4H)⁴⁺, 3767.88 (M+3H)³⁺.

H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Cys-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(TFAc)-SCH₂C₆H₄COOH 48
(EPO 29-97 (2xSAcm, 2xNona, TFAc) MMBA 48)

4.0 mg (0.35 µmol, 1 eq) Hydrazid **47** werden bei -24 °C in 109.4 µL Diazotierungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 3) gelöst. Nach 1 h werden 3.6 mg (21.70 µmol, 62 eq) MMBA hinzugefügt und der pH-Wert mit 32.55 µL (93 eq) 1 M NaOH

auf pH 6 eingestellt. Nach 1 h bei RT werden 1360 μL 40 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA zugegeben und das Rohprodukt **48** per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 20 \rightarrow 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 39 min, 3 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **48** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B II, 20 \rightarrow 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 3.2 mg (0.28 μmol , 80 %), weißer Feststoff,

C₄₈₈H₇₆₄F₃N₁₀₅O₁₉₇S₄ (11439.25); ESI-MS: M_{ber} = 11432.18; M_{gef} = 1633.64 (M+7H)⁷⁺, 1906.00 (M+6H)⁶⁺, 2287.00 (M+5H)⁵⁺, 2858.88 (M+4H)⁴⁺, 3810.49 (M+3H)³⁺.

10.11 Versuche zu Kapitel 6.4

*Boc-Cys(StBu)-Pro-Leu-Arg(Pbf)-Thr(tBu)-Ile-Thr(tBu)-Ala-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Phe-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Arg(Pbf)-Val-Tyr(tBu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Asn(Dmcp)-Phe-Leu-Arg(Pbf)-Gly-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-Gly-Glu(OtBu)-Ala-Cys(Phacm)-Arg(Pbf)-Thr(tBu)-Gly-Asp(OtBu)-Arg(Pbf)-Trt-Aminomethyl-ChemMatrix-Harz **49***

*(EPO 128-166 (SPhacm)-Trt-CM **49**)*

Im Glasreaktor werden 324.4 mg ($B_{\text{H}} = 0.42$ mmol/g, 0.14 mmol, 1 eq) Trt-CM-Harz **2** unter Argonatmosphäre mit 6.3 mL DCM_{abs} 5 min vorgequollen. Es werden 700 μL AcBr zugegeben und die Mischung 3 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen der Lösung wird das Harz 8 x mit je 7 mL DCM_{abs} gewaschen und mit 2 mL DCM_{abs} versetzt. Unter Argon wird eine Lösung aus 454.2 mg (0.70 mmol, 5 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-OH und 239.7 μL (1.40 mmol, 10 eq) DIPEA in 2 mL DCM_{abs} hinzugefügt und die Suspension 18 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz in eine 20 mL-Spritze überführt und 3 x mit DCM, 3 x je 2 min mit je 3.3 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) und 5 x mit DCM gewaschen. Der Beladungsgrad beträgt $B_{\text{H}} = 0.27$ mmol/g (82 %). Die Peptidelongation wird durch automatisierte Fmoc-SPPS durchgeführt. Für die Wasch- und Entschützungs-schritte wird je ein Volumen von 3 mL verwendet. Die im Folgenden verwendeten Äquivalente beziehen sich auf $B_{\text{H}} = 0.27$ mmol/g. Die Kupplungen erfolgen mit 0.45 mmol (5 eq) Aminosäure, 186.2 mg (0.45 mmol, 5 eq) HCTU und 2.0 mL (0.80 mmol, 8.9 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) und 1 mL DMF für 45 min. Cys-161 und 128 werden manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierfür werden 441.5 mg (0.90 mmol, 10 eq) Fmoc-Cys(Phacm)-OH bzw. 278.5 mg (0.90 mmol, 10 eq) Boc-Cys(StBu)-OH und 70.0 μL (0.45 mmol, 5 eq) DIC in 14 mL

DMF/DCM (1:2.5) eingesetzt und für 4 h gekuppelt. Die Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Nach Kupplung von Pro-129 wird ein Beladungsgrad von $B_H = 0.08$ mmol/g bestimmt (80 % bezogen auf gekuppeltes Arg-166). Nach der Festphasensynthese wird das Harz **49** in eine 20 mL-Spritze überführt und im Hochvakuum getrocknet.

Tabelle 8: Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese von Harz **49**.

Position	Aminosäure	m [mg]	Aktivierungsreagenz
Asp-165	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	185.2	HCTU
Gly-164	Fmoc-Gly-OH	133.8	HCTU
Thr-163	Fmoc-Thr(tBu)-OH	178.9	HCTU
Arg-162	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	292.0	HCTU
Cys-161	Fmoc-Cys(Phacm)-OH ^[a]	441.5	DIC
Ala-160	Fmoc-Ala-OH	140.1	HCTU
Glu-159	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	191.5	HCTU
Gly-158	Fmoc-Gly-OH	133.8	HCTU
Tyr-156, Thr-157	Fmoc-Tyr(tBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	270.3	HCTU
Leu-155	Fmoc-Leu-OH	159.0	HCTU
Lys-154	Fmoc-Lys(Boc)-OH	210.8	HCTU
Leu-153	Fmoc-Leu-OH	159.0	HCTU
Lys-152	Fmoc-Lys(Boc)-OH	210.8	HCTU
Gly-151	Fmoc-Gly-OH	133.8	HCTU
Arg-150	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	292.0	HCTU
Leu-149	Fmoc-Leu-OH	159.0	HCTU
Phe-148	Fmoc-Phe-OH	174.3	HCTU
Asn-147	Fmoc-Asn(Dmcp)-OH	196.4	HCTU
Tyr-145, Ser-146	Fmoc-Tyr(tBu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	264.0	HCTU
Val-144	Fmoc-Val-OH	152.7	HCTU
Arg-143	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	292.0	HCTU
Phe-142	Fmoc-Phe-OH	174.3	HCTU
Leu-141	Fmoc-Leu-OH	159.0	HCTU
Lys-140	Fmoc-Lys(Boc)-OH	210.8	HCTU
Arg-139	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	292.0	HCTU
Phe-138	Fmoc-Phe-OH	174.3	HCTU

Asp-136, Thr-137	Fmoc-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-OH	248.5	HCTU
Ala-135	Fmoc-Ala-OH	140.1	HCTU
Thr-134	Fmoc-Thr(tBu)-OH	178.9	HCTU
Ile-133	Fmoc-Ile-OH	159.0	HCTU
Thr-132	Fmoc-Thr(tBu)-OH	178.9	HCTU
Arg-131	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	292.0	HCTU
Leu-130	Fmoc-Leu-OH	159.0	HCTU
Pro-129	Fmoc-Pro-OH	151.8	HCTU
Cys-128	Boc-Cys(StBu)-OH ^[a]	278.5	DIC

^[a] manuelle Kupplung von 10 eq Cystein als symmetrisches Anhydrid

H-Cys(StBu)-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Phacm)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH **H3**

(EPO 128-166 (SPhacm) **H3**)

101.2 mg ($B_H = 0.08$ mmol/g, 8.10 μmol , 1 eq) Peptidylharz **49** werden 5 min in 5 mL DCM vorgequollen. Anschließend wird 2 h mit 7 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) entschützt und danach 3 x mit je 1 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) je 10 min gewaschen. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum erfolgt die Fällung mit 13 mL eiskaltem Diethylether bei -24 °C für 20 min. Der entstandene Feststoff wird abzentrifugiert und zweimal durch Wiederholung dieses Prozesses gewaschen. Der Überstand wird jeweils dekantiert. Nach Trocknung und Lösen in 6 mL 30 % MeCN/H₂O erfolgt die Reinigung in 2 Portionen per RP-HPLC (Säule: YMC-Pack Pro C8 (250 x 20 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 49 min, 8 mL/min). Die Fraktionen mit dem Produkt **H3** werden lyophilisiert und per RP-HPLC-MS (Säule: A I, 10 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 22.7 mg (4.73 μmol , 58 %), weißer Feststoff,

C₂₁₆H₃₄₆N₆₂O₅₆S₃ (4803.70); ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 4800.53$; $M_{\text{gef}} = 601.35$ (M+8H)⁸⁺, 686.96 (M+7H)⁷⁺, 801.37 (M+6H)⁶⁺, 961.69 (M+5H)⁵⁺, 1201.86 (M+4H)⁴⁺, 1602.35 (M+3H)³⁺, 2402.66 (M+2H)²⁺.

