

**Tumorthapeutika II**

DOI: 10.1002/ange.200501594

**Eine vollsynthetische Vakzine aus einem tumorassoziierten Glycopeptid-Antigen und einem T-Zell-Epitop zur Induktion einer hochspezifischen humoralen Immunantwort\*\***

*Sebastian Dziadek, Alexandra Hobel, Edgar Schmitt und Horst Kunz\**

Eine Therapie von Tumorerkrankungen, die auf dem Einsatz von nicht-toxischen Antitumor-Impfstoffen beruht, wäre eine wertvolle Alternative zu den oft mit erheblichen Nebenwirkungen einhergehenden Behandlungen durch Chemotherapie oder Bestrahlung.<sup>[1]</sup> Voraussetzung für eine solche gezielte Immuntherapie ist die Identifizierung einer antigenen Zielstruktur, die eine Tumorzelle möglichst eindeutig von einer Normalzelle unterscheidet. Besonders lohnende Zielstrukturen scheinen Glycopeptide aus der Tandem-Repeat-Region

[\*] Dr. S. Dziadek, Prof. Dr. H. Kunz  
Institut für Organische Chemie  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)  
Fax: (+49) 6131-3924786  
E-mail: hokunz@uni-mainz.de

A. Hobel, Prof. Dr. E. Schmitt  
Institut für Immunologie  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Obere Zahlbacher Straße 67, 55101 Mainz (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und von der Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation gefördert. S.D. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für ein Promotionsstipendium



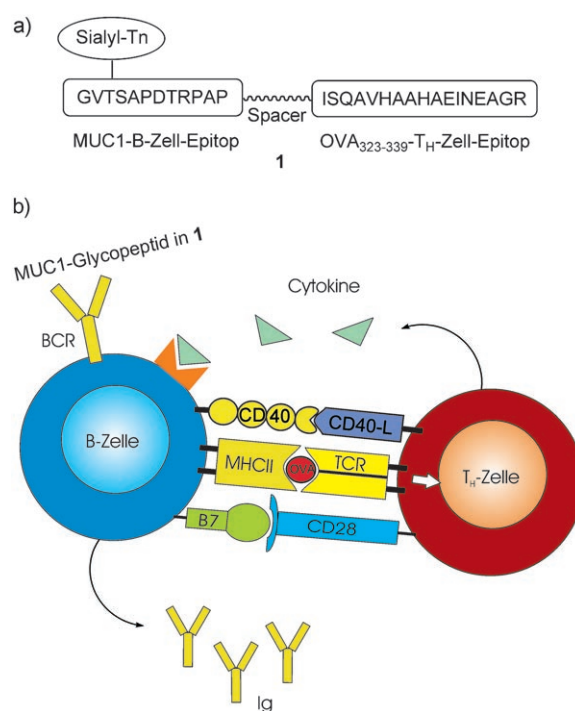
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

der extrazellulären Domäne des tumorassoziierten epithelialen Mucins MUC1 zu sein.<sup>[2]</sup> Mit aus epithelialen Tumorzellen gewonnenem MUC1 ist eine selektive Antitumor-Immunantwort in der Regel aber nicht zu erreichen, weil diese Glycoproteine in den Kohlenhydratanteilen mikroheterogen sind und neben den tumorassoziierten auch auf Normalzellen erscheinende Saccharid-Antigene tragen. Hinzu kommt, dass der Organismus wegen immunsuppressiver Mechanismen häufig nicht in der Lage ist, derartige Fremdanigene anzugreifen, weshalb ein weiteres Ziel einer gegen Tumore gerichteten Vakzinierung sein muss, diese Toleranz des Immunsystems durch Auslösung einer starken körpereigenen Immunantwort zu brechen. Hierfür ist bezüglich der Tumorselektivität neben der Initiierung einer cytotoxischen T-Zell-Antwort<sup>[3]</sup> die Induktion einer selektiven, von T-Helferzellen vermittelten Antikörperproduktion eine entscheidende Grundlage. Spezifische Antikörper tragen entscheidend zur Immunabwehr von Tumoren bei, indem sie die vom Komplementsystem vermittelte Lyse sowohl von gebundenen als auch von zirkulierenden Tumorzellen einleiten.

