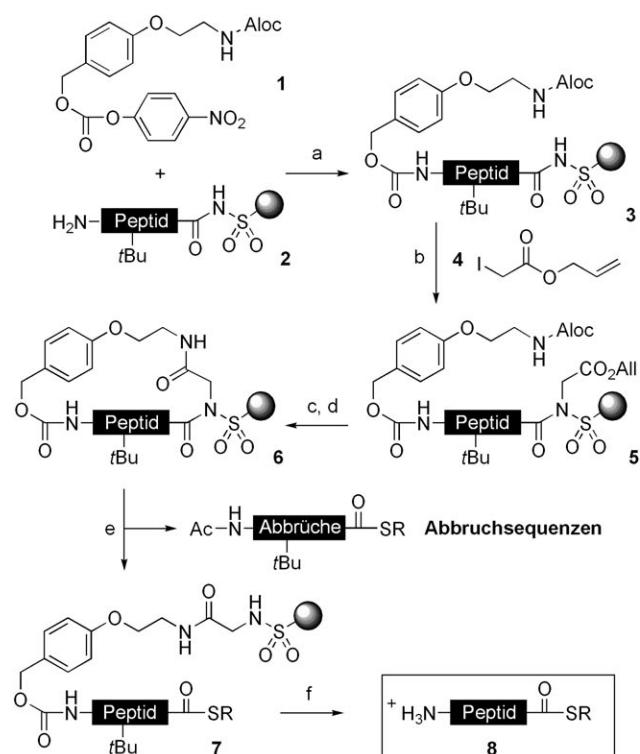


Festphasensynthese von C-terminalen Peptidthioestern mit Selbstreinigungseffekt**

Franziska Mende und Oliver Seitz*

Die chemische Proteinsynthese ermöglicht den selektiven Einbau von Markierungen und nichtproteinogenen Aminosäuren sowie posttranskriptionale Modifikationen und erleichtert damit die Untersuchung funktioneller Proteine.^[1] Den zuverlässigsten Zugang zu Proteinen und Proteindomänen bieten Fragmentverknüpfungstechniken, wobei die native chemische Ligation derzeit am häufigsten verwendet wird.^[2] Eine Voraussetzung dieser leistungsfähigen Verknüpfungsmethode ist der Zugang zu ungeschützten Peptidthioestern. Die verfügbaren Methoden der Thioester-Festphasensynthese sind jedoch in Bezug auf Ausbeuten und Reinheiten nicht mit den gängigen Synthesetechniken für Peptidsäuren und Peptidamide vergleichbar.^[3] Darüber hinaus schränkt die Notwendigkeit zusätzlicher Reaktionsschritte in Lösung die Automatisierungsfähigkeit der Peptidthioester-Synthese ein.

In Festphasenmethoden werden die N-geschützten Aminosäurebausteine in Richtung des N-Terminus aufgebaut. Daher enthalten Abbruchsequenzen, die aufgrund unvollständiger Kupplungsreaktionen angereichert werden, ebenfalls eine Thioesterstruktur. Jeder dieser reaktiven Ester kann Nebenreaktionen eingehen, was die Produktreinigung erschwert. Um die oft mühsame HPLC-Aufreinigung zu vermeiden und damit den direkten Einsatz der vom Harz abgespaltenen Peptidthioester in der nativen chemischen Ligation zu ermöglichen, konzipierten wir eine Methode zur selektiven Abspaltung des reinen Vollängenpeptidthioesters. Eine solche Methode würde die Anwendung der nativen chemischen Ligation in der divergenten Proteinsynthese, z.B. auf einem Chip, fördern. Angeregt durch Cyclisierungs-Abspaltungs-Protokolle zur Umkehr der Peptidorientierung am Syntheseharz^[4,5] vermuteten wir, dass eine Makrocyclisierung am Harz über den N-Terminus gefolgt von einer Ringöffnung durch Thiolyse den gewünschten Selbstreinigungseffekt liefern würde. Ein allgemeines Protokoll beginnt mit der Kupplung des Cyclisierungslinkers **1** an ein Sulfonamidharzgebundenes Peptid **2** (Schema 1).^[6,7] Die zunächst Allyloxy-carbonyl(Aloc)-geschützte Aminogruppe in **3** markiert das Vollängenpeptid für die nachfolgende Makrolactamisierung.