Boc-Cys(StBu)-Pro-Leu-Arg(Pbf)-Thr(tBu)-Ile-Thr(tBu)-Ala-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-Phe-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Leu-Phe-Arg(Pbf)-Val-Tyr(tBu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-Asn(Dmcp)-Phe-Leu-Arg(Pbf)-Gly-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-Gly-Glu(OtBu)-Ala-

Cys(Acm)-Arg(Pbf)-Thr(tBu)-Gly-Asp(OtBu)-Arg(Pbf)-Trt-Aminomethyl-ChemMatrix-Harz
50

(EPO 128-166 (SAcm)-Trt-CM 50)

Im Glasreaktor werden 414.8 mg ($B_H = 0.30$ mmol/g, 0.12 mmol, 1 eq) Trt-CM-Harz **2** unter Argonatmosphäre mit 7.2 mL DCM_{abs} 5 min vorgequollen. Es werden 800 μ L AcBr zugegeben und die Mischung 3 h bei RT geschüttelt. Nach Absaugen der Lösung wird das Harz 8 x mit je 8 mL DCM_{abs} gewaschen und mit 2 mL DCM_{abs} versetzt. Unter Argon wird eine Lösung aus 389.3 mg (0.60 mmol, 5 eq) Fmoc-Arg(Pbf)-OH und 205.4 μ L (1.20 mmol, 10 eq) DIPEA in 2 mL DCM_{abs} hinzugefügt und die Suspension 18 h geschüttelt. Anschließend wird das Harz in eine 20 mL-Spritze überführt und 3 x mit DCM, 3 x je 2 min mit je 3.3 mL DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) und 5 x mit DCM gewaschen. Der Beladungsgrad beträgt $B_H = 0.21$ mmol/g (84 %). Die Peptidelongation wird durch automatisierte Fmoc-SPPS durchgeführt. Für die Wasch- und Entschützungs-schritte wird je ein Volumen von 4 mL verwendet. Die Kupplungen erfolgen mit 0.60 mmol (5 eq) Aminosäure, 248.2 mg (0.60 mmol, 5 eq) HCTU und 3.0 mL (1.20 mmol, 10 eq) DIPEA (0.4 M in DMF) und 1 mL DMF für 45 min. Cys-161 und 128 werden manuell als symmetrisches Anhydrid gekuppelt. Hierfür werden 497.4 mg (1.20 mmol, 10 eq) Fmoc-Cys(Acm)-OH bzw. 371.3 mg (1.20 mmol, 10 eq) Boc-Cys(StBu)-OH und 93.3 μ L (0.60 mmol, 5 eq) DIC in 22 mL DMF/DCM (1:4.5) eingesetzt und für 3.5 h gekuppelt. Die Kupplungsbedingungen sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Nach Kupplung von Pro-129 wird ein Beladungsgrad von $B_H = 0.06$ mmol/g bestimmt (67 % bezogen auf gekuppeltes Arg-166). Nach der Festphasensynthese wird das Harz **50** in eine 20 mL-Spritze überführt und im Hochvakuum getrocknet.

Tabelle 9: Kupplungsbedingungen für die Festphasensynthese von Harz **50**.

Position	Aminosäure	m [mg]	Aktivierungsreagenz
Asp-165	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	246.9	HCTU
Gly-164	Fmoc-Gly-OH	178.4	HCTU
Thr-163	Fmoc-Thr(tBu)-OH	238.5	HCTU
Arg-162	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	389.3	HCTU
Cys-161	Fmoc-Cys(Acm)-OH ^[a]	497.4	DIC
Ala-160	Fmoc-Ala-OH	186.8	HCTU
Glu-159	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	255.3	HCTU

Experimenteller Teil

Gly-158	Fmoc-Gly-OH	178.4	HCTU
Tyr-156, Thr-157	Fmoc-Tyr(tBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	360.4	HCTU
Leu-155	Fmoc-Leu-OH	212.0	HCTU
Lys-154	Fmoc-Lys(Boc)-OH	281.1	HCTU
Leu-153	Fmoc-Leu-OH	212.0	HCTU
Lys-152	Fmoc-Lys(Boc)-OH	281.1	HCTU
Gly-151	Fmoc-Gly-OH	178.4	HCTU
Arg-150	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	389.3	HCTU
Leu-149	Fmoc-Leu-OH	212.0	HCTU
Phe-148	Fmoc-Phe-OH	232.4	HCTU
Asn-147	Fmoc-Asn(Dmcp)-OH	261.9	HCTU
Tyr-145, Ser-146	Fmoc-Tyr(tBu)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	352.0	HCTU
Val-144	Fmoc-Val-OH	203.6	HCTU
Arg-143	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	389.3	HCTU
Phe-142	Fmoc-Phe-OH	232.4	HCTU
Leu-141	Fmoc-Leu-OH	212.0	HCTU
Lys-140	Fmoc-Lys(Boc)-OH	281.1	HCTU
Arg-139	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	389.3	HCTU
Phe-138	Fmoc-Phe-OH	232.4	HCTU
Asp-136, Thr-137	Fmoc-Asp(OtBu)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	331.3	HCTU
Ala-135	Fmoc-Ala-OH	186.8	HCTU
Thr-134	Fmoc-Thr(tBu)-OH	238.5	HCTU
Ile-133	Fmoc-Ile-OH	212.0	HCTU
Thr-132	Fmoc-Thr(tBu)-OH	238.5	HCTU
Arg-131	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	389.3	HCTU
Leu-130	Fmoc-Leu-OH	212.0	HCTU
Pro-129	Fmoc-Pro-OH	202.4	HCTU
Cys-128	Boc-Cys(StBu)-OH ^[a]	371.3	DIC

^[a] manuelle Kupplung von 10 eq Cystein als symmetrisches Anhydrid

H-Cys(StBu)-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Acm)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH H2
(EPO 128-166 (SAcM) H2)

102.6 mg ($B_H = 0.06$ mmol/g, 6.16 μ mol, 1 eq) Peptidylharz **50** werden 5 min in 5 mL DCM vorgequollen. Anschließend wird 2 h mit 7 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) entschützt und danach 3 x mit je 1 mL TFA/TES/H₂O (96:2:2) je 10 min gewaschen. Nach Einengen der Lösung im Hochvakuum erfolgt die Fällung mit 13 mL eiskaltem Diethylether bei -24 °C für 20 min. Der entstandene Feststoff wird abzentrifugiert und zweimal durch Wiederholung dieses Prozesses gewaschen. Der Überstand wird jeweils dekantiert. Nach Trocknung und Lösen in 4 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA erfolgt die Reinigung per RP-HPLC (Säule: YMC-Pack Pro C8 (250 x 20 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 79 min, 8 mL/min). Die Fraktionen mit dem Produkt **H2** werden lyophilisiert und per RP-HPLC-MS (Säule: B I, 10 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 24.8 mg (5.25 μ mol, 85 %), weißer Feststoff,

C₂₁₀H₃₄₂N₆₂O₅₆S₃ (4727.60); ESI-MS: $M_{ber} = 4724.50$; $M_{gef} = 591.76$ (M+8H)⁸⁺, 675.85 (M+7H)⁷⁺, 788.42 (M+6H)⁶⁺, 945.93 (M+5H)⁵⁺, 1182.19 (M+4H)⁴⁺, 1576.19 (M+3H)³⁺, 2360.00 (M+2H)²⁺.

H-Thz-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Cys-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Phacm)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH 51

(EPO 98-166 (Thz, SPhacm) 51)

In einer anaeroben Glovebox werden 3.4 mg (1.08 μ mol, 1.2 eq) Thioester **G** in 115 μ L Ligationspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 5 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.9) 25 min inkubiert. Die Lösung wird anschließend zu 4.3 mg (0.90 μ mol, 1 eq) Peptidfragment **H3** gegeben und 100 μ L Ligationspuffer hinzugefügt. Nach 6 d werden 3.2 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) DTT zugegeben. Nach 26 h wird die Mischung mit 900 μ L 50 % MeCN/H₂O verdünnt und per Gelpermeationschromatographie (Säule: Superdex® Peptide 10/300 GL, 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 1 mL/min) gereinigt. Nach Gefriertrocknung wird das Ligationsprodukt **51** in 1.5 mL 30 % MeCN/H₂O gelöst und per RP-HPLC (Supelco Ascentis C18 (250 x 10 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 50 min, 4 mL/min) gereinigt. Nach Gefriertrocknung und Lösen in 1 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA erfolgt eine erneute Reinigung per RP-HPLC (Supelco Ascentis C18 (250 x 10 mm), 20 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 50 min, 4 mL/min). Die Produktfraktionen **51** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: A I, 20 → 70 % B, 25 min, 0.2 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 3.7 mg (0.48 μmol , 53 %), weißer Feststoff,

$\text{C}_{341}\text{H}_{558}\text{N}_{100}\text{O}_{97}\text{S}_3$ (7707.00); ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 7702.10$; $M_{\text{gef}} = 701.52$ ($M+11\text{H}$)¹¹⁺, 771.40 ($M+10\text{H}$)¹⁰⁺, 856.93 ($M+9\text{H}$)⁹⁺, 963.99 ($M+8\text{H}$)⁸⁺, 1101.75 ($M+7\text{H}$)⁷⁺, 1285.21 ($M+6\text{H}$)⁶⁺, 1542.21 ($M+5\text{H}$)⁵⁺, 1927.45 ($M+4\text{H}$)⁴⁺, 2569.74 ($M+3\text{H}$)³⁺.