Die Spezifität der humoralen Immunantwort beruht auf der spezifischen Bindung des Antigens an den membranständigen Immunglobulin-Rezeptor einer B-Zelle. Allerdings reicht dieses Binden bei den tumorselektiven, aber schwach immunogenen Glycopeptiden aus MUC1 nicht aus, um eine naive B-Zelle zur Proliferation und Differenzierung in Antikörper sezernierende Plasmazellen anzuregen. Es bedarf einer Stimulierung durch aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen. Die T<sub>H</sub>-Zellen wiederum werden aktiviert, indem ihr Rezeptor (TCR) an ein vom Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC II) präsentiertes T-Zell-Peptidantigen bindet.<sup>[4]</sup>

Wir beschreiben hier ein Konzept zur Konstruktion von Antitumor-Vakzinen **1**, nach dem ein tumorassoziiertes Sialyl-Tn-Glycopeptidantigen aus der Tandem-Repeat-Region von MUC1 über eine polare, nicht immunogene Spacer-Aminosäure mit einem T<sub>H</sub>-Zell-Peptidepitop aus dem Ovalbumin (OVA<sub>323–339</sub>)<sup>[5]</sup> verknüpft wird (Abbildung 1a). Ein solcher synthetischer Impfstoff sollte von Antigen präsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen werden. Nach Prozessierung des Konstrukts **1** sollte das Ovalbumin-T-Zell-Epitop<sup>[5]</sup> über MHC-II-Komplexe auf den APCs präsentiert und durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt werden, was zur Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen führt. Die aktivierten T<sub>H</sub>-Zellen stimulieren dann diejenigen B-Zellen, die ebenfalls das entsprechende T-Zell-Epitop präsentieren. Durch Erkennung des tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid-Antigens in **1** durch den Immunglobulin-Rezeptor einer B-Zelle und Prozessierung des Konstrukts **1** in dieser B-Zelle (Abbildung 1b) sollte analog dem vorgeschilderten Mechanismus und durch weitere costimulatorische Signale eine starke Produktion von gegen das MUC1-Glycopeptid-Antigen gerichteten Antikörpern ausgelöst werden.

Das Glycopeptid-(T-Zell-Epitop)-Konjugat **1** wurde durch eine Fragmentkondensation an fester Phase aufgebaut. Das als Zielstruktur gewählte MUC1-Glycopeptid-Antigen der Sequenz GVT\*SAPDTRPAP enthält das immundominante Motiv PDTRP,<sup>[6]</sup> das im MUC1 auf den Normalzellen durch die großen Glycanketten verdeckt sein dürfte. Als tumorassoziiertes Saccharidantigen trägt es an Thr<sup>3</sup> das Sialyl-



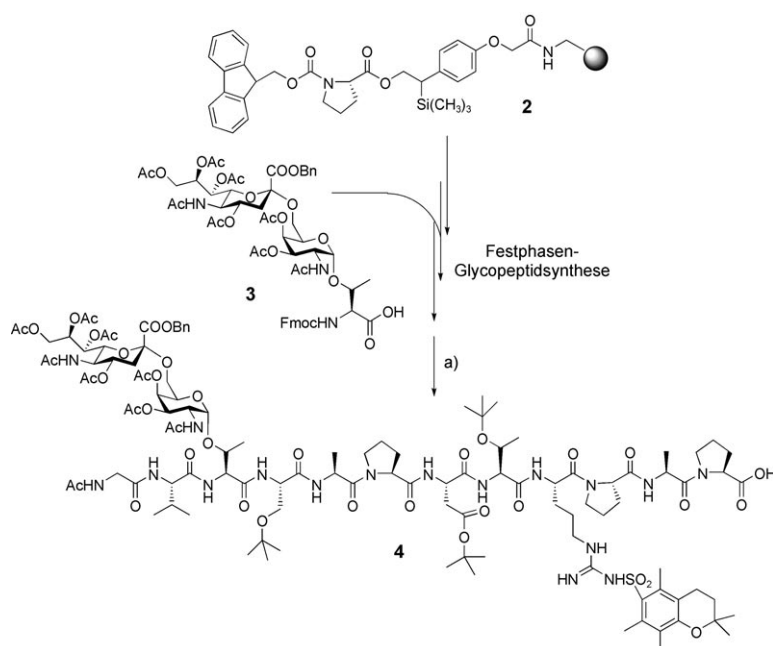
**Abbildung 1.** a) MUC1-OVA<sub>323–339</sub>-Impfstoff-Konjugat **1**; b) durch T<sub>H</sub>-Zellen stimulierte humorale Immunantwort.

