

Glycopeptidsynthese**Ein orthogonales Linkerpaar zur effizienten Festphasensynthese von Glycopeptidthioestern mit N-Glycanen des komplexen Typs und Einsatz in der nativen chemischen Ligation****

*Stefano Mezzato, Manuela Schaffrath und Carlo Unverzagt**

In memoriam Murray Goodman

Bei den meisten rekombinanten Glycoproteinwirkstoffen findet man komplexe Oligosaccharide (N-Glycane), die an die Seitenkette von Asparagin gebunden sind.^[1] Aufgrund der Strukturvariabilität der N-Glycane weisen solche Glycoproteine eine hohe Mikroheterogenität auf, die eine Isolierung reiner Glycoformen extrem schwierig macht. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die biologische Aktivität von Glycoproteinen von der Struktur der verknüpften Glycane abhängt.^[2] Daher ist die Gewinnung einheitlicher Glycoproteine mit maßgeschneidertem Kohlenhydratteil von hohem Interesse für die medizinische und pharmazeutische Forschung. Die Verwendung spezieller Expressionssysteme^[3] wurde durch Methoden zur Synthese einheitlicher natürlicher Glycoproteine ergänzt.^[4] Dabei wurden vor allem das Remodeling von Glycanen, die Transglycosylierung, die reverse Proteolyse und die native chemische Ligation^[5] eingesetzt, wobei die letzte Methode neben einer hohen Flexibilität auch weiteres Potenzial verspricht. Um Bausteine zu erhalten, die sich zum Aufbau von komplexen N-Glycoproteinen durch native chemische Ligation eignen, wurde eine effiziente Festphasensynthese von Glycopeptidthioestern, die N-Glycane des komplexen Typs enthalten, entwickelt.

Die native chemische Ligation basiert auf der chemoselektiven Umsetzung eines Peptid- α -thioesters mit einem Peptid, das einen N-terminalen Cysteinrest aufweist. Obwohl an einigen Beispielen die Eignung dieser Methode zur Gewinnung von Glycopeptiden und glycosylierten Proteinen demonstriert wurde,^[6] wurde noch keine effiziente Festphasensynthese von Glycopeptidthioestern, die N-Glycane des komplexen Typs tragen, beschrieben.^[7] Doch erst ein solches Verfahren würde die Synthese der aus 124 Aminosäuren bestehenden bovinen Ribonuclease B (RNase B) ermöglichen, die von uns als Modellglycoprotein gewählt wurde und eine N-Glycosylierungsstelle an Asn34 mit einer be-

nachbarten Ligationsstelle an Cys40 aufweist. Die benötigten Methoden sollten am glycosylierten Fragment 30–68 der RNase B (**C**) entwickelt werden, das dazu in den Thioesterbaustein **A** und das Cysteinylpeptid **B** aufgeteilt wurde (Schema 1). Um die herausfordernde Synthese des Thioesterfragments RNase 30–39 (**A**) mit einem Heptasaccharid-N-Glycan zu bewältigen, wurde das „Safety-Catch“-Verfahren gewählt,^[8] da diese Methode als die vorteilhafteste unter den verfügbaren Thioestersynthesen angesehen wird.^[9]

Der Safety-Catch-Linker ist besonders stabil gegenüber Nucleophilen sowie unter basischen und sauren Bedingungen,^[10] lässt sich jedoch nach Beendigung der Synthese selektiv so aktivieren, dass das Reaktionsprodukt anschließend durch Nucleophile abgespalten werden kann. Allerdings führt seine hohe Stabilität auch dazu, dass erst nach zeittensiven, zweistufigen Mikroabspaltungen die Effizienz einer Festphasenreaktion z.B. mithilfe der LC-MS-Kopplung untersucht werden kann. Aufgrund dieser Einschränkung wurden üblicherweise nur die Endprodukte einer Synthese nach der Abspaltung vom Harz untersucht.^[11] Um diesen Nachteil zu überwinden und eine einfache Reaktionskontrolle aller Syntheseschritte inklusive der kritischen Glycopeptidbildung zu ermöglichen, bot es sich an, eine zusätzliche Ankerfunktion^[12] einzusetzen. Dieser zweite Linker sollte eine einfache Abspaltung der Peptidkette ermöglichen und zugleich orthogonal stabil zum Safety-Catch-Linker sein. Diese Anforderungen erfüllt der Rink-Amid-Linker,^[13] der bereits durch Trifluoressigsäure (TFA) gespalten wird (Schema 2). Dabei werden gleichzeitig die säurelabilen Schutzgruppen entfernt, wodurch die entstehenden Peptide besser löslich werden und die Analytik mithilfe von HPLC oder LC-MS-Kopplung verbessert wird. Durch einen hydrophoben Spacer wird die Umkehrphasen-HPLC-Detektion der Produkte und des Doppellinkerfragments erhöht.