H-Cys-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Cys-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Acm)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH 53

(EPO 98-166 (S_{Acm}) 53)

In einer anaeroben Glovebox werden 4.4 mg (1.39 μmol , 1.2 eq) Thioester **G** in 175 μL Ligationpuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH_2PO_4 , 15 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.9) 25 min inkubiert. Die Lösung wird anschließend zu 5.5 mg (1.16 μmol , 1 eq) Peptidfragment **H2** gegeben und 100 μL Ligationpuffer hinzugefügt. Nach 3 d werden 4.2 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) zugegeben. Nach 2 h wird die Mischung mit 1 mL 20 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA verdünnt und lyophilisiert. Anschließend wird das Ligationsprodukt **52** in einer anaeroben Glovebox mit 1.76 mL Entschützungspuffer (6 M GdmCl, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.2 M MeONH₂, pH 3.3) versetzt. Nach 21 h werden 27.1 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) zugegeben. Nach 2.5 h wird die Mischung mit 1 mL 30 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA verdünnt und per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 20 \rightarrow 50 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA, 39 min, 3 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit der Zielverbindung **53** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B II, 10 \rightarrow 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 6.9 mg (0.91 μmol , 78 %), weißer Feststoff,

$\text{C}_{334}\text{H}_{554}\text{N}_{100}\text{O}_{97}\text{S}_3$ (7618.89); ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 7614.07$; $M_{\text{gef}} = 693.62$ ($M+11\text{H}$)¹¹⁺, 762.82 ($M+10\text{H}$)¹⁰⁺, 847.41 ($M+9\text{H}$)⁹⁺, 953.28 ($M+8\text{H}$)⁸⁺, 1089.28 ($M+7\text{H}$)⁷⁺, 1270.77 ($M+6\text{H}$)⁶⁺, 1524.80 ($M+5\text{H}$)⁵⁺, 1905.80 ($M+4\text{H}$)⁴⁺, 2540.82 ($M+3\text{H}$)³⁺, 3811.08 ($M+2\text{H}$)²⁺.

H-Cys-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Cys-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH 54

(EPO 98-166 (2xSH) 54)

a) ausgehend von 51, Verwendung von 7.5 eq PdCl₂

1.7 mg Pd^{II}Cl₂ werden in 544 µL H₂O suspendiert und 1 d bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Anschließend wird der Feststoff abzentrifugiert und 8.3 µL des braunen Überstands (25.9 µg Pd^{II}Cl₂, 145.95 nmol, 7.5 eq) zu einer Lösung von 0.15 mg (19.46 nmol, 1 eq) Peptid **51** in 35.0 µL H₂O gegeben. Die gelbe Lösung wird bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Die Reaktion wird per RP-UHPLC-MS (Überstand nach DTT-Zugabe und Pelletieren; Säule: B II, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert. Vollständiger Umsatz ist nach 5 min erreicht.

C₃₃₁H₅₄₉N₉₉O₉₆S₃ (7547.81); ESI-MS: M_{ber} = 7543.03; M_{gef} = 756.02 (M+10H)¹⁰⁺, 839.73 (M+9H)⁹⁺, 944.55 (M+8H)⁸⁺, 1079.59 (M+7H)⁷⁺, 1259.29 (M+6H)⁶⁺, 1510.94 (M+5H)⁵⁺, 1888.70 (M+4H)⁴⁺.

H-Thz-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Cys-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH 54Thz

(EPO 98-166 (Thz, SH) 54Thz)

C₃₃₂H₅₄₉N₉₉O₉₆S₃ (7559.82); ESI-MS: M_{ber} = 7555.03; M_{gef} = 756.98 (M+10H)¹⁰⁺, 840.96 (M+9H)⁹⁺, 946.02 (M+8H)⁸⁺, 1081.11 (M+7H)⁷⁺, 1261.15 (M+6H)⁶⁺, 1513.41 (M+5H)⁵⁺, 1891.39 (M+4H)⁴⁺, 2521.67 (M+3H)³⁺.

b) ausgehend von 51, Verwendung von 15 eq PdCl₂

1.7 mg Pd^{II}Cl₂ werden in 544 µL H₂O suspendiert und 1 d bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Anschließend wird der Feststoff abzentrifugiert und 12.2 µL des braunen Überstands (38.0 µg Pd^{II}Cl₂, 214.05 nmol, 15 eq) zu einer Lösung von 0.11 mg (14.27 nmol, 1 eq) Peptid **51** in 19.6 µL H₂O gegeben. Die gelbe Lösung wird bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Die Reaktion wird per RP-UHPLC-MS (Überstand nach DTT-Zugabe und Pelletieren; Säule: B II, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert. Vollständiger Umsatz ist nach 5 min erreicht.

C₃₃₁H₅₄₉N₉₉O₉₆S₃ (7547.81); ESI-MS: M_{ber} = 7543.03; M_{gef} = 755.94 (M+10H)¹⁰⁺, 839.75 (M+9H)⁹⁺, 944.66 (M+8H)⁸⁺, 1079.65 (M+7H)⁷⁺, 1259.43 (M+6H)⁶⁺, 1510.91 (M+5H)⁵⁺, 1888.34 (M+4H)⁴⁺.

H-Thz-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-

Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Cys-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH 54Thz

(EPO 98-166 (Thz, SH) 54Thz)

C₃₃₂H₅₄₉N₉₉O₉₆S₃ (7559.82); ESI-MS: M_{ber} = 7555.03; M_{gef} = 757.06 (M+10H)¹⁰⁺, 841.01 (M+9H)⁹⁺, 946.16 (M+8H)⁸⁺, 1081.09 (M+7H)⁷⁺, 1261.31 (M+6H)⁶⁺, 1513.20 (M+5H)⁵⁺, 1891.41 (M+4H)⁴⁺, 2521.61 (M+3H)³⁺.

c) ausgehend von **53**, Verwendung von 7.5 eq PdCl₂

1.8 mg Pd^{II}Cl₂ werden in 576 µL H₂O suspendiert und 1 d bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Anschließend wird der Feststoff abzentrifugiert und 5.6 µL des braunen Überstands (17.5 µg Pd^{II}Cl₂, 98.48 nmol, 7.5 eq) zu einer Lösung von 0.10 mg (13.13 nmol, 1 eq) Peptid **53** in 23.6 µL H₂O gegeben. Die gelbe Lösung wird bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Die Reaktion wird per RP-UHPLC-MS (Überstand nach DTT-Zugabe und Pelletieren; Säule: B II, 10 → 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert. Vollständiger Umsatz ist nach 5 min erreicht.

C₃₃₁H₅₄₉N₉₉O₉₆S₃ (7547.81); ESI-MS: M_{ber} = 7543.03; M_{gef} = 755.79. (M+10H)¹⁰⁺, 839.59 (M+9H)⁹⁺, 944.52 (M+8H)⁸⁺, 1079.33 (M+7H)⁷⁺, 1259.03 (M+6H)⁶⁺, 1510.71 (M+5H)⁵⁺, 1888.12 (M+4H)⁴⁺, 2516.93 (M+3H)³⁺.

10.12 Versuche zu Kapitel 6.5

H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Cys-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-

Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(TFAc)-Cys-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Cys-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Acm)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH 55

(EPO 29-166 (3xSAcm, 2xNona, 3xSH, TFAc) 55)

In einer anaeroben Glovebox werden 3.2 mg (0.28 µmol, 1 eq) Thioester **48** und 2.6 mg

(0.34 μmol , 1.2 eq) Peptidfragment **54** in 76.5 μL Ligationspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH_2PO_4 , 15 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.9) gelöst. Nach 3 d werden 1.2 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) zugegeben. Nach 4 h wird die Mischung mit 1423 μL 40 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA verdünnt und per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 30 \rightarrow 60 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA, 39 min, 3 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **55** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 \rightarrow 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 3.6 mg (0.19 μmol , 68 %), weißer Feststoff,

$\text{C}_{814}\text{H}_{1310}\text{F}_3\text{N}_{205}\text{O}_{292}\text{S}_6$ (18889.93); ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 18878.22$; $M_{\text{gef}} = 1261.27$ (M+15H)¹⁵⁺, 1351.24 (M+14H)¹⁴⁺, 1455.04 (M+13H)¹³⁺, 1576.36 (M+12H)¹²⁺, 1719.47 (M+11H)¹¹⁺, 1891.37 (M+10H)¹⁰⁺, 2101.42 (M+9H)⁹⁺, 2363.90 (M+8H)⁸⁺, 2701.18 (M+7H)⁷⁺, 3151.92 (M+6H)⁶⁺, 3780.28 (M+5H)⁵⁺.

*H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(TFAc)-Ala-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Acm)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH **57***
(EPO 29-166 (3xSAcm, 2xNona, 3xCH₃, TFAc) **57**)

In einer anaeroben Glovebox werden zu 2.0 mg (105.88 nmol, 1 eq) Ligationsprodukt **55** 423.5 μL Entschwefelungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH_2PO_4 , 0.9 M TCEP, 0.6 M MESNa, 15 mM VA-044 **56**, pH 7) gegeben und die Mischung wird 24 h bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Nach Reaktionsende wird das Gemisch mit 635 μL 30 % MeCN/ H_2O + 11.1 % TFA versetzt und in 3 Portionen per RP-HPLC (Säule: Supelco Discovery® BIO Wide Pore C5 (150 x 4.6 mm), 30 \rightarrow 60 % MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA, 25 min, 1 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit der Zielverbindung **57** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 \rightarrow 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 1.6 mg (85.13 nmol, 80 %), weißer Feststoff,

C₈₁₄H₁₃₁₀F₃N₂₀₅O₂₉₂S₃ (18793.75); ESI-MS: M_{ber} = 18782.31; M_{gef} = 1255.53 (M+15H)¹⁵⁺, 1344.91 (M+14H)¹⁴⁺, 1448.27 (M+13H)¹³⁺, 1568.91 (M+12H)¹²⁺, 1711.26 (M+11H)¹¹⁺, 1882.42 (M+10H)¹⁰⁺, 2091.43 (M+9H)⁹⁺, 2352.91 (M+8H)⁸⁺, 2688.37 (M+7H)⁷⁺, 3136.97 (M+6H)⁶⁺, 3762.55 (M+5H)⁵⁺.

