

# 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-basierte Festphasensynthese von $\alpha$ -Peptidthioestern

Franziska Mende und Oliver Seitz\*

Festphasensynthesen · Peptide · Peptidsegmentkondensation · Peptidthioester · Synthesemethoden

Professor Horst Kunz zum  
70. Geburtstag gewidmet

**P**eptidthioester sind Schlüsselverbindungen in der konvergenten Proteinsynthese, wie es die native chemische Verknüpfung, die spurlose Staudinger-Verknüpfung und die  $\text{Ag}^+$ -vermittelte Thioesterverknüpfung beispielhaft belegen. Den zuverlässigsten Zugang zu Peptidthioestern bietet die Boc-basierte Festphasensynthese. Die Säurelabilität vieler Peptidmodifikationen und die technische Ausstattung der meisten Parallelpeptidsyntheseautomaten erhöhen jedoch die Nachfrage nach der milderen Fmoc-Synthesechemie. Die Fmoc-basierte Peptidthioestersynthese ist oftmals mühevoll und verläuft in wesentlich geringeren Ausbeuten als die Synthese von Peptidsäuren und -amiden. Der Erfolg der nativen chemischen Verknüpfung und verwandter Techniken hat allerdings die Entwicklung neuer Synthesestrategien vorangetrieben. Gegenstand dieses Aufsatzes ist es, die neueren Entwicklungen auf diesem schnell expandierenden Forschungsgebiet aufzuzeigen.

## 1. Einführung

Die Einführung leistungsfähiger Verknüpfungsreaktionen, die den Aufbau funktionaler Proteine über die Verknüpfung von Peptidsegmenten ermöglichen, war ein Meilenstein in der chemischen Proteinforschung.<sup>[1,2]</sup> Unter den zahlreichen Methoden, die eine chemoselektive Kupplung von Peptiden ermöglichen, ist die von Kent et al. entwickelte, native chemische Verknüpfung besonders hervorzuheben.<sup>[3]</sup> Hierbei ermöglicht die Reaktion eines ungeschützten C-terminalen Peptidthioesters mit dem N-terminalen Cysteinrest eines zweiten ungeschützten Peptidsegments die Bildung einer natürlichen Amidbindung im Verknüpfungsprodukt. Peptidthioester werden aber auch für andere Segmentkuppelungen wie die erweiterte native chemische Peptidverknüpfung,<sup>[2,4]</sup> die  $\text{Ag}^+$ -vermittelte Thioesterverknüpfung<sup>[5]</sup> und die spurlose Staudinger-Verknüpfung<sup>[6]</sup> benötigt. Zudem wird die Reaktivität der Thioesterfunktion für die Modifikation von Proteinen und für Immobilisierungsstrategien in der Peptid- und Protein-Array-Technik genutzt.<sup>[7]</sup>

Die Anwendungsgebiete sind also vielfältig, allerdings ist die Synthese von Peptidthioestern oftmals schwierig und zeitaufwändig. Typischerweise eröffnet die Boc/Bn-Chemie einen Zugang zu diesen wichtigen Bausteinen.<sup>[8]</sup> Wegen des wiederholten Einsatzes von TFA ist die Synthese von Peptidthioestern mit säureempfindlichen Strukturen wie O-glycosidischen und/oder Phosphatresten allerdings erschwert. Zusätzlich behindert der korrosive Charakter von TFA die Parallelsynthese durch die gebräuchlichen Peptidsyntheseautomaten. Der Anwendung der milderen Fmoc/Bu-Strategie steht zunächst die Labilität der Thioesterfunktion gegenüber Piperidin, das für die Fmoc-Abspaltung benötigt wird, entgegen. In den letzten Jahren wurden jedoch viele Synthesestrategien entwickelt, die auf vielfältigste Weise das Problem der Aminolyse umgehen.

## 2. Fmoc-basierte Festphasensynthese von $\alpha$ -Peptidthioestern

### 2.1. Direkte Synthese von $\alpha$ -Peptidthioestern mit nichtnucleophilen Reagentienmischungen zur Fmoc-Abspaltung

Die unerwünschte Aminolyse von Peptidthioestern kann verringert werden, wenn das nucleophile Piperidin durch weniger nucleophile Basen bei der Fmoc-Entschützung ersetzt wird.<sup>[9]</sup> Eine Mischung aus 25 % 1-Methylpyrrolidin, 2 %

[\*] Dr. 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

Hexamethylenimin und 2 % HOBr in NMP/DMSO (1:1) wurde beispielsweise bei der Synthese eines 25-meren Peptidthioesters, der über ein tertiäres Alkylthiol am Harz angebunden war, verwendet. Primäre Thioesterfunktionen werden unter den Bedingungen der Fmoc-Abspaltung teilweise gespalten. Die Gruppe um Guo zeigte, dass ein 0.88:1-Mischungsverhältnis von DBU/HOBr die besten Ergebnisse in Bezug auf die Geschwindigkeit der Fmoc-Abspaltung und die Thioesterstabilität liefert.<sup>[10]</sup> Dennoch kann die Aminolyse der Thioestergruppierung besonders während der ersten beiden Synthesezyklen nicht vollständig verhindert werden.<sup>[11]</sup>