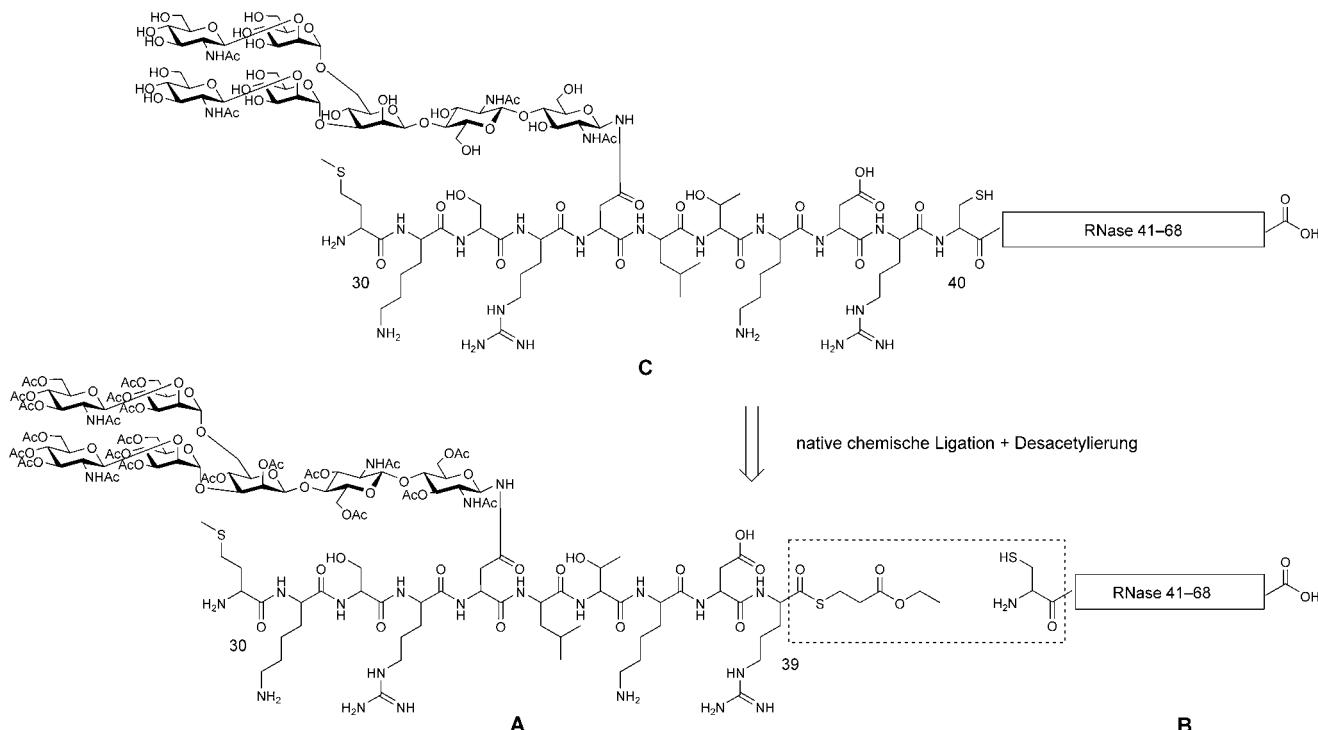
Als Träger für das Doppellinkerkonstrukt wurde PEGA-Harz^[14] gewählt. Zunächst wurde der Fmoc-geschützte Rink-Amid-Linker durch HCTU in Gegenwart von DIPEA an das Harz geknüpft (Schema 3). Der Fmoc-Schutz wurde mit Piperidin in NMP entfernt und die entstandene Verbindung **3** an den Spacer Fmoc-Phenylalanin gekuppelt. Nach der Fmoc-Abspaltung konnte mit dem Safety-Catch-Linker 3-Carboxypropansulfonamid **4**, DIC und HOBT das vollständig funktionalisierte Harz aufgebaut werden. Die jeweiligen Kupplungen wurden mit dem Kaiser-Test^[15] verfolgt und verliefen vollständig.