H-Cys-Ala-Glu-His-Cys-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys(TFAc)-Ala-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH **58**

(EPO 29-166 (3xSH, 2xNona, 3xCH₃, TFAc) **58**)

1.5 mg Pd^{II}Cl₂ werden in 480 µL H₂O suspendiert und 1 d bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Anschließend wird der Feststoff abzentrifugiert und 12.7 µL des braunen Überstands (39.6 µg Pd^{II}Cl₂, 223.50 nmol, 15 eq) zu einer Lösung von 0.28 mg (14.90 nmol, 1 eq) Peptid **57** in 20.4 µL H₂O gegeben. Die gelbe Lösung wird für 5 min bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Anschließend werden 30 mg DTT und danach 316 µL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA zugegeben. Nach Pelletieren bei 30000 rpm für 10 min wird der Überstand per RP-HPLC (Säule: Supelco Discovery® BIO Wide Pore C5 (150 x 4.6 mm), 30 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 25 min, 1 mL/min) gereinigt. Die Fraktion mit dem Produkt **58** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.27 mg (14.53 nmol, 98 %), weißer Feststoff,

C₈₀₅H₁₂₉₅F₃N₂₀₂O₂₈₉S₃ (18580.52); ESI-MS: M_{ber} = 18569.20; M_{gef} = 1431.71 (M+13H)¹³⁺, 1550.23 (M+12H)¹²⁺, 1691.18 (M+11H)¹¹⁺, 1860.30 (M+10H)¹⁰⁺, 2066.96 (M+9H)⁹⁺, 2324.94 (M+8H)⁸⁺, 2657.49 (M+7H)⁷⁺.

H-Cys-Ala-Glu-His-Cys-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-

Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH **59**

(EPO 29-166 (3xSH, 2xNona, 3xCH₃) **59**)

0.20 mg (10.76 nmol, 1 eq) Peptid **58** werden mit 76.86 µL 40 mM NaOH versetzt (pH 13) Nach 30 min wird mit 0.5 µL TFA angesäuert (pH 1). Nach Gefriertrocknung wird der Rückstand in 350 µL 40 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und per RP-HPLC (Säule: Supelco Discovery® BIO Wide Pore C5 (150 x 4.6 mm), 40 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 37 min, 1 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **59** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 0.14 mg (7.57 nmol, 70 %), weißer Feststoff,

C₈₀₃H₁₂₉₆N₂₀₂O₂₈₈S₃ (18484.51); ESI-MS: M_{ber} = 18473.21; M_{gef} = 1544.09 (M+12H)¹²⁺, 1684.44 (M+11H)¹¹⁺, 1852.38 (M+10H)¹⁰⁺, 2058.45 (M+9H)⁹⁺, 2315.77 (M+8H)⁸⁺.

10.13 Versuche zu Kapitel 6.6

H-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Thr-Gly-Cys-Ala-Glu-His-Cys-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH **D**

(EPO (3xNona) **D**)

*Ligation zu EPO 1-166 (3xNona) **D**^{red}*

In einer anaeroben Glovebox werden 0.15 mg (31.17 nmol, 1.6 eq) Glycopeptidthioester **B2** und 0.36 mg (19.48 nmol, 1 eq) Glycopeptid **59** in 7.79 µL Ligationspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 15 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.9) gelöst (Endkonzentration an **59** =

2.5 mM). Nach 3 d werden nochmals 1.6 eq **B2** zugegeben und 1 d inkubiert. Die Reaktion wird per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert.

$C_{1002}H_{1625}N_{245}O_{376}S_4$ (23248.60), ESI-MS: $M_{ber} = 23234.44$; $M_{gef} = 1145.4774$ (M+18H)¹⁸⁺, 1212.6229 (M+17H)¹⁷⁺, 1460.29 (M+16H)¹⁶⁺, 1557.65 (M+15H)¹⁵⁺, 1668.81 (M+14H)¹⁴⁺, 1797.18 (M+13H)¹³⁺, 1946.90 (M+12H)¹²⁺, 2123.54 (M+11H)¹¹⁺, 2335.89 (M+10H)¹⁰⁺, 2595.35 (M+9H)⁹⁺, 2919.77 (M+8H)⁸⁺, 3337.42 (M+7H)⁷⁺, 3892.71 (M+6H)⁶⁺.

Rückfaltung und Oxidation zu EPO (3xNona) D

Alle verwendeten Puffer werden nach Filtration eingesetzt. Nach 4 d wird die Ligationsmischung in der anaeroben Glovebox mit 1.94 mL Verdünnungspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 M DTT, pH 7.5) auf 0.01 mM (bezogen auf **59**) verdünnt und in einen Dialyseschlauch überführt. Es wird 22 h gegen 0.5 L Reduktionspuffer (4 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M DTT, pH 8.5) anaerob dialysiert. Alle weiteren Dialysen erfolgen unter aeroben Bedingungen bei 4 °C. Nach der Dialyse gegen 0.2 L Oxidationspuffer (3 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 4 µM Cys, 0.5 µM Cystin, pH 8.5) für 23 h wird gegen 0.5 L Rückfaltungspuffer 1 (1 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, pH 8) für 19 h und 3 x gegen je 0.5 L Rückfaltungspuffer 2 (0.05 M NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.5) für 25 h und 2 x je 23 h dialysiert. Anschließend wird das Dialysat in der Ultrafiltrationszelle auf ca. 1.4 mL konzentriert. Es folgt die Reinigung per Gelpermeationschromatographie (HiLoad™ 16/600 Superdex 75 prep grade, Rückfaltungspuffer 2, 1 mL/min). Die Monomerenfraktion **D** wird auf ca. 350 µL konzentriert, per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert und per RP-HPLC (Säule: Supelco Discovery® BIO Wide Pore C5 (150 x 4.6 mm), 30 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 25 min, 1 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **D** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert.

$C_{1002}H_{1621}N_{245}O_{376}S_4$ (23244.57), ESI-MS: $M_{ber} = 23230.41$; $M_{gef} =$ nicht detektierbare Menge.

10.14 Versuche zu Kapitel 7.1

H-Cys(StBu)-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-

His-Val-Asp-Lys-NHNH₂ F3

(EPO 68-97 (Nona) Hydrazid **F3**)

6.3 mg (1.22 μmol , 1 eq) Glycopeptid **F2** werden mit 8.7 mL 40 mM NaOH versetzt (pH 13). Nach 30 min wird mit 25 μL AcOH angesäuert (pH 5). Nach Gefriertrocknung wird der Rückstand in 2.4 mL 40 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA gelöst und per RP-HPLC (Säule: YMC Hydrosphere C18 (150 x 10 mm), 20 \rightarrow 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 29 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **F3** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B I, 10 \rightarrow 50 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 4.2 mg (0.83 μmol , 68 %), weißer Feststoff,

C₂₁₅H₃₅₅N₄₇O₈₈S₂ (5070.57); ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 5067.42$; $M_{\text{gef}} = 1691.32$ (M+3H)³⁺, 2536.73 (M+2H)²⁺.

10.15 Versuche zu Kapitel 7.2

H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-

Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-

Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Cys-Leu-

Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-

Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-

His-Val-Asp-Lys-NHNH₂ 60

(EPO 29-97 (2xSAcm, 2xNona) Hydrazid **60**)

In einer anaeroben Glovebox werden 5.8 mg (0.91 μmol , 1 eq) Thioester **E2** und 4.9 mg (0.97 μmol , 1.1 eq) Hydrazid **F3** in 248.6 μL Ligationpuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 15 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.9) gelöst. Nach 3 d werden 3.8 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) zugegeben. Nach 1.5 h wird die Mischung mit 1151 μL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und per RP-HPLC (YMC-Triart C8 (150 x 10 mm), 30 \rightarrow 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 29 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **60** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B II, 20 \rightarrow 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 6.9 mg (0.62 μmol , 68 %), weißer Feststoff,

C₄₇₈H₇₆₁N₁₀₇O₁₉₄S₃ (11207.08); ESI-MS: $M_{\text{ber}} = 11200.21$; $M_{\text{gef}} = 1602.84$ (M+7H)⁷⁺, 1869.55 (M+6H)⁶⁺, 2243.42 (M+5H)⁵⁺, 2803.70 (M+4H)⁴⁺, 3738.95 (M+3H)³⁺.

*H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Cys-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-SCH₂C₆H₄COOH **61***

*(EPO 29-97 (2xSAcm, 2xNona) MMBA **61**)*

6.8 mg (0.61 μmol, 1 eq) Hydrazid **60** werden im Kältebad (200 g Eis, 66 g NaCl) bei -18 °C in 190.6 μL Diazotierungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM NaNO₂, pH 3) gelöst. Nach 1 h werden 6.4 mg (37.82 μmol, 62 eq) MMBA hinzugefügt und der pH-Wert wird mit 56.73 μL (93 eq) 1 M NaOH auf pH 6 eingestellt. Nach 1 h bei RT werden 1152 μL 40 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA zugegeben und das Rohprodukt **61** per RP-HPLC (YMC-Triart C8 (150 x 10 mm), 30 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 29 min, 4 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **61** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B II, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 3.4 mg (0.30 μmol, 49 %), weißer Feststoff,

C₄₈₆H₇₆₅N₁₀₅O₁₉₆S₄ (11343.25); ESI-MS: M_{ber} = 11336.20; M_{gef} = 1622.63 (M+7H)⁷⁺, 1892.95 (M+6H)⁶⁺, 2271.38 (M+5H)⁵⁺, 2838.50 (M+4H)⁴⁺, 3784.57 (M+3H)³⁺.

