

Native chemische Verknüpfung mit Valin

Christian Haase, Heike Rohde und Oliver Seitz*

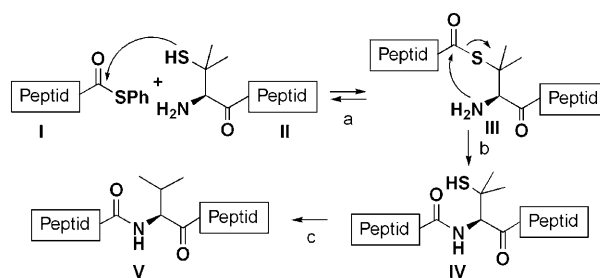
Unter den Verfahren, die zur Peptidsegmentkupplung verwendet werden,^[1] bietet die native chemische Verknüpfung (NCL) das größte Potenzial.^[2] Sie ist ein leistungsfähiges Werkzeug für die Synthese von markierten und posttranslational modifizierten Proteinen sowie von Proteinen mit nichtproteinogenen Aminosäuren,^[3] bei der ein ungeschützter C-terminaler Peptidthioester mit einem N-terminalen Cysteinrest reagiert. Die Notwendigkeit für die vergleichsweise seltene Aminosäure Cystein schränkt die Anwendbarkeit der nativen chemischen Verknüpfung in der Synthese natürlicher Proteine jedoch ein. Es wurden daher zahlreiche alternative Strategien entwickelt, um Zugänge zu anderen, häufiger auftretenden Verknüpfungsstellen zu eröffnen.^[4]

Die erweiterte native chemische Verknüpfung basiert auf abspaltbaren Hilfsgruppen, die N-terminal an das Peptidfragment angebracht werden und das Cysteingerüst nachahmen.^[5] Die acidolytische Entfernung dieser Hilfsgruppen nach der Ligation gelingt, wenn elektronenreiche aromatische Ringsysteme einbezogen werden.^[5c–k] Glycin-Glycin-Peptidbindungen werden im Allgemeinen problemlos gebildet. Sobald jedoch der sterische Anspruch an der Verknüpfungsstelle zunimmt, sinkt die Reaktivität des sekundären Amins. Kupplungen mit sterisch anspruchsvollen Aminosäuren, wie etwa Valin oder Isoleucin, gelangen daher bis jetzt nicht. Vor kurzem wurde die zuckervermittelte Peptidverknüpfung beschrieben, die von besonderem Interesse für die Synthese von Glycopeptiden ist.^[6]

In einem konzeptionell verschiedenen Ansatz wird auf die Verwendung wenig reaktiver sekundärer Amine verzichtet; vielmehr wird auf Aminosäuren mit einer Sulfanylfunktion in der Seitenkette zurückgegriffen und diese nach erfolgter Kupplung entfernt. So wurde Cystein in einer konventionellen nativen chemischen Verknüpfung eingesetzt und durch einen großen Überschuss an Metallreagentien in das sehr häufige Alanin überführt.^[7] Die unerwünschte Entschwefelung anderer Cysteinreste kann hierbei durch geschickte Wahl der Schutzgruppen vermieden werden.^[7b] Das Repertoire dieses Verknüpfungs-Entschwefelungs-Ansatzes wurde kürzlich auf Phenylalanin erweitert.^[8] Der hierfür notwendige Synthesebaustein β -Sulfanyphenylalanin musste jedoch erst durch eine mehrstufige Synthese bereitgestellt werden.

Wir beschreiben nun die Verwendung von Penicillamin (Pen) als Vorstufe von Valin in der Verknüpfungs-Ent-

schwefelungs-Strategie (Schema 1). β,β -Dimethylcystein ist in verschiedenartig geschützten Formen kommerziell verfügbar und kann in der Peptid-Festphasensynthese direkt eingesetzt



Schema 1. Native chemische Verknüpfung mit Valin. Das β,β -Dimethylcystein am N-Terminus des Penicillamin-Peptids II induziert den Thiolaustausch mit dem Peptid I (Schritt a), der das Thioesterintermediat III liefert. Durch den nachfolgenden S \rightarrow N-Acyltransfer entsteht die Peptidbindung in IV (Schritt b). Die Entschwefelung (Schritt c) stellt das Valin-Peptid V zur Verfügung.

werden. Unsere Untersuchungen ergaben, dass die Verknüpfung mit Penicillamin trotz des hohen sterischen Anspruchs der Methylgruppen in Nachbarschaft des Thiols überraschend schnell verläuft. Sogar Leu-Val-Abfolgen, die in hydrophoben Abschnitten von Peptiden auftreten, waren zugänglich. Zusätzlich präsentieren wir unsere verbesserte Methode zur metallfreien Entschwefelung und zeigen die Anwendung in der Synthese Valin-haltiger Peptide.