Schema 1. Fmoc-basierte Festphasensynthese von Peptidthioestern mit Selbstreinigungseffekt. a) **1**, 5 % NEt_3/DMF , b) Alkylierung: **4**, DIPEA, DMF, c) Desallylierung: Pd^0 , d) Makrolactamisierung: PyBOP, e) Thiolyse: RSH , f) TFA-Abspaltung. All = Allyl; DIPEA = Ethyldiisopropylamin; PyBOP = Benzotriazol-1-yl-oxytritypyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat.

Die Einführung der hierfür benötigten Carboxygruppe gelingt durch Alkylierung des N-Acylsulfonamids in **5** mit Iodessigsäureallylester **4**. Nach der Desallylierung wird durch Makrolactamisierung der Makrocyclus **6** aufgebaut. Die anschließende Umsetzung mit einem Mercaptan führt zur nucleophilen Spaltung des zuvor durch Alkylierung aktivierten Acylsulfonamids. Die Thiolyse bewirkt somit die Öffnung des Makrocyclus **6**. N-Acetylierte Abbruchsequenzen sind von der Einführung des Cyclisierungslinkers und damit auch von der Makrolactamisierung ausgenommen und gehen bei dieser Reaktion in Lösung. Der gewünschte Peptidthioester verbleibt an der Festphase (**7**) und wird durch Behandlung mit Trifluoressigsäure (TFA) freigesetzt. Bemerkenswerterweise ist die Makrolactamisierung kein absolutes Erfordernis, da der Selbstreinigungseffekt auch bei pseudo-intermolekularen Vernetzungen zum Tragen kommt.

[*] Dipl.-Chem. F. Mende, Prof. Dr. O. Seitz

Humboldt-Universität zu Berlin

Institut für Chemie

Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)

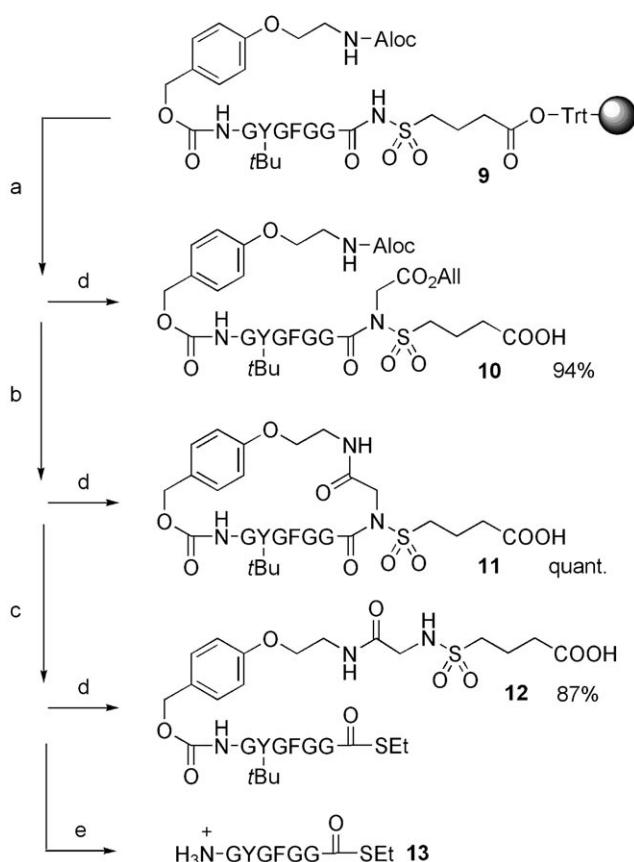
Fax: (+49) 30-2093-7266

E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

[**] Dieses Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

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

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen erfolgte an der Minimalsequenz des Knochenwachstumspeptids (OGP).^[8] Eine Doppellinkerstrategie sollte die notwendige Reaktionskontrolle vereinfachen.^[9] Wir entschieden uns daher, Ellmans Alkylsulfonamidlinker^[7] an das Tritylharz in **9** zu binden (Schema 2). Eine milde Acidolyse spaltet die