10.16 Versuche zu Kapitel 7.3

*H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Cys-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Cys-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Cys-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Acm)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH **62***

*(EPO 29-166 (3xSAcm, 2xNona, 3xSH) **62**)*

In einer anaeroben Glovebox werden 3.4 mg (0.30 μmol, 1 eq) Thioester **61** und 2.7 mg (0.36 μmol, 1.2 eq) Peptidfragment **54** in 82.0 μL Ligationpuffer (8 M GdmCl, 0.1 M

NaH₂PO₄, 15 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.7) gelöst. Nach 3 d werden 1.3 mg DTT (Endkonzentration = 0.1 M) zugegeben. Nach 3 h wird die Mischung mit 1318 µL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 30 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 39 min, 3 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktion **62** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 4.3 mg (0.23 µmol, 77 %), weißer Feststoff,

C₈₁₂H₁₃₁₁N₂₀₅O₂₉₁S₆ (18793.92); ESI-MS: M_{ber} = 18782.24; M_{gef} = 1255.04 (M+15H)¹⁵⁺, 1344.69 (M+14H)¹⁴⁺, 1447.86 (M+13H)¹³⁺, 1568.63 (M+12H)¹²⁺, 1711.02 (M+11H)¹¹⁺, 1882.03 (M+10H)¹⁰⁺, 2090.80 (M+9H)⁹⁺, 2352.09 (M+8H)⁸⁺, 2688.16 (M+7H)⁷⁺, 3135.37 (M+6H)⁶⁺, 3762.30 (M+5H)⁵⁺.

*H-Cys(Acm)-Ala-Glu-His-Cys(Acm)-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys(Acm)-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH **63***
(EPO 29-166 (3xSAcm, 2xNona, 3xCH₃) **63**)

In einer anaeroben Glovebox werden zu 5.1 mg (0.27 µmol, 1 eq) Ligationsprodukt **62** 1080 µL Entschwefelungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 0.9 M TCEP, 0.6 M MESNa, 15 mM VA-044 **56**, pH 7) gegeben und 24 h bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Nach Zugabe von 1324 µL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA erfolgt die Reinigung per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 30 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 39 min, 3 mL/min). Nach Gefriertrocknung wird die Mischfraktion aus Produkt **63** und Edukt **62** erneut mit 816 µL Entschwefelungspuffer (6 M GdmCl, 0.2 M NaH₂PO₄, 0.9 M TCEP, 0.6 M MESNa, 15 mM VA-044 **56**, pH 7) versetzt und bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Vollständiger Umsatz ist nach 2 h erreicht. Nach 5 h wird die Reaktionsmischung mit 1584 µL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA verdünnt und per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 30 → 60 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 39 min, 3 mL/min) gereinigt. Die

Fraktion mit der Zielverbindung **63** wird lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 3.3 mg (0.18 μmol, 67 %), weißer Feststoff,

C₈₁₂H₁₃₁₁N₂₀₅O₂₉₁S₃ (18697.74); ESI-MS: M_{ber} = 18697.74; M_{gef} = 1249.33 (M+15H)¹⁵⁺, 1338.23 (M+14H)¹⁴⁺, 1440.79 (M+13H)¹³⁺, 1560.83 (M+12H)¹²⁺, 1702.69 (M+11H)¹¹⁺, 1872.77 (M+10H)¹⁰⁺, 2080.67 (M+9H)⁹⁺, 2340.90 (M+8H)⁸⁺, 2674.69 (M+7H)⁷⁺.

*H-Cys-Ala-Glu-His-Cys-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH **59***

(EPO 29-166 (3xSH, 2xNona, 3xCH₃) **59**)

1.7 mg Pd^{II}Cl₂ werden in 544 μL H₂O suspendiert und 1 d bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Anschließend wird der Feststoff abzentrifugiert und 153.6 μL des braunen Überstands (0.48 mg Pd^{II}Cl₂, 2.70 μmol, 15 eq) zu einer Lösung von 3.3 mg (0.18 μmol, 1 eq) Peptid **63** in 246.4 μL H₂O gegeben. Die gelbe Lösung wird 5 min bei 37 °C stark geschüttelt (1000 rpm). Anschließend werden 330 mg DTT und danach 1.7 mL 30 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA zugegeben. Nach Pelletieren bei 30000 rpm für 10 min wird der Überstand per RP-HPLC (YMC-Pack Protein-RP (150 x 10 mm), 40 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 59 min, 3 mL/min) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt **59** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) charakterisiert.

Ausbeute: 1.69 mg (91.43 nmol, 51 %), weißer Feststoff,

C₈₀₃H₁₂₉₆N₂₀₂O₂₈₈S₃ (18484.51); ESI-MS: M_{ber} = 18473.21; M_{gef} = 1322.58 (M+14H)¹⁴⁺, 1424.40 (M+13H)¹³⁺, 1543.12 (M+12H)¹²⁺, 1683.14 (M+11H)¹¹⁺, 1851.50 (M+10H)¹⁰⁺, 2056.99 (M+9H)⁹⁺, 2313.98 (M+8H)⁸⁺, 2644.49 (M+7H)⁷⁺.

10.17 Versuche zu Kapitel 7.4

*H-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Thr-Gly-Cys-Ala-Glu-His-Cys-Ser-Leu-Asn-Glu-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ile-Thr-Val-Pro-Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala-Trp-Lys-Arg-Nle-Glu-Val-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Glu-Val-Trp-Gln-Gly-Leu-Ala-Leu-Leu-Ser-Glu-Ala-Val-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Leu-Leu-Val-Asn[(Gal)₂(GlcNAc)₂(Man)₂(Man)(GlcNAc)₂]-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Thr-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Ala-Gln-Lys-Glu-Ala-Ile-Ser-Pro-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ala-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Ile-Thr-Ala-Asp-Thr-Phe-Arg-Lys-Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-Thr-Gly-Glu-Ala-Cys-Arg-Thr-Gly-Asp-Arg-OH **D***
*(EPO (3xNona) **D**)*

*Ligation zu EPO 1-166 (3xNona) **D**^{red}*

In einer anaeroben Glovebox werden 0.72 mg (146.29 nmol, 1.6 eq) Glycopeptidthioester **B2** und 1.69 mg (91.43 nmol, 1 eq) Glycopeptid **59** in 36.57 µL Ligationspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 15 mM TCEP, 0.1 M MPAA, pH 6.9) gelöst (Endkonzentration an **59** = 2.5 mM). Nach 3 d werden nochmals 1.6 eq **B2** zugegeben und 1 d inkubiert. Die Reaktion wird per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min) analysiert.

*Rückfaltung und Oxidation zu EPO (3xNona) **D***

Alle verwendeten Puffer werden nach Filtration eingesetzt. Nach 4 d wird die Ligationsmischung in der anaeroben Glovebox mit 9.11 mL Verdünnungspuffer (8 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 M DTT, pH 7.5) auf 0.01 mM (bezogen auf **59**) verdünnt und in einen Dialyseschlauch überführt. Es wird 22 h gegen 0.5 L Reduktionspuffer (4 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M DTT, pH 8.5) anaerob dialysiert. Alle weiteren Dialysen erfolgen unter aeroben Bedingungen bei 4 °C. Nach der Dialyse gegen 0.5 L Oxidationspuffer (4 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 4 µM Cys, 0.5 µM Cystin, pH 8.5) für 23 h wird gegen 0.5 L Rückfaltungspuffer 1 (1 M GdmCl, 0.1 M NaH₂PO₄, pH 8) für 19 h und 3 x gegen je 0.5 L Rückfaltungspuffer 2 (0.05 M NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.5) für 25 h und 2 x je 23 h dialysiert. Anschließend wird das Dialysat in der Ultrafiltrationszelle auf ca. 1.4 mL konzentriert. Es folgt die Reinigung per Gelpermeationschromatographie (HiLoad™ 16/600 Superdex 75 prep grade, Rückfaltungspuffer 2, 1 mL/min). Die Monomerenfraktion **D** wird auf ca. 600 µL konzentriert und in 2 Portionen per RP-HPLC (Säule: Supelco Discovery®

BIO Wide Pore C5 (150 x 4.6 mm), 30 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 25 min, 1 mL/min) gereinigt. Mit den Oligomerenfraktionen wird nach Gefriertrocknung und Vereinen in 4 mL H₂O nochmals eine Gelpermeationschromatographie (HiLoad™ 16/600 Superdex 75 prep grade, Rückfaltungspuffer 2 + 0.5 M Arg, 1 mL/min) durchgeführt. Die Monomerenfraktion **D** wird auf ca. 500 µL konzentriert und per RP-HPLC (Säule: Supelco Discovery® BIO Wide Pore C5 (150 x 4.6 mm), 30 → 50 % MeCN/H₂O + 0.1 % TFA, 25 min, 1 mL/min) gereinigt. Die Produktfraktionen **D** werden lyophilisiert und per RP-UHPLC-MS (Säule: B IV, 20 → 60 % B, 9 min, 0.5 mL/min), HR-MS (Direkteinlass), SDS-PAGE und CD-Spektroskopie charakterisiert.