Die Beladung des Safety-Catch-Linkers mit der ersten Aminosäure ist häufig ein Problem,^[16] vor allem weil die Kupplungsausbeute niedrig ist und Racemisierung auftritt. Als erste Aminosäure knüpfte wir Arginin mit DIC in Gegenwart von 1-MeIm^[17] an. Danach wurde über die UV-Absorption des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts bei 290 nm^[18] eine Ausbeute von 80 % ermittelt; nach der zweiten Kupplung war sie nahezu quantitativ. Die anschließenden Peptidverlängerungen mit vier Fmoc-Aminosäuren wurden manuell unter den üblichen Bedingungen^[19] durchgeführt und lieferten das Pentapeptid **7** in hoher Reinheit und Ausbeute.

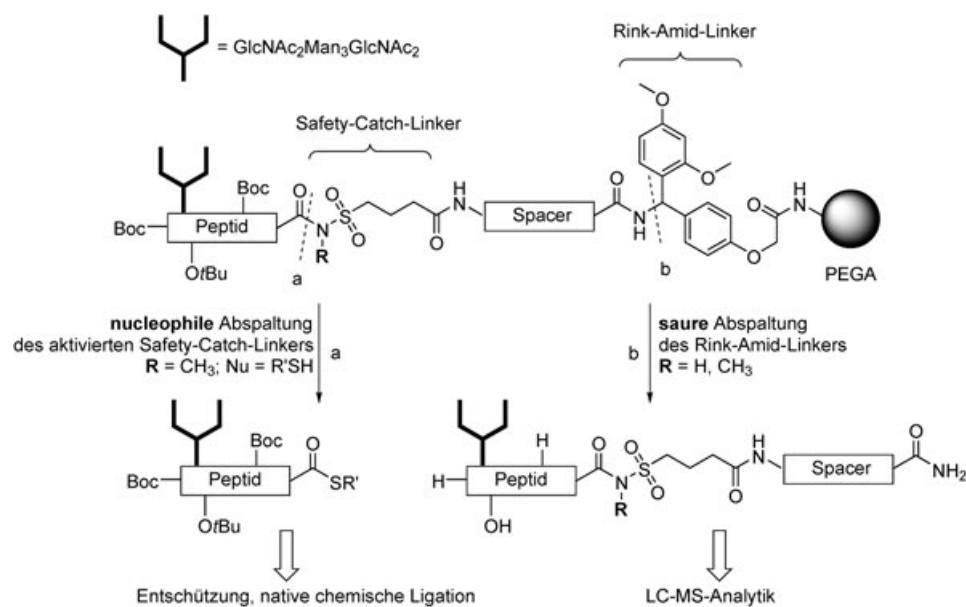
Aus früheren Arbeiten^[7b, 20] war bekannt, dass die Kupplung mit Fmoc-Asparagin, das mit einem komplexen N-Glycan verknüpft ist, besonders an der festen Phase schwierig

[*] S. Mezzato, Dr. M. Schaffrath, Prof. C. Unverzagt
Bioorganische Chemie
Gebäude NW1
Universität Bayreuth
95440 Bayreuth (Deutschland)
Fax: (+49) 921-555-365
E-mail: carlo.unverzagt@uni-bayreuth.de

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie für ihre Unterstützung.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