Schema 2. Doppellinkerstrategie: a) 8 M **4**, 2 M DIPEA, DMF; b) 1. 0.02 M [Pd(PPh₃)₄], DMB (0.2 M), CH₂Cl₂; 2. 0.1 M PyBOP, 0.1 M HOBT, 0.3 M DIPEA, CH₂Cl₂; c) 2 M EtSH, 0.12 M NaSPh, DMF; d) 1% TFA/CH₂Cl₂; e) TFA, m-Kresol, H₂O, EDT (87.5:5:2.5). EDT = 1,2-Ethandithiol; HOBT = 1-Hydroxy-1H-benzotriazol.

Tritylesterbindung, wodurch die Analyse und Quantifizierung der freigesetzten Peptidylsulfonamide **10–12** ermöglicht wurde. Die Synthese des Doppellinkerharzes, die Anbindung des Sulfonamids, der Aufbau der Peptidkette und die Einführung des Cyclisierungslinkers wurden gemäß gängiger Syntheseverfahren durchgeführt (siehe die Hintergrundinformationen). Der nächste Reaktionsschritt umfasste die Alkylierung des N-Acylsulfonamids in **9**, in der auch die für die Makrocyclisierung benötigte Carboxygruppe eingeführt wurde. Der dafür gewählte Iodessigsäureallylester ist weniger reaktiv als das gebräuchliche Iodacetonitril. Nichtsdestotrotz konnte mit einem Überschuss dieses elektrophilen Reagens eine

Alkylierungsausbeute von 94 % erzielt werden. Die simultane Spaltung der Aloc-Gruppe und des Allylesters erfolgte zunächst durch den Pd⁰-katalysierten Allyltransfer zu BH₃·Me₂NH.^[10] Das vollständige Entfernen des Boran-Amin-Adduktes erwies sich jedoch als schwierig, wie die Bildung von Dimethylamiden während der nachfolgenden Makrocyclisierung zeigte (siehe die Hintergrundinformationen). Der Gebrauch von *N,N'*-Dimethylbarbitursäure (DMB) als Kationenfänger war unproblematisch. Zweimaliges Behandeln des Harzes mit einer Lösung von PyBOP, HOBT und DIPEA in CH₂Cl₂ führte zur vollständigen Bildung des Makrocyclus **11**. Zur Thiolyse der aktivierten N-Acylsulfonamid-Bindung wurde **11** mit Ethanethiol in Gegenwart von NaSPh umgesetzt, wodurch der harzgebundene Peptidthioester **12** in 87 % Ausbeute gebildet wurde. Die abschließende Acidolyse mit TFA setzte den gewünschten Peptidthioester **13** frei.

Die optimierten Reaktionsbedingungen übertrugen wir auf die Verwendung des Sulfonamid-Aminomethyl(AM)-Harz als Einlinkersystem und untersuchten die Reinheit von Peptidthioestern, die mit der Cyclisierungs-Thiolyse-Sequenz hergestellt wurden. Zunächst wurde in einer Modellsynthese des OGP-Thioesters **13** die Bildung von Abbruchsequenzen erzwungen. Die HPLC-Analyse, die eine 97-proz. Reinheit des Rohthioesters **13** attestierte, lieferte den Beweis für den Selbstreinigungseffekt (siehe die Hintergrundinformationen). Zur Abschätzung der allgemeinen Anwendbarkeit der Methode wurden vier komplexere Peptide synthetisiert (Tabelle 1). Vergleichend erfolgte die Synthese der Peptidbenzylthioester nach der herkömmlichen Methode unter identischen Bedingungen für die Fmoc-Abspaltung, Aminosäurekupplung und Acetylierung und unter Nutzung von Iodacetonitril zur Aktivierung des Sulfonamidlinkers.^[11] Die Peptidsequenz **14** ist vom Segment 26–37 des ColE1-ROP-Proteins abgeleitet, das bereits von Kemp in der „Prior-thiol-capture“-Ligation verwendet wurde.^[12] Das nach der herkömmlichen Methode synthetisierte Rohprodukt **14** erforderte nicht nur wegen kleiner Mengen von Abbruchsequenzen eine Aufreinigung, sondern auch wegen Kontaminationen durch NaSPh aus der Thiolysereaktion (Abbildung 1 a). Nach präparativer HPLC wurde **14** in 8 % Ausbeute und 92 % Reinheit isoliert. Die Selbstreinigungsmethode lieferte den Rohpeptidthioester **14** in 20 % Gesamtausbeute und 97 % Reinheit (Abbildung 1 b).