Tn-Antigen, das auf Mamma-, Magen- und Dickdarmkarzinomen<sup>[7–9]</sup> nachgewiesen wurde. Betrachtet man die aberrante Glycosylierung der Mucine in Tumorzellen,<sup>[10,11]</sup> dann ist Sialyl-Tn zwar nicht mengenmäßig, aber hinsichtlich der Tumorselektivität eine besonders wichtige Struktur.

Das Sialyl-Tn-Glycopeptid aus MUC1 wurde als geschütztes Fragment durch Festphasensynthese am 2-Phenyl-2-trimethylsilylethylester (PTMSEL)-Anker<sup>[12]</sup> aufgebaut (Schema 1). Zur Kondensation der Fmoc-geschützten Aminosäuren dienten *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU)<sup>[14]</sup> und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), zur Kupplung des Fmoc-geschützten Sialyl-Tn-Threonin-Bausteins **3**<sup>[3,12b,15]</sup> die 7-Aza-Analoga HATU/HOAT<sup>[16]</sup> dieser Reagentien. Zur Ablösung des in allen Seitenkettenfunktionen geschützten Glycopeptids **4** vom Harz wurde der PTMSEL-Anker mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF)-trihydrat in Dichlormethan<sup>[12]</sup> gespalten.

Unter diesen nahezu neutralen Bedingungen bleibt die Hydrathülle am Fluorid intakt. Selbst sehr empfindliche Schutzgruppen werden dabei nicht angetastet, und **4** konnte nach Reinigung durch präparative HPLC in einer Ausbeute von 45 % bezogen auf **2** isoliert werden (Schema 1; analytische Daten für **4** sind in den Hintergrundinformationen hinterlegt).

Parallel dazu wurde das OVA<sub>323–339</sub>-Heptadecapeptid am TentaGel-gebundenen Wang-Anker<sup>[13,17]</sup> (**5**) synthetisiert. Nach Abschluss und *N*-terminaler Deblockierung wurde mit der Fmoc-geschützten Triethylenglycol-Spacer-Aminosäure **6**<sup>[3]</sup> gekuppelt und wiederum *N*-terminal zu **7** deblockiert (Schema 2).



**Schema 1.** Festphasenglycopeptidsynthese: 1) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20%) in NMP; 2) Kupplung (1.–8.: Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF; 9.: **3** (1.8 Äquiv.), HATU/HOAt/NMM, DMF, 3 h; 10.–11.: 2 × (Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF)), Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP; a) TBAF·3 H<sub>2</sub>O (2 × 2.5 Äquiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, jeweils 45 min, 45% (bezogen auf **2**). NMM = *N*-Methylmorpholin, Bn = Benzyl.

An dieses polymergebundene Konjugat **7** wurde das Sialyl-Tn-MUC1-Glycopeptid **4** unter Aktivierung mit HATU/HOAt gebunden. Der Überschuss an Carboxy-Fragmentkomponente **4** bezogen auf das Ausgangsmaterial **5** betrug nur 5%. Mit Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan und Wasser wurden der Wang-Anker gelöst und alle säurelabilen Schutzgruppen entfernt. Das im Kohlenhydratteil noch geschützte Konstrukt **8** ließ sich nach präparativer HPLC in einer Gesamtausbeute von 42% bezogen auf **5** isolieren. Hydrogenolyse des NeuNAc-Benzylesters und Entfernen der *O*-Acetylgruppen durch Umesterung in Methanol mit katalytischem NaOMe bei pH 9 ergaben nach präparativer HPLC die vollsynthetische Vakzine **1** in 43% Ausbeute und, laut analytischer HPLC und NMR-Spektroskopie, in reiner Form (siehe Hintergrundinformationen). Im 500-MHz-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **1** wurden nur drei Signale für Prolin-αCH-Protonen gefunden, was eine nennenswerte Epimerisierung des C-terminalen Prolins bei der Fragmentkondensation ausschließt.