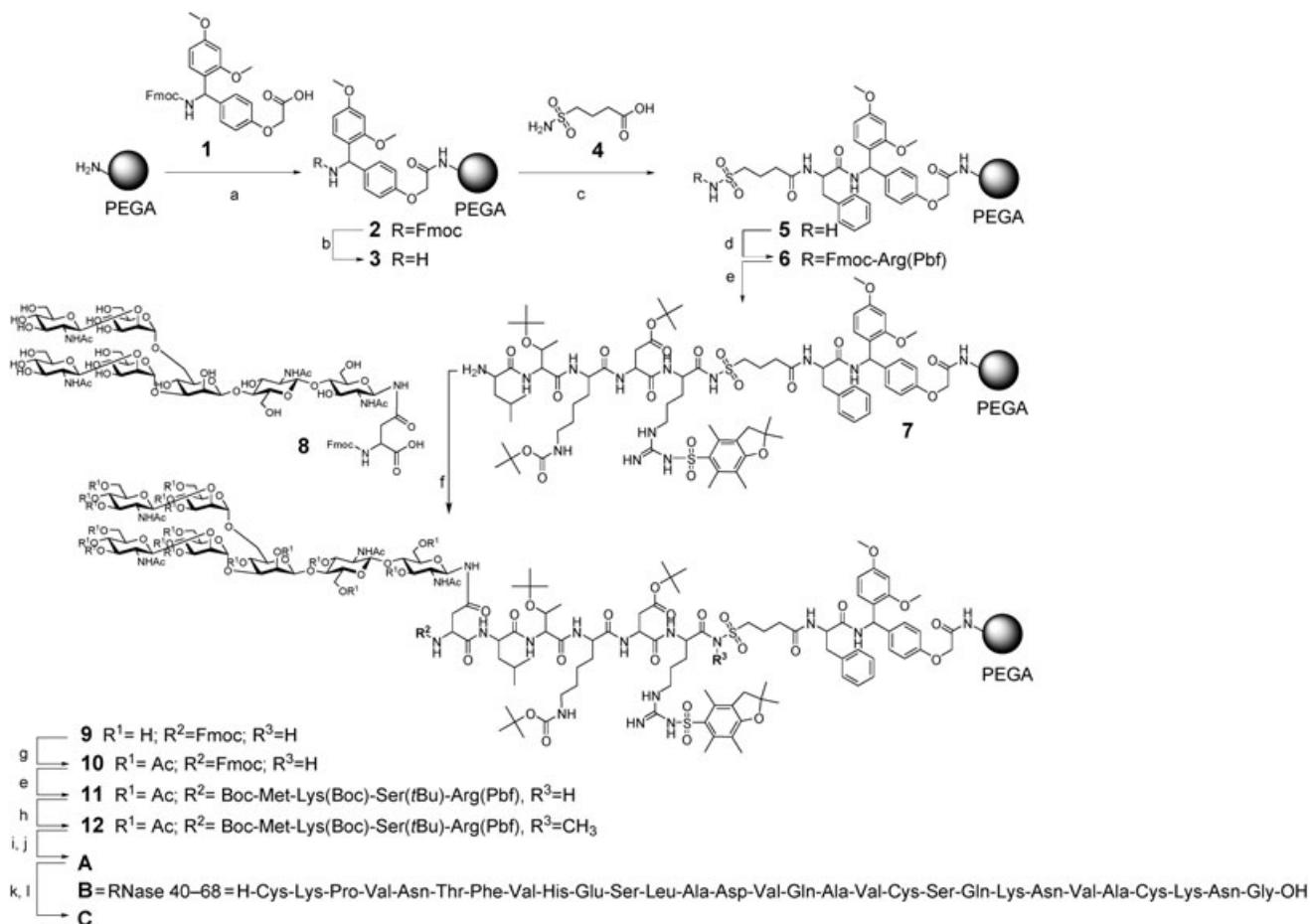
Schema 1. Retrosynthetic des mit einem komplexen N-Glycan verknüpften RNase-B-Fragments 30–68.



Schema 2. Die Kombination mit dem orthogonalen Rink-Amid-Linker erleichtert die LC-MS-Analytik von Reaktionen, die den Safety-Catch-Linker benötigen.

ist und zu niedrigen Ausbeuten führt, wobei Einflüsse des Materials der Festphase und der Aktivierungsmethode wahrscheinlich sind. Daher wurden die Kupplungsausbeuten für die synthetische Glycosylaminosäure **8**,^[20b,21] die ein ungeschütztes biantennäres Heptasaccharid-N-Glycan des komplexen Typs trägt, unter gleichen Bedingungen an verschiedenen Harzen bestimmt. Die Ergebnisse mit dem PEGA-Harz waren weit besser als die mit Festphasen, die auf