Zur Prüfung der Leistungsfähigkeit der Selbstreinigungsmethode wurde eine schwierige Peptidsequenz synthetisiert. Wir entschieden uns für das Segment 12–37 des Rinderpankreas-Trypsin-Inhibitors (BPTI; **15**).^[13] Die HPLC-Analyse bestätigte die erwarteten Schwierigkeiten in der li-

Tabelle 1: Sequenzen und Ausbeuten der ausgewählten Peptidthioester.

Substrat	Peptidsequenz	M _w [Da] (gef.)	[M+H] ⁺ (gef.)	Ausbeute ^[a] [%]	Reinheit ^[b] [%]
13	GYGFGG ^{COEt}	600.4	601.3	38	97
14	LNEELDADEQADL ^{COSBzl}	1450.6	1451.6	20	99
15	GPCKARIIRYNAKAGLQCTFVYGG ^{COSBzl}	3001.5	3003.9	18	77
16	GATAVSEWTEYKTADGK ^{COSBzl}	1918.9	1919.8	3	54
17	AEYVRALFDNGNDEEDLPFKKG ^{COSBzl}	2780.3	2782.2	30	98

[a] Die Ausbeute wurde ausgehend von der Erstbeladung des Harzes berechnet. [b] Die Reinheit beruht auf HPLC und UV-Detektion bei 210 nm.

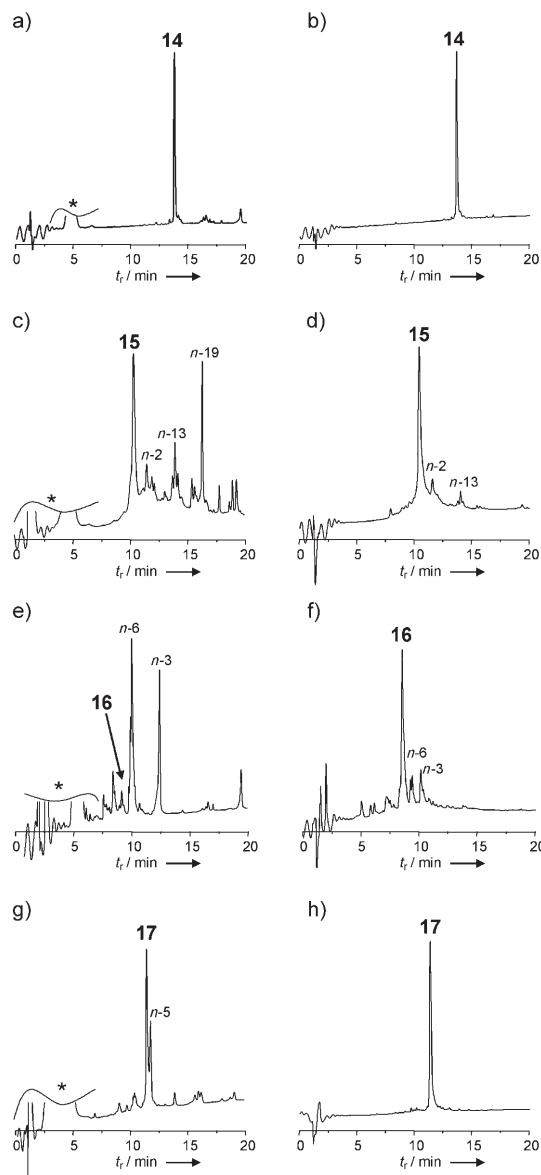


Abbildung 1. HPLC-Spuren der Rohprodukte für die Peptidthioester 14–17. a), c), e) und g) Synthese nach der herkömmlichen Methode (* NaSPh und DMF); b), d), f) und h) Peptidthioestersynthese mit Selbstreinigungseffekt.