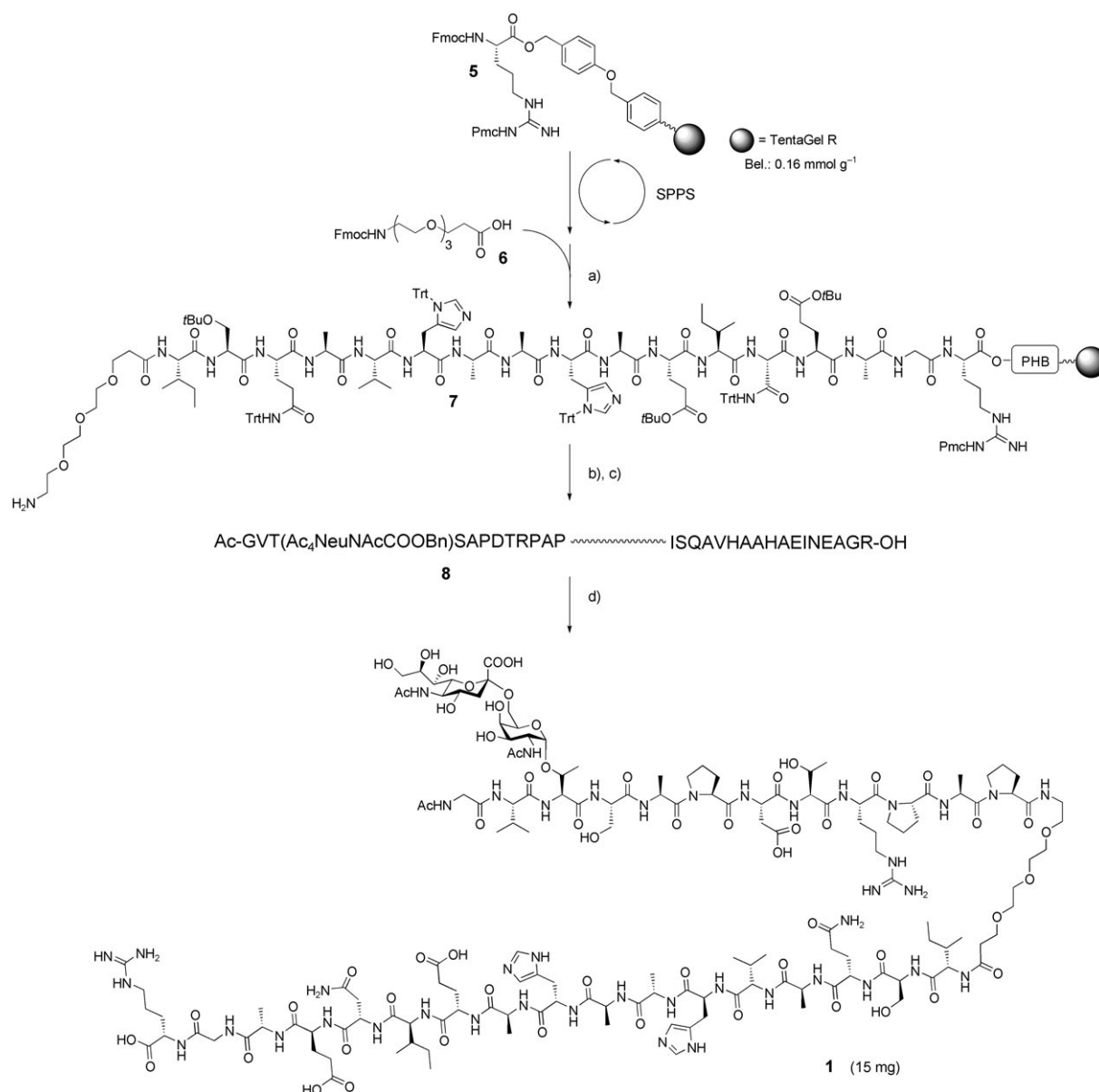
Zur Induktion einer starken humoralen Immunantwort gegen das tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid-Antigen in der Vakzine **1** wurden transgene Mäuse (DO11.10), deren T-Zellen einen Rezeptor mit Spezifität für das über MHC-II-Moleküle (I-A<sup>d</sup>) präsentierte Ovalbumin-T-Zell-Epitop (OVA<sub>323–339</sub>)<sup>[5]</sup> tragen, mit **1** immunisiert. Dazu wurde drei transgenen Mäusen (Maus 4–6) primär 10 µg der synthetischen Vakzine **1** in Kombination mit vollständigem Freund'schem Adjuvans (CFA) in die Fußsohlen injiziert. Sekundärimmunisierungen erfolgten nach 21 Tagen, wobei jeweils