Da wir annahmen, dass der sterische Anspruch der Methylgruppen des Penicillamins eine Herausforderung darstellt, interessierte uns zuerst die Kinetik von Reaktionen bereits untersuchter Modellpeptide.^[9] Das Penicillamin-Modellpeptid Pen-Arg-Ala-Glu-Tyr-Ser-NH₂ (**1**, Schema 2) wurde durch Fmoc-basierte Festphasensynthese hergestellt, wobei ein Boc/Trt-geschützter Penicillamin-Monomerbaustein verwendet wurde (siehe die Hintergrundinformationen). Anschließend wurde seine Verknüpfung mit Glycin als

- 1: Pen-Arg-Ala-Glu-Tyr-Ser-NH₂
- 2: Leu-Tyr-Lys-Ala-Gly-SCH₂CH₂CONH₂
- 3: Leu-Tyr-Lys-Ala-His-SCH₂CH₂CONHCHCONH₂
- 4: Leu-Tyr-Lys-Ala-Met-SCH₂CH₂CONHCHCONH₂
- 5: Leu-Tyr-Lys-Ala-Leu-SCH₂CH₂CONHCHCONH₂
- 6: Ac-Thr-Leu-Gln-Asn-Arg-Glu-His-Glu-Thr-Asn-Gly-SBn
- 7: Pen-Ala-Lys-Ser-Asp-Gln-Lys-Gln-Glu-Gln-Leu-NH₂
- 8: Ac-Leu-Lys-Lys-Pro-Phe-Asn-Arg-Pro-Gln-Gly-SBn
- 9: Pen-Gln-Pro-Lys-Thr-Gly-Pro-Phe-Glu-Asp-Leu-Lys-NH₂
- 10: Val-Arg-Ala-Glu-Tyr-Ser-NH₂

Schema 2. Peptide 1–10 für die Untersuchung der Penicillamin-Verknüpfung.

[*] Dipl.-Biochem. C. Haase, Dipl.-Chem. H. Rohde, 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



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801590> zu finden.

sterisch anspruchsloser Aminosäure am Peptidthioester Leu-Tyr-Lys-Ala-Gly-SR (**2**) untersucht.

Die Peptide wurden in 5 mM Konzentration in einem wässrigen Phosphatpuffer gelöst, der Guanidiumhydrochlorid (GnHCl) als denaturierendes und Triscarboxyethylphosphan (TCEP) als reduzierendes Reagens enthielt. Natriumsulfanylethansulfonat, Benzylthiol und/oder Thiophenol wurden zur In-situ-Bildung reaktiverer Thioester zugesetzt. Der Verlauf der Verknüpfungsreaktion wurde durch HPLC-MS-Analytik überwacht, mit der alle Reaktionsprodukte akkurat erfasst werden konnten (Abbildung 1). Die höchsten Anfangsgeschwindigkeiten wurden im wässrigen Phosphatpuffer-

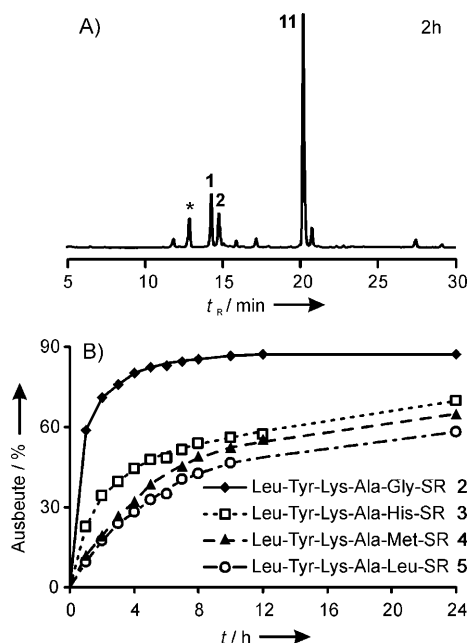


Abbildung 1. Anwendungsbreite der Penicillamin-vermittelten Verknüpfung. A) Repräsentative HPLC-Spur für die Kupplung von **1** mit **2** nach zwei Stunden (*: hydrolysiertes Thioester). B) Zeitverlauf der Produktbildung bei der Verknüpfung von **1** mit den Thioestern **2**, **3**, **4** oder **5**. Ligationsbedingungen: 5 mM **1**, 5 mM Peptidthioester, 6 M GnHCl, 100 mM NaH₂PO₄, 50 mM TCEP, 5% PhSH, pH 8.5, 37°C. Nach 3, 6, 9 und 12 Stunden wurde jeweils eine Pufferlösung (8 Vol.-% des Anfangsreaktionsvolumens) zugegeben, die 0.5 M TCEP, 6 M GnHCl, 200 mM NaH₂PO₄ und PhSH enthielt.