nearen Synthese (Abbildung 1c): Große Mengen von Abbruchsequenzen wurden detektiert. Eine erhebliche Bandenverbreiterung erschwerte die Abtrennung der Nebenprodukte durch préparative HPLC. Die Reinigung des Peptidthioesters **15** wurde zudem durch das Auftreten cyclischer Thioester behindert, die sich während des langwierigen Reinigungsprozesses durch intramolekularen Thiolaustausch bildeten (siehe die Hintergrundinformationen). Aus diesem Grund wurde **15** in nur 6% Ausbeute und 68% Reinheit isoliert. Die Anwendung der Selbstreinigungsmethode löste einen Großteil der Probleme. So wurde die während der herkömmlichen Methode hauptsächlich gebildete (*n*-19)-Abbruchsequenz im isolierten Rohprodukt **15** nicht detek-

tiert (Abbildung 1d). Interessanterweise waren noch geringe Mengen der (*n*-2)- und (*n*-3)-Abbruchsequenzen nachweisbar. Wir nehmen an, dass die Abbruchsequenzen unlösliche Aggregate bilden, die durch routinemäßig in der Festphasensynthese angewendete Lösungsmittel nicht extrahiert werden. Gleichwohl wurde **15** nach der Cyclisierungs-Thiolyse-Strategie ohne weitere Aufreinigung in 18% Gesamtausbeute und in 77% Reinheit gewonnen, was die höhere Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens belegt.

Als anspruchvolleres Syntheseproblem untersuchten wir die Herstellung eines Fragments der WW-Domäne des Formin-bindenden Proteins 28 (FBP28).^[14] Die Synthese dieser extrem schwierigen, 37 Aminosäureresten langen Peptidsequenz ist mit herkömmlichen Fmoc-geschützten Aminosäurebausteinen nicht möglich.^[15] Unser Versuch, den Thioester des N-terminalen Fragments G¹-K¹⁷ (**16**) durch lineare Festphasensynthese aufzubauen, schlug ebenfalls fehl. Thioester **16** konnte durch HPLC/MS-Analyse nur in Spuren als Teil einer komplexen Mischung von Abbruchsequenzen detektiert werden (Abbildung 1e). Dagegen führte die Selbstreinigungsmethode zu einem Rohprodukt, das eine genügende Reinheit aufwies, um einen Einsatz in Ligationsreaktionen zu erwägen (Abbildung 1f).

Kürzlich stellten Camarero und Mitarbeiter die Synthese von Peptidthioestern am Hydrazinlinker vor.^[16] So wurde auch der Peptidthioester **17** aufgebaut, der den ersten 23 Aminosäuren der N-terminalen SH3-Domäne des c-Crk-Adapterproteins entspricht.^[17] Bei der linearen Synthese des Peptidthioesters **17** am Sulfonamidharz erhielten wir das gewünschte Produkt, das durch eine (*n*-5)-Abbruchsequenz kontaminiert war (Abbildung 1g). Nach HPLC-Aufreinigung wurde der Thioester **17** in 13% Ausbeute und 95% Reinheit isoliert. Die Cyclisierungs-Thiolyse-Strategie eröffnete dagegen einen direkten Zugang zu Thioester **17** in 98% Reinheit (Abbildung 1h). Da kein préparativer HPLC-Schritt erforderlich war, konnte der Peptidthioester **17** schneller und in höherer Ausbeute (30%) synthetisiert werden.

Den direkten Einsatz des Peptidthioester-Rohprodukts untersuchten wir in der nativen chemischen Ligation des 23mer-Thioesters **17** mit dem C-terminalen Segment der SH3-Domäne **18** (c-Crk, Reste 157–191, CIL-RIRDKPEEQWWNAEDSEGKRGMPVPYVEKYG; siehe die Hintergrundinformationen). Der N-terminale Aspartatrest wurde durch Cystein ersetzt, um die Ligation zu ermöglichen. Zur Ligation wurden die Peptide **17** und **18** in einem mit Argon gesättigten Phosphatpuffer, der 6M Guanidinium-Hydrochlorid und 100 mM NaH₂PO₄ bei pH 7.5 enthielt, in 1 mM Konzentration gelöst. Zur Aufrechterhaltung reduzierender Bedingungen und zur Reaktionsbeschleunigung wurden Benzylmercaptan (1%), Thiophenol (3%) und 20 mM TCEP zugesetzt. Nach 15 h war die Ligation nahezu abgeschlossen (Abbildung 2). Die anschließende HPLC-Reinigung lieferte die reine synthetische SH3-Domäne in 53% Ausbeute. Die durch MALDI-TOF-MS-Analyse ermittelte Molmasse von *m/z* 6851.5 stimmt mit der berechneten Masse für [M+H]⁺ überein (6850.6).