Polystyrol basieren, was auf das bessere Quellungsverhalten des PEGA-Harzes zurückzuführen sein dürfte. Parallel dazu wurden die anfänglich niedrigen Ausbeuten der Kupplung mit **8** durch Variation der Aktivierungsreagentien optimiert. Es zeigte sich, dass PyBOP in Gegenwart von DIPEA die höchsten Ausbeuten lieferte, wobei 0.8 Äquiv. der wertvollen Glycosylaminosäure **8** bezogen auf die Beladung des Harzes eingesetzt wurden. Dabei wurde die Glycosylaminosäure **8**

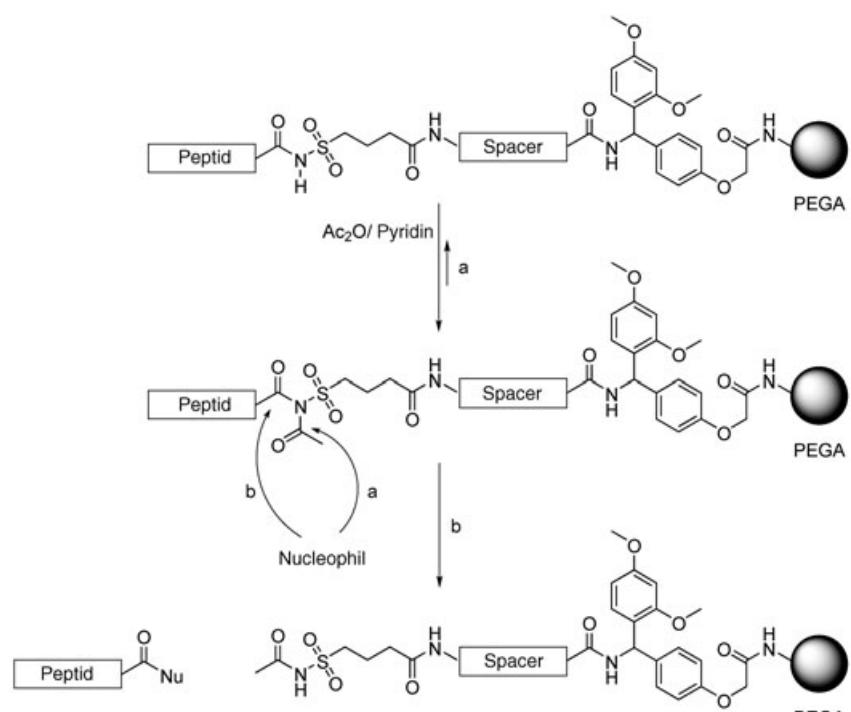


zunächst in DMSO/NMP (1:1) gelöst und nach der Vermischung mit dem Harz in situ mit festem PyBOP und DIPEA aktiviert, was zu hervorragenden Ausbeuten an Glycopeptid **9** führte (95 %, UV-Bestimmung von abgespaltenem Fmoc).

Um eine Acylierung der OH-Gruppen des Oligosaccharids durch die aktivierten Aminosäuren bei der Peptidverlängerung von **9** zu verhindern, sollten diese Hydroxygruppen geschützt werden.^[20d,22] Außerdem sind ungeschützte Oligosaccharide bei der Peptideschützung mit TFA teilweise instabil,^[23a] in acetylierter Form dagegen nicht.^[23b] Die Acylierung von **9** mit Acetanhydrid/Pyridin (1:1) schützte die OH-Gruppen des Heptasaccharids und blockierte zugleich die verbliebenen freien Aminogruppen. Allerdings war die Beladung des Harzes nach dem Acylierungsschritt deutlich reduziert. Nach 16 h Reaktionszeit waren ungefähr 2/3 des Peptids abgespalten und durch TFA-Abspaltung und LC-MS-Analyse konnte ein Hauptnebenprodukt identifiziert werden,

bei dem es sich um den von der Peptidkette getrennten N-acetylierten Sulfonamidlinker handelte. Eine mögliche Erklärung für diesen Reaktionsverlauf ist in Schema 4 skizziert.