ersystem erzielt, das Thiophenol als alleiniges Thioladditiv enthielt. Die Analyse der HPLC-Daten deutete auf die Bildung des symmetrischen Disulfids und auf das Schwinden des Thiophenols hin. Daher wurden nach 3, 6, 9 und 12 Stunden erneut TCEP und Thiophenol zugesetzt. Die Verknüpfung verlief unter diesen Bedingungen mit beachtlicher Geschwindigkeit und lieferte bereits nach einer Stunde 60% Produkt. Nach Ablauf von zwölf Stunden waren 87% Verknüpfungsprodukt gebildet. Um die Möglichkeit einer direkten Reaktion des Thioesters mit der α -Aminofunktion des Penicillamin-Peptids **1** auszuschließen, synthetisierten wir das zu **1** analoge Valin-Peptid **10**. Unter den Reaktionsbedingungen der Verknüpfung der Peptide **1** und **2** konnte bei Inkubation dieses Peptids mit dem Peptidthioester **2** keine Produktbildung beobachtet werden (siehe Abbildung S2). Damit ist die Bedeutung der Thiofunktion in Penicillamin für die Verknüpfung belegt.

Die Ergebnisse bestärkten uns darin, Verknüpfungen mit Peptidthioestern höheren sterischen Anspruchs zu untersuchen. Der Peptidylhistidinthioester Leu-Tyr-Lys-Ala-His-SR (**3**) reagierte leicht (Abbildung 2) und lieferte das Verknüpfungsprodukt **12** in 70% Ausbeute (Tabelle 1). Daneben wurde in geringer Menge (maximal 8%) auch ein epimerisiertes Produkt gebildet (siehe Abbildung S3). Dieses Verhalten von Histidinthioestern – hohe Reaktivität in Verknüpfungs- und Racemisierungsreaktionen – ist bekannt.^[9] Die Verknüpfung des Peptidylmethioninthioesters **4** mit dem Penicillamin-Peptid **1** verlief glatt; nach 24 h betrug die Ausbeute 65%. Sorgfältige HPLC-Analytik deckte auch hier einen geringfügigen Anteil an Racemisierung auf (weniger als 4%), der sich auf 2% reduzieren ließ, wenn die Verknüpfung bei pH 7.5 geführt wurde (siehe Tabelle S1). Im Anschluss untersuchen wir die sterisch anspruchsvolle Kupplung des Peptidylleucinthioesters **5** mit **1**. Zu unserer Überraschung war die Anfangsgeschwindigkeit lediglich um das Sechsfache geringer als bei der Verknüpfung von **1** mit dem Peptidylglycynthioester **2**. Die Ausbeute ließ sich durch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 48 Stunden bis auf 70% steigern. Eine weitere Erhöhung auf 80% Ausbeute war durch die Verdopplung der Menge des eingesetzten Thioesters **5** möglich. Eine Racemisierung war nicht augenscheinlich.

Die Vielseitigkeit der Penicillamin-vermittelten Kupplung wurde durch die Synthese der längeren Peptidsequenzen

Tabelle 1: Ausbeuten der Kupplungen und Entschwefelungen.

Penicillamin-Peptid	Peptid-thioester	Verknüpfungsreaktion Produkt/Ausbeute [%]/Reaktionszeit [h]	Entschwefelungsprodukt	Entschwefelungsausbeute [%] metallbasiert metallfrei	
1	2	LYKAGPenRAEYS 11 /87/12	LYKAGVRAEYS 17	61	98
1	3	LYKAHPenRAEYS 12 /70/24	LYKAHVRAEYS 18	–	93
1	4	LYKAMPenRAEYS 13 /65/24	LYKAMVRAEYS 19	–	77
1	5	LYKALPenRAEYS 14 /70 ^[a] und 82 ^[b] /48	LYKALVRAEYS 20	–	79
7	6	TLQNHREHETNGPenAKSDQKQEQL 15 /78 ^[c] /24	LKKPFNRPQGVQPKTGPFEDLK 21	0 ^[d]	72
9	8	LKKPFNRPQGVQPKTGPFEDLK 16 /87 ^[c] /24	TLQNHREHETNGVAKSDQKQEQL 22	54	91
10	2	LYKAGVRAEYS 17 /0 ^[e]	–	–	–