Keine der zuvor dokumentierten Fmoc-basierten Festphasensynthesen von Peptidthioestern ermöglicht eine Selbstreinigung.^[18] In den häufig verwendeten Methoden er-

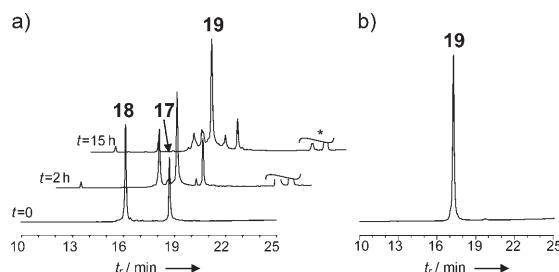


Abbildung 2. a) HPLC-Spuren der Verknüpfung von **17** und **18** nach 0 h, 2 h, 15 h (* Thiole); b) HPLC-Spur der aufgereinigten Proteindomäne **19**.

folgt die Einführung der Thioesterfunktion in einer der letzten Stufen nach dem Aufbau des Peptids. Beispielsweise ist die Synthese von Thioestern an geschützten Peptidsäuren ein geläufiger Ansatz. Doch die Notwendigkeit zusätzlicher Reaktionen in Lösung, die aufwändige Reinigung der geschützten Peptide und die mögliche Racemisierung der C-terminalen Aminosäure lassen diese Methode mühsam erscheinen.^[19] Einen direkteren Zugang zu Peptidthioestern eröffnen Techniken, die die Freisetzung vom Harz mit der Thioesterbildung kombinieren, wie es durch die Behandlung polymergebundener Peptidester mit Alkylaluminiumthiolaten gelingt.^[13] Als Nebenreaktionen wurden die Entstehung von Aspartimidien und Seitenketenthioestern diskutiert. Die oxidative Aktivierung von Peptidhydraziden mit anschließender Aminolyse stellt eine interessante Alternative dar.^[16] Diese Strategie benötigt vorher synthetisierte Aminosäure-thioester. Die am häufigsten verwendete Methode beruht auf der Aktivierung des Sulfonamid-„Safety-catch“-Linkers durch Alkylierung und anschließende Thiolyse.^[11] Das abschließende Entschützen der Aminosäureseitenketten erfolgt jedoch wie bei der Synthese am Hydrazinlinker in Lösung. Im Unterschied dazu sind in der hier vorgestellten Methode keine zeitaufwändigen Reaktionen in Lösung erforderlich. Das wichtigste Charakteristikum des Cyclisierungs-Thiolyse-Ansatzes ist der Selbstreinigungseffekt. Die Anwendung dieser Technik bedarf lediglich zweier zusätzlicher Kuppelungsreaktionen an der festen Phase, die leicht in die Protokolle automatisierter Synthesen integriert werden können. Dennoch offenbarten die Synthesen der schwierigen Peptide von BPTI und FBP28, dass unlösliche Abbruchsequenzen nach wie vor ein Problem darstellen. Wiederholte Lösungsmittelextraktionen nach der Thiolyse reduzierten zwar ihren Gehalt (siehe die Hintergrundinformationen), eine komplette Entfernung der Abbruchsegmente gelang jedoch nicht. Es sollte allerdings möglich sein, die Reinheit solcher problematischen Peptide durch eine Optimierung von Lösungsmitteln oder Harzen zu erhöhen.