Ausbeute: 0.23 mg (9.89 nmol, 11 %), weißer Feststoff,

C₁₀₀₂H₁₆₂₁N₂₄₅O₃₇₆S₄ (23244.5690), HR-MS: $M_{\text{ber}} = 23230.4137$; $M_{\text{gef}} = 1368.3995$
(M+17H)¹⁷⁺, 1453.7932 (M+16H)¹⁶⁺, 1550.7139 (M+15H)¹⁵⁺, 1661.2632 (M+14H)¹⁴⁺,
1788.8942 (M+13H)¹³⁺, 1938.2149 (M+12H)¹²⁺.

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt *Prof. Dr. Carlo Unverzagt* für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die interessante und vielseitige Themenstellung sowie die stete Diskussionsbereitschaft und die sehr gute Betreuung mit vielen hilfreichen Ratschlägen.

Bei *Prof. Dr. Rainer Schobert* und *Prof. Dr. Andreas Möglich* bedanke ich mich für die Erlaubnis zur Benutzung ihrer Geräte in ihren Laboratorien sowie bei deren Mitarbeitern für die Hilfestellung.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Bioorganische Chemie danke ich für die gute Zusammenarbeit, die große Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt *Dr. Angelina Gross* und *Dr. Karen Gottwald* für die bedeutenden Vorarbeiten, die sie zu meinem Thema geleistet haben. Auch danke ich *Dr. Christopher Graf*, *Lukas Perkams*, *Elisabeth Rozanski*, *David Rau*, *Hendrik Hessefort*, *Markus Hessefort*, *Laura Kern*, *Alexander Albrecht*, *Tereza Janíčková*, *Dr. Vera Biedermann* und *Jutta Freund* für die wichtigen Beiträge zu meinem Thema.

Ein großer Dank geht an meine Laborkolleginnen und -kollegen *Dr. Angelina Gross*, *Dr. Christopher Graf*, *Dr. Claudia Pöhner*, *Dr. Marisa Rädisch*, *Elisabeth Rozanski*, *Hendrik Hessefort* und *Markus Hessefort* für ihre stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Besonders bedanke ich mich bei *Dr. Claudia Pöhner*, *Hendrik Hessefort* und *Markus Hessefort* für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Christopher Graf und *Thomas Luber* danke ich für die Einführung in die Bedienung und Wartung des Massenspektrometers. Bei *Theodoros Karagiannis* bedanke ich mich sehr für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung des Massenspektrometers.

Ein großes Dankeschön geht an *Dr. Christopher Graf*, *Thomas Luber*, *Theodoros Karagiannis*, *Elisabeth Rozanski*, *Marie Lott* und *Markus Hessefort* für die Messung

Danksagung

zahlreicher LC-MS-Proben und die Instandhaltung des Massenspektrometers. *Thomas Lubert* und *Sascha Weidler* danke ich für die Aufnahme hochauflösender Massenspektren.

Bei *Sascha Weidler*, *Marie Lott* und *David Rau* bedanke ich mich für die Hilfe bei biochemischen Fragestellungen sowie die Anfertigung von SDS-PAGE-Analysen.

Ein besonderes Dankeschön geht an *Dr. Irene Boos*, *Lukas Perkams* und *Carolina Spies* für die Bereitstellung des komplexen Nonasaccharids und nochmals an *Lukas Perkams* für die bereitgestellte α -2,6-Sialyltransferase. *David Rau* danke ich sehr für die zur Verfügung gestellten rekombinanten EPO- und Fc-Fragmente. Ein großer Dank geht an *Dr. Christopher Graf* und *Hendrik Hessefort* für die Bereitstellung von EPO-Fragmenten.

Bei *Volker Schubert* bedanke ich mich sehr für die Instandhaltung der HPLC-Anlage. Auch danke ich *Silvia Bernsdorf*, *Volker Schubert* und *Robert Semaca* für das Destillieren von Lösungsmitteln, die Wartung der Laborgeräte und die Bestellung von Chemikalien.

Für die Betreuung des Netzwerks und die Hilfe bei Computerfragen bedanke ich mich bei *Volker Schubert* und *Dr. Angelina Gross*.

Irmtraud Herold und *Silvia Kastner* danke ich für die Erledigung von Verwaltungsaufgaben.

Ich bedanke mich bei meinen zahlreichen Praktikanten, die einen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet haben. Vor allem bei *Pia Ebing*, die ihre Bachelorarbeit unter meiner Betreuung verfasst hat, und bei *Johanna Eisenreich*, durch die der Laboralltag ein ganzes Stück lustiger geworden ist.

Meinen Freunden, besonders *Julia* und *Julia*, danke ich recht herzlich für ihren Beistand und die schöne Zeit außerhalb des Labors. Ein ganz großer Dank geht an *meine Familie*, die mir stets zur Seite stand und mich unterstützte, sei es finanziell wie auch menschlich, und auf die ich immer zählen kann. Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinem Freund *Michael* für dessen Verständnis, Beistand und Unterstützung in jeglichen Lebensbereichen. Ich hoffe, du bleibst noch lange Zeit an meiner Seite.

12 Literaturverzeichnis

- [1] O. Seitz, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 214-246.
- [2] L. Liu, C. S. Bennett, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **2006**, 21-33.
- [3] C. M. Taylor, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11317-11362.
- [4] R. G. Spiro, *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R-56R.
- [5] R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 4-8.
- [6] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631-664.
- [7] J. K. Welply, P. Shenbagamurthi, W. J. Lennarz, F. Naider, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 11856-11863.
- [8] A. Helenius, M. Aebi, *Science* **2001**, *291*, 2364-2369.
- [9] A. Helenius, M. Aebi, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 1019-1049.
- [10] S. I. van Kasteren, H. B. Kramer, H. H. Jensen, S. J. Campbell, J. Kirkpatrick, N. J. Oldham, D. C. Anthony, B. G. Davis, *Nature* **2007**, *446*, 1105-1109.
- [11] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- [12] M. Takeuchi, N. Inoue, T. W. Strickland, M. Kubota, M. Wada, R. Shimizu, S. Hoshi, H. Kozutsumi, S. Takasaki, A. Kobata, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7819-7822.
- [13] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- [14] P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, *Science* **2001**, *291*, 2370-2376.
- [15] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 477-488.
- [16] R. Goulabchand, T. Vincent, F. Batteux, J.-F. Eliaou, P. Guilpain, *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 742-750.
- [17] A. Dove, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 913.
- [18] M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58-68.
- [19] T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 785-838.
- [20] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579-602.
- [21] S. Thobhani, C.-T. Yuen, M. J. A. Bailey, C. Jones, *Glycobiology* **2009**, *19*, 201-211.
- [22] D. Macmillan, C. R. Bertozzi, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9515-9525.
- [23] D. P. Gamblin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131-163.
- [24] C. Unverzagt, Y. Kajihara, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4408-4420.
- [25] R. B. Trimble, A. L. Tarentino, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1646-1651.

- [26] M. Fujita, S. Shoda, K. Haneda, T. Inazu, K. Takegawa, K. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1528*, 9-14.
- [27] K. Takegawa, M. Tabuchi, S. Yamaguchi, A. Kondo, I. Kato, S. Iwahara, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3094-3099.
- [28] B. Li, H. Song, S. Hauser, L.-X. Wang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3081-3084.
- [29] T. W. Muir, *Structure* **1995**, *3*, 649-652.
- [30] G. A. Lemieux, C. R. Bertozzi, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 506-513.
- [31] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249-289.
- [32] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [33] N. Yamamoto, A. Takayanagi, A. Yoshino, T. Sakakibara, Y. Kajihara, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 613-625.
- [34] S. T. Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5560-5562.
- [35] R. J. Payne, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 525-528.
- [36] N. Yamamoto, Y. Tanabe, R. Okamoto, P. E. Dawson, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 501-510.
- [37] M. Murakami, R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3567-3572.
- [38] C. Heinlein, D. Varón Silva, A. Tröster, J. Schmidt, A. Gross, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6406-6410.
- [39] S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1650-1654.
- [40] C. Piontek, D. Varón Silva, C. Heinlein, C. Pöhner, S. Mezzato, P. Ring, A. Martin, F. X. Schmid, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1941-1945.
- [41] S. T. Cohen-Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10531-10537.
- [42] D. Vetter, D. Tumelty, S. K. Singh, M. A. Gallop, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 94-97.
- [43] K. Barlos, D. Gatos, W. Schäfer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 590-593.
- [44] J. M. J. Fréchet, L. J. Nuyens, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 926-934.
- [45] F. Garcia-Martin, M. Quintanar-Audelo, Y. Garcia-Ramos, L. J. Cruz, C. Gravel, R. Furic, S. Cote, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 213-220.
- [46] S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957-989.
- [47] E. Bayer, H. Eckstein, K. Haegele, W. A. Koenig, W. Bruening, H. Hagenmaier, W. Parr, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1735-1738.
- [48] M. Narita, J.-Y. Chen, H. Sato, Y. Kim, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 2494-2501.
- [49] T. Johnson, L. C. Packman, C. B. Hyde, D. Owen, M. Quibell, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1996**, 719-728.