[a] Mit einem Äquivalent Peptidthioester **5**. [b] Mit zwei Äquivalenten **5**. [c] Die Penicillamin-Peptide wurden in 1.3- bis 1.4-fachem Überschuss eingesetzt. [d] Nach 8 h Reaktionszeit konnte weder das Startmaterial noch das Produkt isoliert werden. [e] Es erfolgte keine direkte Verknüpfung der Fragmente. Die Bedeutung der Einbuchstaben-Codes kann beispielsweise unter <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/AA1n2.html> gefunden werden.

15 und **16** belegt. Hierbei handelt es sich um Segmente der Signaltransduktionsproteine STAT-1 bzw. Syk-Kinase. Die Synthese des Abschnitts 176–197 von STAT-1 (**15**) wurde wie für die Peptide **11–14** beschrieben durchgeführt. Die HPLC-Analyse ergab, dass der Peptidthioester **6** durch einen 1.4fachen Überschuss des Penicillamin-Peptids **7** nahezu quantitativ in das Kupplungsprodukt **15** überführt wurde (Abbildung S6). Die Verknüpfung des Peptidthioesters **8** mit dem Penicillamin-Peptid **9** lieferte das 22mere Syk-Kinase-Peptid **16** bei fast vollständigem Umsatz. Dazu wurde **9** in 1.3fachem Überschuss eingesetzt.

Das nächste Ziel war die Überführung der Penicillylreste in den Verknüpfungsprodukten in Valinreste. Zunächst versuchten wir, die überschüssigen Schwefelatome mithilfe bekannter metallbasierter Methoden zu entfernen. Hierzu wurden die Verknüpfungsprodukte in 20-proz. Essig gelöst und mit Raney-Nickel in großem Überschuss behandelt. Die Ausbeuten waren mäßig; sie betrugen 61 % für das Modellpeptid **11** und 54 % für das Syk-Kinase-Segment **16** und konnten durch eine Verlängerung der Reaktionszeit nicht erhöht werden. Unsere Versuche, die Thiofunktion aus dem STAT-1-Peptidsegment **15** zu entfernen, schlugen sogar vollständig fehl: Weder war es möglich, **15** zu entschwefeln, noch gelang die Rückgewinnung des Startmaterials. Offenbar verblieb das Peptid an der Metalloberfläche adsorbiert und konnte auch durch mehrfache Extraktionsversuche mit Trifluoressigsäure nicht zurückerhalten werden.

Kürzlich beschrieben Wan und Danishefsky eine Methode zur metallfreien Entschwefelung von Peptiden,^[10] bei der ein wasserlöslicher Radikalstarter ein Wasserstoffatom der Cystein-Thiofunktion abstrahiert und die anschließende Reduktion durch TCEP ein Alanylradikal liefert.^[11] Dieses Alkylradikal empfängt ein Wasserstoffatom von einer Thiolgruppe eines nicht umgesetzten Cystein-Peptids oder von EtSH oder *t*BuSH, die zur Beschleunigung der Produktbildung zugesetzt werden. Unter den beschriebenen Bedingungen (VA-044, TCEP, EtSH und *t*BuSH) gelang die Entschwefelung des Penicillamin-Peptids **11** zu **17**. Jedoch wurden auch zahlreiche Nebenprodukte gebildet. Wir nahmen an, dass Hydridtransferprozesse am Penicillamin langsamer ablaufen als am Cystein. Zur Beschleunigung der Thylradikalbildung wurden die Reaktionstemperatur und die Menge des Radikalstarters VA-044 erhöht. Außerdem wurde Glutathion zur Sättigung der sich bildenden Valylradikale eingesetzt, da dieser wirksame Wasserstoffdonor^[12] rascher mit tertiären Alkylradikalen reagiert als die zudem unangenehm geruchsintensiven Thiole EtSH und/oder *t*BuSH. Die Umsetzungen wurden bei einer Peptidkonzentration von 1–2 mM bei pH 6.5 in einem wässrigen Phosphatpuffersystem (100 mM) durchgeführt, das 250 mM TCEP, 200 mM VA-044, 40 mM Glutathion und 3 M GnHCl enthielt. Die Reaktionen verliefen glatt, und der Umsatz war nach 2.5 h vollständig (Abbildung 2). Die Penicillamin-haltigen Peptide **11** und **16** wurden in die entsprechenden Valin-haltigen Peptide **17** bzw. **22** in 98 bzw. 91 % Ausbeute überführt (Tabelle 1). Sogar das STAT-1-Peptidsegment **15**, dessen Thiolgruppe metallbasiert nicht entfernt werden konnte, ließ sich in das Valin-Produkt (**21**) überführen. Die Entschwefelungen der Penicillamin-Peptide **12** und **14** verliefen ebenfalls ohne Komplikationen.