10 µg der Vakzine **1** zusammen mit unvollständigem Freund'schem Adjuvans (IFA) intraperitoneal appliziert wurden. Zur Kontrolle erhielten drei weitere DO11.10-Mäuse identische Formulierungen, jedoch mit Phosphatpuffer statt der Vakzine (Maus 1–3, PBS-Gruppe). In Abständen von fünf Tagen nach jeder Immunisierung wurde allen Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen, um Serum für die Antikörperanalyse zu gewinnen. Der Nachweis MUC1-spezifischer Antikörper im Serum der Mäuse erfolgte durch ELISA.<sup>[18]</sup> Hierzu wurden die Vertiefungen einer ELISA-Titerplatte mit dem an Rinderserumalbumin (BSA) konjugierten MUC1-Sialyl-Tn-Glycopeptid<sup>[19]</sup> aus **1** beschichtet. Dieses Neoglycoprotein haftet unspezifisch an der Kunststoffoberfläche, wodurch das stark hydrophile Glycopeptid-Antigen<sup>[2a]</sup> auf der Mikrotiterplatte immobilisiert wird. Bei zunehmender Verdünnung (Abszisse) in Phosphatpuffer (PBS) wurden die Seren titriert und die Antikörperkonzentration mithilfe eines sekundären Anti-Maus-Antikörpers, an den Meerrettichperoxidase (HPO) gekuppelt war, photometrisch bestimmt. Beim Vergleich der Extinktionen wurde nach der dritten Immunisierung ein deutlicher Effekt erkennbar (Abbildung 2): Eine der mit der synthetischen MUC1-OVA<sub>323–339</sub>-Vakzine **1** immunisierten Mäuse (Maus 5, offene Quadrate) produzierte eine deutlich erhöhte MUC1-spezifische Anti-

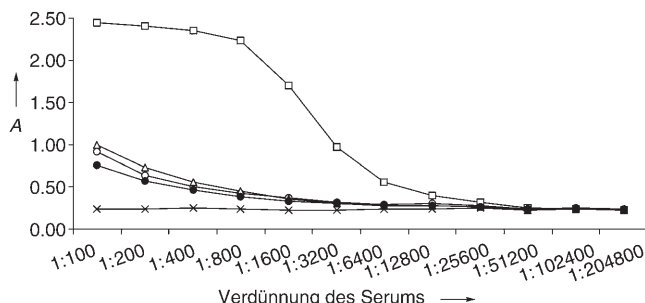
körperkonzentration. Die Kontrollmäuse (PBS-Mäuse) zeigten nur eine geringe unspezifische Reaktion. Obwohl die DO11.10-Mäuse genetisch weitgehend identisch sind, ist ihre Immunreaktion individuell verschieden, sodass es durchaus der Erfahrung entspricht, dass nur eine der drei immunisierten Mäuse mit stark gesteigerter Antikörperantwort reagierte.

Bei der Entwicklung des MUC1-spezifischen Antikörpertiters von Maus 5 während der Immunisierung (Abbildung 3) fällt der signifikante Anstieg der Antikörperkonzentration zwischen der zweiten und der dritten Immunisierung auf, der die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses anzeigt (spezifische IgG-Antwort).