In Lösung konnte die *N*-Acylierung von *N*-Acylsulfonamiden nur als unwesentliche Nebenreaktion nachgewiesen werden.^[24] *N*-Acylsulfonamide ($pK_s = 2.5$ ^[25]) werden unter basischen Bedingungen leicht zum Imidanion deprotoniert, auf das dann leichter ein zusätzlicher Acetylrest übertragen wird. Dadurch wird der Linker für einen Angriff von Nucleophilen (z.B. Pyridin) aktiviert, wobei sich entweder die Ausgangsverbindung zurückbildet (Schema 4, Weg a) oder die Peptidbindung zum Linker irreversibel gespalten wird (Schema 4, Weg b), was zum Verlust des Produkts von der Festphase führt. Wir vermuteten, dass die Acylierung von Acylsulfonamiden pH-abhängig sein und bei Verhinderung der De protonierung keine Überacylierung auftreten sollte. Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen ergab, dass



Schema 4. Nebenreaktionen des Safety-Catch-Linkers bei Acetylierungen unter basischen Bedingungen.

bereits die Neutralisation des Pyridinanteils mit Essigsäure ausreicht, um das vollständig acetylierte Glycopeptid ohne nachweisbare Nebenreaktion zu erhalten, und zwar mit einer Mischung aus Acetanhydrid, Pyridin und Essigsäure (5:3:2 v/v). Das geschützte Glycohexapeptid **10** konnte durch Fmoc-Festphasenpeptidsynthese glatt zum Glycodecapeptid **11** verlängert werden, wobei ein Boc-Methioninrest als N-Terminus eingesetzt wurde.

Zur gezielten Abspaltung des Glycopeptids als Thioester muss der Safety-Catch-Linker zuvor mit Iodacetonitril oder Trimethylsilyldiazomethan alkyliert werden.^[8] Als stärkeres und zugleich selektiveres Reagens wurde das Diazomethan gewählt,^[26] das kommerziell als stabile 2 M Lösung in *n*-Hexan erhältlich ist; diese wurde für die Reaktion mit THF 1:1 verdünnt. Erste Experimente ergaben, dass der Safety-Catch-Linker am PEGA-Harz nur zu ungefähr 50 % methyliert wurde, wogegen die analoge Aktivierung an einem Polystyrol-Harz vollständig verlief. Möglicherweise quoll das PEGA-Harz in der relativ unpolaren THF/*n*-Hexan-Mischung nur unzureichend, ein Effekt, der durch Peptiddaggregation verstärkt werden sollte. Daher wurden polarere Mischungen verwendet (*t*BuOH/*n*-Hexan 2:1 oder CH₂Cl₂/*n*-Hexan 2:1), in denen tatsächlich innerhalb von zwei Stunden Reaktionszeit quantitativ das methylierte Produkt **12** gebildet wurde. Die Alkylierung des Safety-Catch-Linkers konnte über die selektive Abspaltung des Glycopeptid-Linker-Konjugats mit TFA direkt verfolgt werden (LC-MS). Nach der vollständigen Alkylierung wurde der Glycopeptidthioester mit 3-Sulfanylpropionsäureethylester und einer katalytischen Menge Thiophenolat^[11a] freigesetzt. Zur vollständigen Abspaltung waren jedoch 3 Äquiv. Natriumthiophenolat und 100 Äquiv. 3-Sul-

fanylpropionsäureethylester notwendig. Die Effizienz der Thioesterbildung wurde indirekt durch Abspaltung des Linkers nach der Thiolysen mit TFA bestimmt, wobei nur das desacylierte *N*-Methylsulfonamidgrundgerüst nachgewiesen werden konnte (LC-MS).

Anschließend wurden die säurelabilen Schutzgruppen des Thioesterrohprodukts mit einer Mischung aus TFA und je 2 % der Abfangreagentien Wasser, Triethylsilan und 3-Sulfanylpropionsäureethylester abgespalten. Der entschützte Glycodecapeptid- α -thioester **A**^[27] wurde nach präparativer Umkehrphasen-HPLC in 46 % Ausbeute (bezogen auf eingesetztes **8**: 2.64 mg, 1.6 μ mol) erhalten (2.51 mg, 734 nmol, Reinheit: 95 % (RP18-HPLC)).