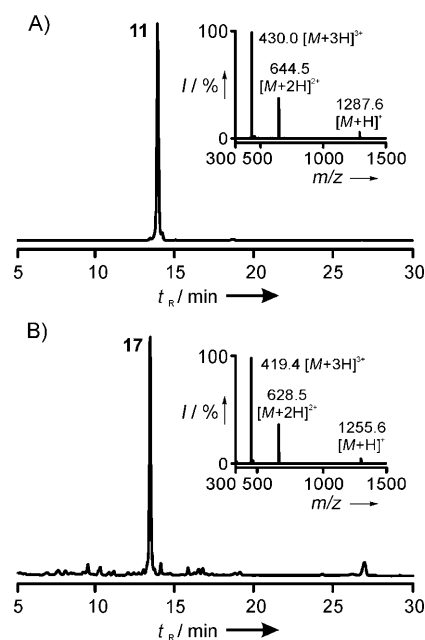


Abbildung 2. Metallfreie Entschwefelung des Penicillamin enthaltenden Peptids Leu-Tyr-Lys-Ala-Gly-Pen-Arg-Ala-Glu-Tyr-Ser-NH₂ (**11**). HPLC-Spuren A) vor und B) nach 150 min Reaktionszeit. Die eingefügten ESI-Massenspektren belegen den Erfolg der Entschwefelung. Bedingungen: 5 mM **11**, 3 M GnHCl, 100 mM NaH₂PO₄, 200 mM VA-044, 250 mM TCEP, 40 mM Glutathion, 65 °C, pH 6.5.

Im Fall des Methionin-haltigen Peptids **13** wurde bei 65 °C die Oxidation der Thioetherfunktion als Begleiterscheinung beobachtet. Diese Nebenreaktion konnte durch Senken der Reaktionstemperatur auf 37 °C unterdrückt werden. Unter diesen Bedingungen war die Umwandlung in das Valin-Peptid **19** nach 6 h abgeschlossen.

Die native chemische Verknüpfung ist eine der wenigen chemischen Methoden – wenn nicht sogar die einzige –, mit der die Synthese von Proteinen einer Komplexität gelingt, die sonst nur unter Zuhilfenahme rekombinanter Verfahren erreichbar ist.^[13] In ihrer ursprünglichen Form eröffnet die Methode den Zugang zu Xaa-Cys-Abfolgen (Xaa = jede Aminosäure außer Prolin). Auxiliar-basierte Verfahren erweitern den Spielraum und ermöglichen die Knüpfung von Gly-Gly-, Gly-Ala-, Gly-Gln-, Gly-Asp-, Gly-His-, Ala-Gly-, Lys-Gly-, His-Gly-, Phe-Gly-, Pro-Gly-, His-His-, His-Ala-, Ala-His- und Ala-Asp-Peptidbindungen.^[5] Jedoch werden dabei kommerziell nicht verfügbare Synthesebausteine benötigt. Die häufig vorkommenden Xaa-Ala-Bindungen können durch eine Kombination aus nativer chemischer Peptidkupplung und Entschwefelung geknüpft werden.^[7] Ein Vorteil dieses zweistufigen Verfahrens ist, dass gewöhnliche Aminosäurebausteine verwendet werden können. Die Synthese von β -Sulfanyphenylalanin hat den Zugang zu Xaa-Phe-Verknüpfungen eröffnet.^[8] Die hier vorgestellten Arbeiten demonstrieren die Verwendung von Penicillamin als Vorstufe für Valin in der Verknüpfungs-Entschwefelungs-Strategie. Valin ist eine häufig vorkommende Aminosäure (6.6% durchschnittlicher Gehalt in Proteinen). Die Verfügbarkeit geeigneter geschützter Penicillamin-Synthesebausteine

und im Besonderen die Möglichkeit von Kupplungen in hydrophoben Peptidsegmenten werden als vorteilhaft erachtet.