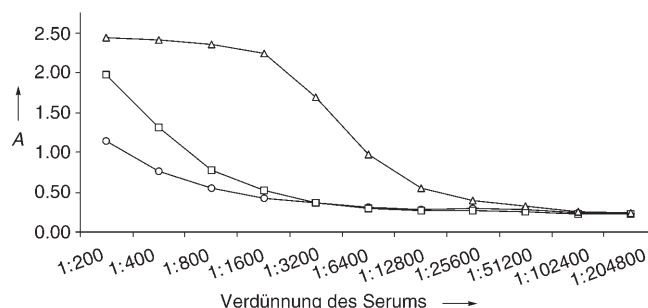
Die Spezifität der im Serum von Maus 5 enthaltenen Antikörper wurde durch Neutralisierungsexperimente mit unterschiedlichen (Glyco)Peptidantigenen in drei Verdünnungsstufen (1:4000, 1:8000, 1:16000) überprüft (Abbildung 4). Die Inkubation mit dem in **1** enthaltenen tumorassoziierten Sialyl-Tn-Glycopeptid-Antigen **9**<sup>[2a,3,12b]</sup> zeigte im Vergleich zum unbehandelten Serum (offene Kreise) eine fast vollständige Neutralisierung des im Serum enthaltenen Antikörpers an (gefüllte Quadrate in Abbildung 4a). Weder das unglycosylierte Dodecapeptid der gleichen Sequenz aus MUC1 (**10**)<sup>[2a,3,12b]</sup> noch das Glycohexadecapeptid der Tandem-Repeat-Region von MUC4 (**11**)<sup>[15]</sup> mit identischer Sialyl-Tn-Kohlenhydratkomponente wie in **9** oder das MUC4-Peptid **12**<sup>[15]</sup> waren in der Lage, den durch die Vakzine **1** induzierten Antikörper zu neutralisieren (Abbildung 4b–d).



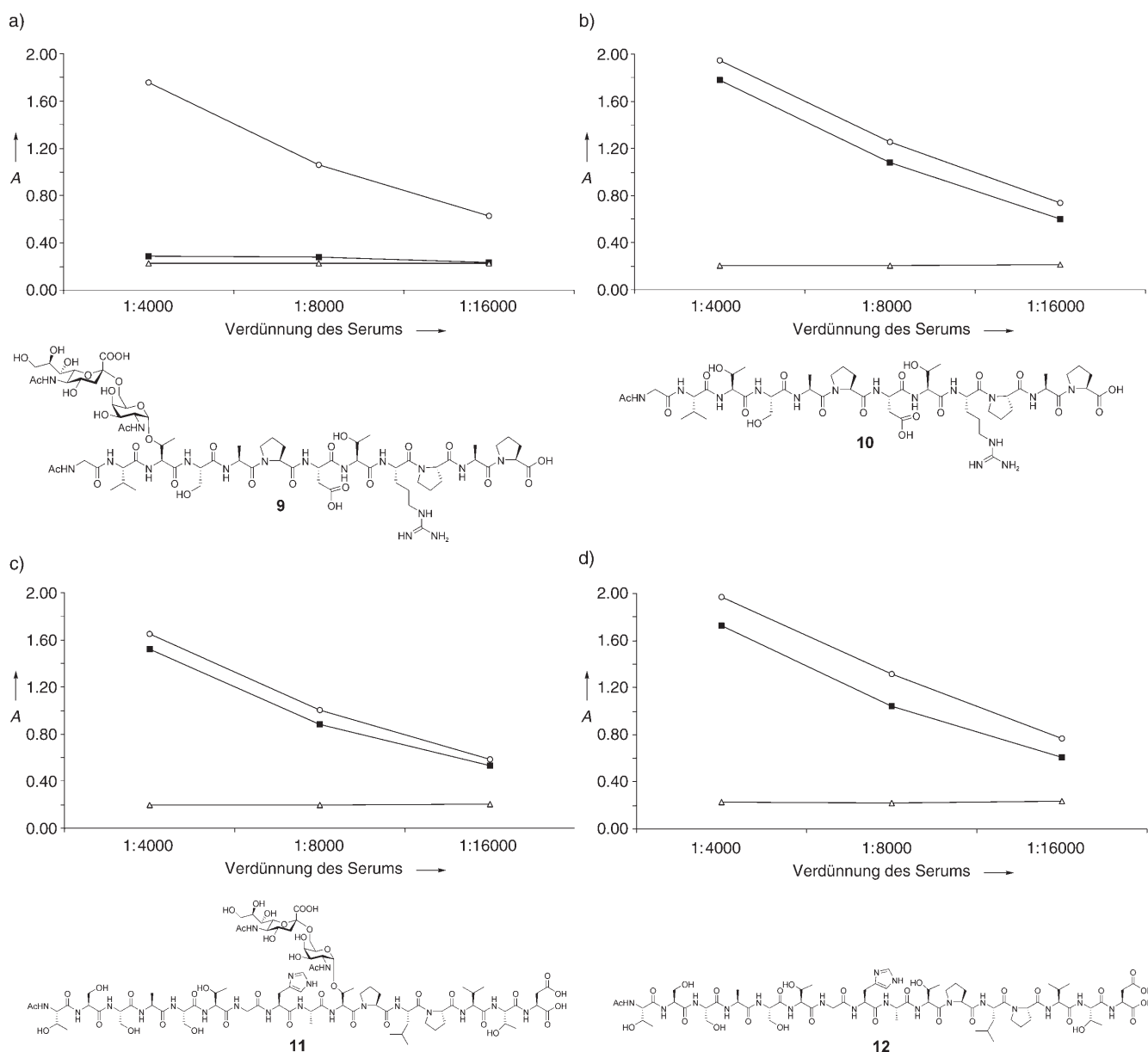
**Schema 2.** SPPS: 1) Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20%) in NMP, 2) Aminosäure-Kupplung: Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF, 3) Capping: kat. HOBT, Ac<sub>2</sub>O, DIPEA in NMP; a) 1. Piperidin in NMP, 2. Kupplung des Spacermoleküls: **6** (10 Äquiv.), HBTU, HOBT, DIPEA in NMP, 3. Capping, 4. Piperidin in NMP; b) Festphasen-Fragmentkondensation: 1. **4** (1.05 Äquiv.), HATU, HOAt, NMM in DMF, 16 h, 2. Capping; c) TFA, Triisopropylsilan, Wasser (15:0.9:0.9), 2 h, 42% nach präparativer HPLC; d) 1. H<sub>2</sub>, Pd/C (10%), 21 h, 2. NaOMe, MeOH, 16 h, 43% über 2 Stufen nach präparativer HPLC. Trt = Triphenylmethyl, Pmc = Pentamethylchroman-6-yl-sulfonyl.