- [50] F. Weygand, W. Steglich, J. Bjarnason, R. Akhtar, N. M. Khan, *Tetrahedron Lett.* **1966**, 7, 3483-3487.
- [51] T. Wöhr, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3847-3848.
- [52] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9218-9227.
- [53] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Tetrahedron* **1993**, 49, 11065-11133.
- [54] T. Conroy, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3723-3733.
- [55] R. Chen, T. J. Tolbert, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3211-3216.
- [56] H. Kunz, H. Waldmann, C. Unverzagt, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1985**, 26, 493-497.
- [57] J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3915-3927.
- [58] A. M. Pérez-López, D. González-Calderón, A. Occorso, J. Galindo-Ángel, J. F. Domínguez-Seglar, J. A. Tamayo, M. Díaz-Gavilán, J. A. Gómez-Vidal, *Synlett* **2014**, 25, 2319-2322.
- [59] S. J. Broadwater, D. T. McQuade, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 2131-2134.
- [60] A. Fernández-Tejada, P. A. Vadola, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 8450-8458.
- [61] M. Hessefort, *Masterarbeit*, Universität Bayreuth **2016**.
- [62] S. Booth, E. N. K. Wallace, K. Singhal, P. N. Bartlett, J. D. Kilburn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1998**, 1467-1474.
- [63] S. Riethmueller, P. Somasundaram, J. C. Ehlers, C.-W. Hung, C. M. Flynn, J. Lokau, M. Agthe, S. Düsterhöft, Y. Zhu, J. Grötzinger, I. Lorenzen, T. Koudelka, K. Yamamoto, U. Pickhinke, R. Wichert, C. Becker-Pauly, M. Rädisch, A. Albrecht, M. Hessefort, D. Stahnke, C. Unverzagt, S. Rose-John, A. Tholey, C. Garbers, *PLoS Biol.* **2017**, 15, e2000080.
- [64] R. Chen, T. J. Tolbert, *Methods Mol. Biol.* **2011**, 751, 343-355.
- [65] M. Bodanszky, A. Bodanszky, *Chem. Commun.* **1967**, 591-593.
- [66] M. Bodanszky, J. Martinez, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 3071-3073.
- [67] R. Subirós-Funosas, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron* **2011**, 67, 8595-8606.
- [68] P. Wang, B. Aussedat, Y. Vohra, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11571-11575.
- [69] V. Ullmann, M. Rädisch, I. Boos, J. Freund, C. Pöhner, S. Schwarzinger, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11566-11570.
- [70] P. E. Dawson, S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 923-960.
- [71] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, 266, 776-779.

- [72] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10068-10073.
- [73] P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4325-4329.
- [74] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640-6646.
- [75] F. Mende, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1266-1274.
- [76] H. Kunz, H. Waldmann, J. März, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *1989*, 45-49.
- [77] J.-S. Zheng, S. Tang, Y.-C. Huang, L. Liu, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2475-2484.
- [78] S. Futaki, K. Sogawa, J. Maruyama, T. Asahara, M. Niwa, H. Hojo, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6237-6240.
- [79] R. von Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3551-3554.
- [80] Y. Kajihara, A. Yoshihara, K. Hirano, N. Yamamoto, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1333-1340.
- [81] S. Flemer, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 693-696.
- [82] L. Raibaut, N. Ollivier, O. Melnyk, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7001-7015.
- [83] C. Graf, *Dissertation*, Universität Bayreuth **2017**.
- [84] S. Seeleithner, *Masterarbeit*, Universität Bayreuth **2014**.
- [85] A. Gross, *Dissertation*, Universität Bayreuth **2016**.
- [86] C. Bello, F. Kikul, C. F. W. Becker, *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 201-207.
- [87] S.-S. Wang, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6488-6491.
- [88] S.-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [89] S.-S. Wang, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1235-1239.
- [90] G. Stavropoulos, D. Gatos, V. Magafa, K. Barlos, *Let. Pept. Sci.* **1996**, *2*, 315-318.
- [91] T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3871-3877.
- [92] 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.
- [93] A. Reif, S. Siebenhaar, A. Tröster, M. Schmälzlein, C. Lechner, P. Velisetty, K. Gottwald, C. Pöhner, I. Boos, V. Schubert, S. Rose-John, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12125-12131.
- [94] J. P. Tam, Y.-A. Lu, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1583-1592.
- [95] D. Bang, S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534-2538.
- [96] M. Murakami, T. Kiuchi, M. Nishihara, K. Tezuka, R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1500678.

- [97] D. Bang, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3985-3988.
- [98] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455-2504.
- [99] M. Villain, J. Vizzavona, K. Rose, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 673-679.
- [100] M. Jbara, S. K. Maity, M. Seenayah, A. Brik, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5069-5075.
- [101] D. Veber, J. Milkowski, S. Varga, R. Denkwalter, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5456-5461.
- [102] M. Royo, J. Alsina, E. Giralt, U. Slomczynska, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1995**, 1095-1102.
- [103] B. Kamber, *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 927-930.
- [104] N. Fujii, A. Otaka, S. Funakoshi, K. Bessho, T. Watanabe, K. Akaji, H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 2339-2347.
- [105] K. M. Fromm, *Chimia* **2013**, *67*, 851-854.
- [106] K. M. Harris, S. Flemer, Jr., R. J. Hondal, *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 81-93.
- [107] A. L. Schroll, R. J. Hondal, S. Flemer, Jr., *J. Pept. Sci.* **2012**, *18*, 1-9.
- [108] S. K. Maity, M. Jbara, S. Laps, A. Brik, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 8240-8244.
- [109] S. K. Maity, G. Mann, M. Jbara, S. Laps, G. Kamnesky, A. Brik, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 3026-3029.
- [110] M. Góngora-Benítez, A. Basso, T. Bruckdorfer, M. Royo, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 16166-16176.
- [111] W. Chen, J. W. Yewdell, R. L. Levine, J. R. Bennink, *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1757-1764.
- [112] R. J. Payne, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 21-43.
- [113] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526-533.
- [114] B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 687-690.
- [115] P. Wang, S. Dong, J. H. Shieh, E. Peguero, R. Hendrickson, M. A. S. Moore, S. J. Danishefsky, *Science* **2013**, *342*, 1357-1360.
- [116] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248-9252.
- [117] F. W. Hoffmann, R. J. Ess, T. C. Simmons, R. S. Hanzel, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 6414-6414.
- [118] C. Walling, R. Rabinowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5326-5326.
- [119] C. Walling, O. H. Basedow, E. S. Savas, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 2181-2184.
- [120] K. Jin, T. Li, H. Y. Chow, H. Liu, X. Li, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 14799-14803.
- [121] S. Shang, Z. Tan, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 5986-5989.

- [122] S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11988-11996.
- [123] M. C. Bondurant, M. J. Koury, *Mol. Cell. Biol.* **1986**, *6*, 2731-2733.
- [124] K. Jacobs, C. Shoemaker, R. Rudersdorf, S. D. Neill, R. J. Kaufman, A. Mufson, J. Seehra, S. S. Jones, R. Hewick, E. F. Fritsch, M. Kawakita, T. Shimizu, T. Miyake, *Nature* **1985**, *313*, 806.
- [125] N. Suzuki, *Tohoku J. Exp. Med.* **2015**, *235*, 233-240.
- [126] P. H. Maxwell, M. K. Osmond, C. W. Pugh, A. Heryet, L. G. Nicholls, C. C. Tan, B. G. Doe, D. J. P. Ferguson, M. H. Johnson, P. J. Ratcliffe, *Kidney Int.* **1993**, *44*, 1149-1162.
- [127] N. Obara, N. Suzuki, K. Kim, T. Nagasawa, S. Imagawa, M. Yamamoto, *Blood* **2008**, *111*, 5223-5232.
- [128] E. D. Zanjani, J. Ascensao, P. B. McGlave, M. Banisadre, R. C. Ash, *J. Clin. Invest.* **1981**, *67*, 1183-1188.
- [129] C. Dame, H. Fahnenstich, P. Freitag, D. Hofmann, T. Abdul-Nour, P. Bartmann, J. Fandrey, *Blood* **1998**, *92*, 3218-3225.
- [130] Y. Kajihara, N. Yamamoto, R. Okamoto, K. Hirano, T. Murase, *Chem. Rec.* **2010**, *10*, 80-100.
- [131] Köchling, Curtin, Madan, *Br. J. Haematol.* **1998**, *103*, 960-968.
- [132] V. C. Broudy, N. Lin, M. Brice, B. Nakamoto, T. Papayannopoulou, *Blood* **1991**, *77*, 2583-2590.
- [133] H. W. Pschyrembel, B. O. Dornblüth, *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 260. Auflage, de Gruyter, Berlin, New York, **2004**, 532.
- [134] C. T. Noguchi, L. Wang, H. M. Rogers, R. Teng, Y. Jia, *Expert Rev. Mol. Med.* **2008**, *10*, e36.
- [135] M. O. Arcasoy, *Br. J. Haematol.* **2008**, *141*, 14-31.
- [136] B. Adamcio, D. Sargin, A. Stradomska, L. Medrihan, C. Gertler, F. Theis, M. Zhang, M. Müller, I. Hassouna, K. Hannke, S. Sperling, K. Radyushkin, A. El-Kordi, L. Schulze, A. Ronnenberg, F. Wolf, N. Brose, J.-S. Rhee, W. Zhang, H. Ehrenreich, *BMC Biol.* **2008**, *6*, 37.
- [137] M. A. Bogoyevitch, *Cardiovasc. Res.* **2004**, *63*, 208-216.
- [138] M. Ogilvie, X. B. Yu, V. Nicolas-Metral, S. Pulido, C. Liu, U. Ruegg, C. T. Noguchi, *J. Biol. Chem.* **2001**, *275*, 39754-39761.
- [139] F. K. Lin, S. Suggs, C. H. Lin, J. K. Browne, R. Smalling, J. C. Egrie, K. K. Chen, G. M. Fox, F. Martin, Z. Stabinsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 7580-7584.