Um sicherzustellen, dass sich der Thioester **A** in einer nativen chemischen Ligation einsetzen lässt, wurde seine Verlängerung mit dem synthetischen RNase-Peptid 40–68 **B**^[28] im analytischen Maßstab untersucht. Dazu wurden die Verbindungen **A** und **B** in einem 6 M Guanidiniumchlorid-Puffer gelöst und durch Zugabe von Thiophenol (Endkonzentration 2 %) die Reaktion gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde mithilfe der LC-MS-Kopplung verfolgt, wobei sich zeigte, dass die Ligation nach einer Stunde ungefähr zu 50 % und nach acht Stunden komplett abgelaufen war. Die

Verbindung **A** reagierte vollständig, und es konnte kein hydrolysiertes Thioester in der Reaktionsmischung nachgewiesen werden, was auf eine effiziente Ligation schließen lässt. Die Verwendung von wässrigem Dioxan als Lösungsmittel für die Ligationsreaktion führte dagegen zu einem hohen Anteil an hydrolysiertem Thioester. Zur Abspaltung der Acetylgruppen wurde das Rohprodukt in einer Eintopfreaktion mit 10 % Hydrazinhydrat versetzt, und es wurde Dithiothreit zugegeben, um die Bildung von Disulfiden zu unterdrücken. Die Hydrolyse der Estergruppen war nach einer Stunde beendet, und das entschützte Glycopeptid **C** wurde mithilfe der LC-MS-Kopplung identifiziert.^[27] Das Zielmolekül **C** konnte somit durch native chemische Ligation erhalten werden und entspricht dem einheitlich glycosylierten Fragment 30–68 der RNase B, das mit einem N-Glycan des komplexen Typs versehen ist.

Wir haben hier eine allgemein anwendbare und effiziente Festphasensynthese für komplexe Glycopeptid- α -thioester, die zum Aufbau von N-Glycoproteinen dienen, vorgestellt. Die orthogonale Kombination aus einem Safety-Catch-Linker und einem Rink-Amid-Anker ergab ein neues analytisches Konstrukt, das sich insbesondere zur Reaktionsüberwachung mithilfe der LC-MS-Kopplung eignet und dadurch die Optimierung mehrerer Schlüsselreaktionen ermöglichte. Es zeigte sich, dass die In-situ-Aktivierung des Glycosylasparagin-Derivats die höchsten Kupplungsausbeuten ergab und dass die Acetylierung der OH-Gruppen (Capping) auch ohne gleichzeitige Aktivierung des Safety-Catch-Linkers möglich ist. Mit der Verfügbarkeit von N-Glycopeptidthioestern des komplexen Typs rückt die chemische Synthese von einheitlichen, vollständig glycosylierten N-Glycoproteinen

näher. Wir arbeiten derzeit an der Herstellung der Fragmente, die für die Synthese der kompletten RNase B notwendig sind.

Eingegangen am 30. Juni 2004,
veränderte Fassung am 13. September 2004
Online veröffentlicht am 3. Februar 2005

Stichwörter: Festphasensynthesen · Glycopeptide · Glycoproteine · Native chemische Ligation · Oligosaccharide