**Abbildung 2.** ELISA der Seren der mit **1** immunisierten Mäuse (nach der 3. Immunisierung, Beschichtung der Mikrotiterplatte mit MUC1-BSA-Konjugat<sup>[19]</sup>). Absorbanz (A) bei  $\lambda = 414$  nm; ○: Maus 4, □: Maus 5, △: Maus 6, ●: Kontrollmaus, ×: Negativkontrolle.



**Abbildung 3.** Verlauf des MUC1-spezifischen Antikörper-Titers von Maus 5. A bei  $\lambda = 414$  nm; ○: erste Immunisierung, □: zweite Immunisierung, △: dritte Immunisierung.



**Abbildung 4.** Neutralisierung des durch Vakzinierung mit **1** erhaltenen Serums durch (Glyco)Peptidantigene. A bei  $\lambda = 414$  nm; ○: Serum von Maus 5 ohne Vorinkubierung, △: Negativkontrolle, ■: Serum von Maus 5, inkubiert mit: a) **9**, b) **10**, c) **11**, d) **12**.

Die Immunisierung der Maus mit der vollsynthetischen Vakzine **1** aus einem tumorassoziierten Sialyl-Tn-Glycopeptidantigen aus MUC1 und einem T-Zell-Epitop aus Ovalbumin erbrachte damit nicht nur eine starke, sondern auch eine hochspezifische, gegen die tumorassoziierte Struktur gerichtete humorale Immunantwort. Dabei erkennt der induzierte Antikörper nur die im synthetischen Antigen **1** vorgegebene kombinierte Struktur **9** aus Peptid- und Kohlenhydrat, nicht aber die entsprechende Peptidsequenz **10** allein oder die Kohlenhydratstruktur in Kombination **11** mit einem anderen Peptid. Diese hohe Spezifität des durch die synthetische Vakzine **1** induzierten Antikörpers ist erfolversprechend für die Entwicklung von wirksamen Antitumor-Vakzinen. Eine solche selektive Aktivierung des körpereigenen Immunsys-

tems gegen Glycoproteinstrukturen, die auf Tumor-, nicht aber auf Normalzellen vorkommen, kann nur mit reinen, am besten vollsynthetischen Antigenen erreicht werden, wie sie die Chemie mit den heute entwickelten Methoden<sup>[2a,20]</sup> zugänglich macht.