Die Ergebnisse von fünf Synthesen demonstrieren die Wirksamkeit des Cyclisierungs-Thiolyse-Ansatzes. Die Produkte wurden so in besserer Ausbeute und Reinheit erhalten als durch das herkömmliche Syntheseverfahren am Sulfonamid-Harz. Andere Reinigungsschritte als Etherfällung sind nur für schwierige Sequenzen vonnöten, die unlösliche Abbruchsequenzen bilden. Der Aufbau der SH3-Domäne (134–

191) des c-Crk-Proteins zeigte, dass die abgespaltenen Peptidthioester direkt in der nativen chemischen Ligation eingesetzt werden können. Zukünftig werden wir die Selbstreinigungsmethode im Parallelformat erproben, um die Synthese von Protein-Arrays durch divergente Segmentverknüpfung zu ermöglichen.

Eingegangen am 26. Januar 2007
Online veröffentlicht am 3. Mai 2007

Stichwörter: Cyclisierungen · Festphasensynthesen · Native chemische Ligation · Peptidthioester

- [1] Ausgewählte Übersichten: a) P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960; b) B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 91–118.
- [2] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779; b) T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129–149.
- [3] G. B. Fields, J. L. Lauer-Fields, R. Liu, G. Barany, in *Synthetic Peptides: A User's Guide*, 2. Aufl. (Hrsg.: G. A. Grant), Oxford University Press, New York, **2002**, S. 93–219.
- [4] a) R. S. Kania, R. N. Zuckermann, C. K. Marlowe, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8835–8836; b) U. Hoffmüller, M. Russwurm, F. Kleinjung, J. Ashurst, H. Oschkinat, R. Volkmer-Engert, D. Koesling, J. Schneider-Mergener, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2180–2184; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2000–2004.
- [5] Eine Selbstreinigung wurde für die Synthese von Peptidsäuren und Peptidamiden beschrieben: a) M. Davies, M. Bradley, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1135–1138; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1097–1099; b) M. Davies, M. Bradley, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4733–4746.
- [6] G. W. M. Kenner, J. R. McDermott, Sheppard, R. C. Sheppard, *Chem. Commun.* **1971**, 636–637.
- [7] B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322–2330.
- [8] Y. C. Chen, A. Muhlrad, A. Shteyer, M. Vidson, I. Bab, M. Choren, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1624–1632.
- [9] a) M. S. Congreve, S. V. Ley, J. J. Scicinski, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1768–1776; b) S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1677–1681; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1650–1654.
- [10] P. Gomez-Martinez, M. Dessolin, F. Guibe, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, 2871–2874.
- [11] R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11369–11374.
- [12] D. S. Kemp, R. I. Carey, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2216–2222.
- [13] Diese Sequenz wurde in einer früheren Fmoc-basierten Thioestersynthese von Sewing und Hilvert umfasst: a) D. Swinnen, D. Hilvert, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2439–2442; b) A. Sewing, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3503–3505; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3395–3396.
- [14] D. C. Chan, M. T. Bedford, P. Leder, *EMBO J.* **1996**, *15*, 1045–1054.
- [15] a) S. Tremmel, M. Beyermann, H. Oschkinat, M. Bienert, D. Naumann, H. Fabian, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4707–4711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4631–4635; b) I. Coin, R. Dolling, E. Krause, M. Bienert, M. Beyermann, C. D. Sferdean, L. A. Carpinio, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6171–6177.
- [16] J. A. Camarero, B. J. Hackel, J. J. de Yoreo, A. R. Mitchell, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4145–4151.
- [17] X. D. Wu, B. Knudsen, S. M. Feller, J. Zheng, A. Sali, D. Cowburn, H. Hanafusa, J. Kuriyan, *Structure* **1995**, *3*, 215–226.

- [18] Fmoc-Abspaltungsbedingungen wurden auf Thioesterlinker abgestimmt: a) X. Q. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8669–8672; b) X. Z. Bu, G. Y. Xie, C. W. Law, Z. H. Guo, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2419–2422; c) J. Brask, F. Albericio, K. J. Jensen, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2951–2953; d) T. Kawakami, M. Sumida, K. Nakamura, T. Vorherr, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8805–8807.
-
- [19] a) S. Futaki, K. Sogawa, J. Maruyama, T. Asahara, M. Niwa, H. Hojo, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6237–6240; b) R. von Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3551–3554; c) L. Li, P. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 29–32; d) J. Alsina, T. S. Yokum, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8761–8769.