- [140] M. A. Recny, H. A. Scoble, Y. Kim, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17156-17163.
- [141] W. Jelkmann, *Physiol. Rev.* **1992**, *72*, 449-489.
- [142] W. Jelkmann, *Transfus. Med. Hemother.* **2013**, *40*, 302-309.
- [143] V. Mastromarino, M. Volpe, M. B. Musumeci, C. Autore, E. Conti, *Clin. Sci.* **2011**, *120*, 51-63.
- [144] H. W. Pschyrembel, B. O. Dornblüth, *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 260. Auflage, de Gruyter, Berlin, New York, **2004**, 240.
- [145] W. Jelkmann, C. Lundby, *Blood* **2011**, *118*, 2395-2404.
- [146] J. C. Cheetham, D. M. Smith, K. H. Aoki, J. L. Stevenson, T. J. Hoeffel, R. S. Syed, J. Egrie, T. S. Harvey, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 861-866.
- [147] P.-H. Lai, R. Everett, F.-F. Wang, T. Arakawa, E. Goldwasser, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 3116-3121.
- [148] F. F. Wang, C. K. H. Kung, E. Goldwasser, *Endocrinology* **1985**, *116*, 2286-2292.
- [149] A. J. Sytkowski, L. Feldman, D. J. Zurbuch, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1991**, *176*, 698-704.
- [150] V. Skibeli, G. Nissen-Lie, P. Torjesen, *Blood* **2001**, *98*, 3626-3634.
- [151] T. Misaizu, S. Matsuki, T. W. Strickland, M. Takeuchi, A. Kobata, S. Takasaki, *Blood* **1995**, *86*, 4097-4104.
- [152] E. Tsuda, G. Kawanishi, M. Ueda, S. Masuda, R. Sasaki, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *188*, 405-411.
- [153] M. Higuchi, M. Oh-eda, H. Kuboniwa, K. Tomonoh, Y. Shimonaka, N. Ochi, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 7703-7709.
- [154] S. Liu, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 993-999.
- [155] L. O. Narhi, T. Arakawa, K. H. Aoki, R. Elmore, M. F. Rohde, T. Boone, T. W. Strickland, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23022-23026.
- [156] E. Delorme, T. Lorenzini, J. Giffin, F. Martin, F. Jacobsen, T. Boone, S. Elliott, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9871-9876.
- [157] L. C. Wasley, G. Timony, P. Murtha, J. Stoudemire, A. J. Dorner, J. Caro, M. Krieger, R. J. Kaufman, *Blood* **1991**, *77*, 2624-2632.
- [158] M. Takeuchi, S. Takasaki, H. Miyazaki, T. Kato, S. Hoshi, N. Kochibe, A. Kobata, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3657-3663.
- [159] Y. J. Dong, C. Kung, E. Goldwasser, *J. Cell. Biochem.* **1992**, *48*, 269-276.
- [160] K. Yamaguchi, K. Akai, G. Kawanishi, M. Ueda, S. Masuda, R. Sasaki, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 20434-20439.

- [161] S. Elliott, T. Lorenzini, S. Asher, K. Aoki, D. Brankow, L. Buck, L. Busse, D. Chang, J. Fuller, J. Grant, N. Hernday, M. Hokum, S. Hu, A. Knudten, N. Levin, R. Komorowski, F. Martin, R. Navarro, T. Osslund, G. Rogers, N. Rogers, G. Trail, J. Egrie, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 414-421.
- [162] Z. Shahrokh, L. Royle, R. Saldoval, J. Bones, J. L. Abrahams, N. V. Artemenko, S. Flatman, M. Davies, A. Baycroft, S. Sehgal, M. W. Heartlein, D. J. Harvey, P. M. Rudd, *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 286-296.
- [163] J. C. Egrie, E. Dwyer, J. K. Browne, A. Hitz, M. A. Lykos, *Exp. Hematol.* **2003**, *31*, 290-299.
- [164] Q. Yang, Y. An, S. Zhu, R. Zhang, C. M. Loke, J. F. Cipollo, L.-X. Wang, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1665-1673.
- [165] 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. Gueriguian, 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*, 884-887.
- [166] P. Wang, S. Dong, J. A. Brailsford, K. Iyer, S. D. Townsend, Q. Zhang, R. C. Hendrickson, J. Shieh, M. A. S. Moore, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11576-11584.
- [167] S. Sakakibara, *Biopolymers* **1995**, *37*, 17-28.
- [168] K. Gottwald, *Dissertation*, Universität Bayreuth **2016**.
- [169] E. Rozanski, *Masterarbeit*, Universität Bayreuth **2015**.
- [170] R. Huber, J. Deisenhofer, P. M. Colman, M. Matsushima, W. Palm, *Nature* **1976**, *264*, 415-420.
- [171] Y. Kaneko, F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, *Science* **2006**, *313*, 670-673.
- [172] F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, *Immunity*, *24*, 19-28.
- [173] F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 34-47.
- [174] M. Edri-Brami, B. Rosental, D. Hayoun, M. Welt, H. Rosen, I. Wirguin, B. Nefussy, V. E. Drory, A. Porgador, R. G. Lichtenstein, *PLoS One* **2012**, *7*, e35772.
- [175] M. Rädisch, *Dissertation*, Universität Bayreuth **2016**.
- [176] L. Wagner, *Masterarbeit*, Universität Bayreuth **2016**.
- [177] E. E. Schallenberg, M. Calvin, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2779-2783.
- [178] F. Weygand, E. Csendes, *Angew. Chem.* **1952**, *64*, 136-136.

- [179] T. I. Al-Warhi, H. M. A. Al-Hazimi, A. El-Faham, *J. Saudi. Chem. Soc.* **2012**, *16*, 97-116.
- [180] Y. Yang, *Side Reactions in Peptide Synthesis*, Academic Press, Oxford, **2016**, 46-47.
- [181] B. Witkop, *Adv. Protein Chem.* **1962**, *16*, 221-321.
- [182] S. Li, C. Schöneich, R. T. Borchardt, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *48*, 490-500.
- [183] A. Seko, M. Koketsu, M. Nishizono, Y. Enoki, H. R. Ibrahim, L. R. Juneja, M. Kim, T. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1335*, 23-32.
- [184] T. Tanaka, H. Nagai, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, *Chem. Commun.* **2009**, 3378-3379.
- [185] H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3633-3634.
- [186] L. Perkams, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bayreuth.
- [187] I. Boos, *Dissertation*, Universität Bayreuth **2015**.
- [188] M. Hessefort, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bayreuth.
- [189] M. Ohno, A. Eastlake, D. A. Ontjes, C. B. Anfinsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6842-6847.
- [190] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2648-2650.
- [191] M. Mochizuki, S. Tsuda, K. Tanimura, Y. Nishiuchi, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2202-2205.
- [192] D. Rau, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bayreuth.
- [193] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [194] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [195] F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino, S. A. Kates, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853-4856.
- [196] W.-C. Shieh, Z. Chen, S. Xue, J. McKenna, R.-M. Wang, K. Prasad, O. Repič, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5359-5362.
- [197] Merck, *Novabiochem® Letters*, Band 1, **2014**.
- [198] V. P. Saxena, D. B. Wetlaufer, *Biochemistry* **1970**, *9*, 5015-5023.
- [199] T. Arakawa, D. Ejima, K. Tsumoto, N. Obeyama, Y. Tanaka, Y. Kita, S. N. Timasheff, *Biophys. Chem.* **2007**, *127*, 1-8.
- [200] M. Mochizuki, H. Hibino, Y. Nishiuchi, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5740-5743.
- [201] I. Photaki, J. Taylor-Papadimitriou, C. Sakarellos, P. Mazarakis, L. Zervas, *J. Chem. Soc. C* **1970**, 2683-2687.

- [202] E. E. Büllsbach, W. Danho, H. J. Helbig, H. Zahn, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **1980**, *361*, 865-873.
- [203] S. F. Loibl, Z. Harpaz, R. Zitterbart, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6753-6759.
- [204] P. Siman, S. V. Karthikeyan, M. Nikolov, W. Fischle, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8059-8063.
- [205] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2002**, 125-142.
- [206] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441-458.
- [207] H. Hessefort, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bayreuth.
- [208] P. G. M. Wuts, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 5. Auflage, John Wiley & Sons, Hoboken, **2014**, 1001.
- [209] C. E. Stauffer, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2489-2493.
- [210] Y. Shimizu, M. Noshita, Y. Mukai, H. Morimoto, T. Ohshima, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12623-12625.
- [211] R. Baker, J. L. Castro, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1990**, 47-65.
- [212] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, 1. Auflage, CRC Press, Boca Raton, **1997**, 40.
- [213] F. Weygand, E. Frauendorfer, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2437-2449.
- [214] Z. H. Kudzin, P. Łyżwa, J. Łuczak, G. Andrijewski, *Synthesis* **1997**, *1997*, 44-46.
- [215] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2876-2890.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 8 Satz 2 Nr. 4 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. –vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 8 Satz 2 Nr. 7 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung der Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 8 Satz 2 Nr. 8 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

Bayreuth,

Simone Seeleithner