Eingegangen am 10. Mai 2005

Online veröffentlicht am 25. Oktober 2005

**Stichwörter:** Antigene · Glycopeptide · Synthetische Vakzine · Tumortheraeutika · T-Zell-Epitop



- [1] a) J. N. Blattmann, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, 305, 200; b) Z. Yu, N. P. Restifo, *J. Clin. Invest.* **2002**, 110, 289; c) P. Moingeon, *Vaccine* **2001**, 19, 1305; d) S. J. Danishefsky, J. A. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 883; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 836; e) R. R. Koganty, M. A. Reddish, B. M. Longenecker, *Drug Discovery Today* **1996**, 1, 190.
- [2] Zum biologischen Hintergrund, siehe: a) S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7624; b) kurze Übersicht: S. Dziadek, C. G. Espinola, H. Kunz, *Aust. J. Chem.* **2003**, 50, 519.
- [3] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 366.
- [4] a) R. N. Germain, *Cell* **1994**, 76, 287; b) J. A. Villadaugos, *Mol. Immunol.* **2001**, 38, 329.
- [5] K. M. Murphy, A. B. Heimberger, D. Y. Loh, *Science* **1990**, 250, 1720.
- [6] a) J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Dulig, *Int. J. Cancer* **1989**, 44, 691; b) M. R. Price, F. Hudecz, C. O'Sullivan, R. W. Baldwin, P. M. Edwards, S. B. J. Tendler, *Mol. Immunol.* **1990**, 27, 795; c) D. I. R. Spencer, M. R. Price, S. B. J. Tendler, C. DeMatties, T. R. E. Stadie, F.-G. Hanisch, *Cancer Lett.* **1996**, 100, 11–15.
- [7] S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, 49, 197.
- [8] H. Inoue, *Obstet. Gynecol.* **1990**, 75, 1031.
- [9] a) I. Takahashi, I. Maehara, T. Kusumoto, M. Yoshida, Y. Kakej, H. Kusumoto, M. Furusawa, K. Suglimacti, *Cancer* **1993**, 72, 18836; b) R. Soares, A. Marinho, F. Schmitt, *Pathol. Res. Pract.* **1996**, 192, 1182.
- [10] a) I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1473, 67; I. Brockhausen, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31, 318; b) K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kundryashov, B. W. Yin, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 33325.
- [11] a) T. F. Orntoft, N. Harvig, N. C. Langkilde, *Int. J. Cancer* **1990**, 45, 666; b) J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, T. Plunkett, R. Graham, I. Correa, D. Miles, M. Smith, *J. Mammary Gland Biol.* **2002**, 7, 209; c) F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, 10, 439.
- [12] a) M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 315; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 317; b) M. Wagner, S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 6018.
- [13] E. Bayer, W. Rapp, *Chem. Pept. Proteins* **1986**, 3, 3.
- [14] a) R. Knorr, A. Trzeciak, W. Baumwarth, D. Gillesen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927; b) V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zondrou, *Synthesis* **1984**, 572; c) W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788.
- [15] a) C. Brocke, H. Kunz, *Synlett* **2003**, 2052; b) C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525.
- [16] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Falham, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2460.
- [17] a) S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 1328; b) E. Bayer, W. Rapp, *Chem. Pept. Proteins* **1986**, 3, 3.
- [18] Der Nachweis der an das immobilisierte Antigen gebundenen Antikörper erfolgte mit einem biotinylierten sekundären anti-Maus-Antikörper. Zur photometrischen Detektion diente an Streptavidin gekuppelte Peroxidase aus Meerrettich (HPO), die die Oxidation des farblosen Substrats ABTS (2,2'-Azinobis-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure]) durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem metastabilen grünen Radikalkation katalysiert, dessen Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 414$  nm liegt.
- [19] Das BSA-Konjugat des Sialyl-Tn-Glycopeptids ist in der vorstehenden Publikation<sup>[2a]</sup> als Verbindung **25** beschrieben.
- [20] Übersichten, siehe z.B.: a) C. Brocke, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 3085; b) O. Seitz, *ChemBioChem* **2000**, 1, 214; c) H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4495; d) G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, 10, 3045.