- [1] B. Lowe, A. Varki, *Essentials in Glycobiology*, Cold Spring Harbour, **1999**.
- [2] a) P. M. Rudd, H. C. Joao, E. Coghill, P. Fiten, M. R. Saunders, G. Opdenakker, R. A. Dwek, *Biochemistry* **1994**, *33*, 17–22; b) A. R. Nissen, *Am. J. Kidney Dis.* **2001**, *38*, 1390–1397.
- [3] a) M. Wacker, D. Linton, P. G. Hitchen, M. Nita-Lazar, S. M. Haslam, S. J. North, M. Panico, H. R. Morris, A. Dell, B. W. Wren, M. Aeby, *Science* **2002**, *298*, 1790–1793; b) S. R. Hamilton, P. Bobrowicz, B. Bobrowicz, R. C. Davidson, H. Li, T. Mitchell, J. H. Nett, S. Rausch, T. A. Stadheim, H. Wischnewski, S. Wildt, T. U. Gerngross, *Science* **2003**, *301*, 1244–1246; c) Z. Zhang, J. Gildersleeve, Y. Y. Yang, R. Xu, J. A. Loo, S. Uryu, C. H. Wong, P. G. Schultz, *Science* **2004**, *303*, 371–373.
- [4] Übersicht: B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579–602.
- [5] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779; b) P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghadiri, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4325–4329; c) D. W. Low, M. G. Hill, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, P. Botti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6554–6559; d) T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249–289.
- [6] a) Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684; b) M. J. Grogan, M. R. Pratt, L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 593–634; c) J. S. Miller, V. Y. Dukkin, G. J. Lyon, T. W. Muir, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 447–450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 431–434; d) D. Macmillan, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1379–1383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1355–1359.
- [7] a) J. D. Warren, J. S. Miller, S. J. Keding, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6576–6578; b) H. Hojo, E. Hagnoya, Y. Matsumoto, Y. Nakahara, K. Nabeshima, B. P. Toole, Y. Watanabe, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2961–2964.
- [8] B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322–2330.
- [9] a) J. Alsina, T. S. Yokum, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8761–8769; b) A. Sewing, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3503–3505; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3395–3396; c) R. von Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3551–3554.
- [10] G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J. Chem. Commun.* **1971**, 636–637.
- [11] a) R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11369–11374; b) R. Quaderer, D. Hilvert, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3181–3184.
- [12] a) F. Guiller, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091–2157; b) M. S. Congreve, S. V. Ley, J. J. Scicinski, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1769–1776.
- [13] M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, H. Köstner, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4645–4648.
- [14] PEGA = Polyethylenglycolacrylamid: M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077–3080.
- [15] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
- [16] R. Ingenito, D. Dreznjak, S. Guffler, H. Wenschuh, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1187–1188.
- [17] Novabiochem, *Novabiochem Innovations* **2000**, No. 6/00, im Internet unter <http://www.novabiochem.com>.
- [18] A. Dryland, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1986**, 125–137.
- [19] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach*, Vol. 222, Oxford University, Oxford, **2000**.
- [20] a) Z.-W. Guo, Y. Nakahara, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1527–1529; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1464–1466; b) C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5627–5630; c) E. Meinjohanns, M. Meldal, H. Paulsen, R. A. Dwek, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 549–560; d) N. Yamamoto, Y. Ohmori, T. Sakakibara, K. Sasaki, L. R. Juneja, Y. Kajihara, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2641–2644; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2537–2540; e) Y. Kajihara, Y. Suzuki, N. Yamamoto, K. Sasaki, T. Sakakibara, L. R. Juneja, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 971–985; f) N. Shao, J. Xue, Z. Guo, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1595–1599; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1569–1573.
- [21] a) C. Unverzagt, *Carbohydr. Res.* **1997**, *305*, 423–431; b) C. Unverzagt, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1369–1376.
- [22] Ohne die Acetylierung des Oligosaccharids entstand bei der nachfolgenden Peptidverlängerung mit Fmoc-Ala und TBTU-HOBt-Aktivierung ein größerer Anteil an Glycopeptiden mit mehreren O-Acylgruppen.
- [23] a) J. Broddefalk, K. Bergquist, J. Kihlberg, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3011–3014; b) H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1763–1765; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1697–1699.
- [24] M. T. Martin, F. Roschangar, J. F. Eaddy, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5461–5463.
- [25] T. Wieland, H. J. Hennig, *Chem. Ber.* **1969**, *93*, 1236–1246.
- [26] S. C. Fields, W. H. Dent, F. R. Green, E. G. Tromiczak, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1967–1970.
- [27] ESI-TOF-MS ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$): **A** ($\text{C}_{141}\text{H}_{219}\text{N}_{23}\text{O}_{70}\text{S}_2$): $M_{\text{ber.}} = 3418.37$, $M_{\text{gef.}} = 1141.14$ [$\text{M}+3\text{H}]^{3+}$; **C** ($\text{C}_{230}\text{H}_{386}\text{N}_{62}\text{O}_{92}\text{S}_4$): $M_{\text{ber.}} = 5616.63$; $M_{\text{gef.}} = 1406.22$ [$\text{M}+4\text{H}]^{4+}$.
- [28] Verbindung **B** wurde durch Fmoc-Festphasensynthese an einem TCP-Harz erhalten und mittels Umkehrphasen-HPLC nach der Entschützung gereinigt.