Die beschriebenen Kupplungen mit Glycin-, Histidin-, Methionin- und Leucinthioestern deuten eine breite Anwendbarkeit der Methode an, sodass fast alle Xaa-Val-Peptidbindungen auf diesem Weg zugänglich werden könnten. In künftigen Experimenten wird geklärt werden, ob sterisch stark gehinderte Val-Val- oder Ile-Val-Verknüpfungen gelingen. Der belegte Zugang zu Leu-Val-Motiven könnte für die Synthese von Transmembranproteinen interessant sein. Allerdings macht sich bei langen Reaktionszeiten die Epimerisierung reaktiver Thioester störend bemerkbar. Dies ist jedoch ein Charakteristikum aller Reaktionen an Thioestern. Teil der vorgestellten Verknüpfungs-Entschwefelungs-Strategie ist außerdem eine optimierte Variante der metallfreien Entfernung von Thiolgruppen aus Peptiden. Glutathion wurde anstelle der weniger effektiven und übelriechenden Thiole EtSH und *t*BuSH als Wasserstoffquelle eingesetzt. In Anbetracht der Verfügbarkeit dieses preiswerten Reagens in biologisch-chemischen und bioorganisch orientierten Laboratorien schlagen wir Glutathion als Reagens der Wahl für metallfreie Entschwefelungsreaktionen vor.

Wir haben hier eine Erweiterung der Bandbreite der nativen chemischen Verknüpfung vorgestellt, indem wir den Zugang zu hydrophoben Kupplungsstellen eröffneten. Die sorgfältige Optimierung der Kupplungs- und Entschwefelungsbedingungen ermöglichte den Einsatz der β -Sulfanylaminosäure Penicillamin in der Verknüpfungs-Entschwefelungs-Strategie. Es sind hierbei keine speziellen Synthesebausteine oder gefährlichen Substanzen vonnöten, was die Anwendung dieser neuen Option der Peptidsynthese befördern sollte.

Eingegangen am 4. April 2008

Online veröffentlicht am 14. Juli 2008

Stichwörter: Entschwefelung · Native chemische Ligation · Penicillamine · Peptidverknüpfungen · Valin

[1] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 91–118.

[2] a) T. Wieland, E. Bokermann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebig's Ann. Chem.* **1953**, 583, 129–149; b) P. E. Dawson,

T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.

[3] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960.

[4] C. Haase, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1575–1579; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1553–1556.

[5] a) L. E. Canne, S. J. Bark, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5891–5896; b) J. Offer, P. E. Dawson, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 23–26; c) C. Marini, S. J. Bark, J. Offer, P. E. Dawson, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2323–2328; d) G. Chen, J. D. Warren, J. Chen, B. Wu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7460–7462; e) T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1403–1405; f) P. Botti, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1831–1833; g) J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4642–4646; h) C. Marini, J. Offer, R. Longhi, P. E. Dawson, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2749–2757; i) S. Tchertchian, O. Hartley, P. Botti, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9208–9214; j) D. Macmillan, D. W. Anderson, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4659–4662; k) B. Wu, J. Chen, J. D. Warren, G. Chen, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4222–4231; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4116–4125; l) M. Y. Lutsky, N. Nepomniaschiy, A. Brik, *Chem. Commun.* **2008**, 1229–1231.

[6] a) A. Brik, Y. Y. Yang, S. Ficht, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5626–5627; b) S. Ficht, R. J. Payne, A. Brik, C. H. Wong, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6079–6083; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5975–5979; c) R. J. Payne, S. Ficht, S. Tang, A. Brik, Y. Y. Yang, D. A. Case, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13527–13536.

[7] a) L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526–533; b) B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 687–690.

[8] a) P. Botti, S. Tchertchian, WO 2006/133962, **2006**; b) D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10064–10065.

[9] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10068–10073.

[10] a) Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9408–9412; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252.

[11] a) C. Walling, R. Rabinowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5326; b) A. González, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2761–2764; c) J. Cuesta, G. Arsequell, G. Valencia, A. González, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2643–2646; d) G. Arsequell, A. González, G. Valencia, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2685–2687.

[12] a) C. Chatgililoglu, *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 2387–2398; b) C. Chatgililoglu, C. Ferreri, R. Bazzanini, M. Guerra, S. Y. Choi, C. J. Emanuel, J. H. Horner, M. Newcomb, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9525–9533.

[13] V. Y. Torbeev, S. B. H. Kent, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1697–1700; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1667–1670.