## 2.2. Peptidthioester aus vollständig geschützten Peptidsäuren

Die aminolytische Spaltung der Thioesterfunktion kann verhindert werden, wenn der Thioester im Anschluss an den Aufbau der Peptidkette eingeführt wird. Bei einer weit verbreiteten Methode werden vollständig geschützte Peptidsäuren in Lösung zu den entsprechenden Thioestern umgesetzt. Die Peptide werden dabei meist an einem stark säureempfindlichen Harz wie dem Chlortrityl- oder dem HMPB-Harz synthetisiert.<sup>[12]</sup> Nach milder acidolytischer Freisetzung der vollständig geschützten Peptidsäuren erfolgt die Bildung des Thioesters unter Verwendung von Thiolen und Aktivierungsreagentien. Diese Methode wurde bei der Synthese funktionaler Proteindomänen, synthetischer Proteine und cyclischer Peptide angewendet.<sup>[13]</sup> Nachteilig gestalten sich allerdings die oft geringe Löslichkeit vollständig geschützter Peptide und die häufig beobachtete Epimerisierung am C-Terminus.<sup>[14]</sup> Ein kürzlich von Flemer beschriebenes Syntheseverfahren für eine In-situ-Thioveresterung könnte das beschriebene Löslichkeitsproblem umgehen.<sup>[15]</sup> Als alternative Methode zur Synthese von Thioestern wurde weiterhin eine dreistufige Reaktionssequenz basierend auf der Reaktion vollständig geschützter Peptidsäuren mit Tosylisocyanat mit nachfolgender N-Alkylierung des resultierenden *N*-Tosylpeptidamids und Thiolyse beschrieben.<sup>[16]</sup>

## 2.3. Umwandlung harzgebundener Peptidallylester in $\alpha$ -Peptidthioester

Löslichkeitsprobleme können vermieden werden, wenn die Umwandlung von Peptidsäuren in die jeweiligen Thio-

ester am Harz erfolgt. Das Peptid wird über eine Seitenkette (siehe Abschnitt 2.3.1) oder das Rückgrat (siehe Abschnitt 2.3.2) am Träger verankert, wobei die C-terminale Carboxygruppe als  $\alpha$ -Allylester geschützt ist. Nach dem Zusammenfügen des Peptids und Desallylierung des C-Terminus wird die Thioesterfunktion an der festen Phase eingeführt. Dies erfolgt entweder direkt durch Umsetzung mit einem Thiol oder indirekt über Kupplung eines Aminosäurethioesters. Die direkte Thioveresterung geht mit einem höheren Epimerisierungsrisiko des C-Terminus einher. Die Freisetzung des Peptidthioesters und die Abspaltung der SeitenkettenSchutzgruppen gelingen abschließend unter sauren Bedingungen.

### 2.3.1. Seitenkettenverankerte $\alpha$ -Peptidallylester als Vorstufen für Peptidthioester

Nakahara et al. nutzten einen Fluorid- und säureempfindlichen Silyl-Linker, um glycosyierte und nichtglycosyierte Serin- und Threoninallylester über deren Seitenkette zu verankern.<sup>[17]</sup> Nach Fmoc-basierter Festphasensynthese und Desallylierung wurden die Seitenketten gebundenen Peptide am Harz C-terminal durch Fragmentkupplung oder Thioveresterung modifiziert (Schema 1). Dieser Ansatz wurde auf Lysin-, Glutamat- und Aspartat- sowie Cystein- und Tyrosinverankerungen an Wang- oder Chlortritylharz ausgedehnt.<sup>[18]</sup> Ficht et al. beschrieben die Fixierung von Aspartat und Glutamat an Rinkamidharz, was nach acidolytischer Spaltung Asparagin- und Glutaminreste lieferte.<sup>[19]</sup> In einem ähnlichen Ansatz wurden die Seitenketten von Serin, Threonin, Tyrosin und Cystein an (4-Methoxyphenyl)methyl-Polystyrolharz gebunden, und im weiteren Verlauf wurde die Synthese eines Glycopeptidthioesterfragments von Erythropoietin (EPO; 1–28) realisiert.<sup>[19]</sup> Seitenkettenverankerung diente ferner auch der Synthese cyclischer Peptide durch intramolekulare native chemische Verknüpfung am Harz.<sup>[20]</sup>

### 2.3.2. Rückgratverankerte $\alpha$ -Peptidallylester als Vorstufen für Peptidthioester

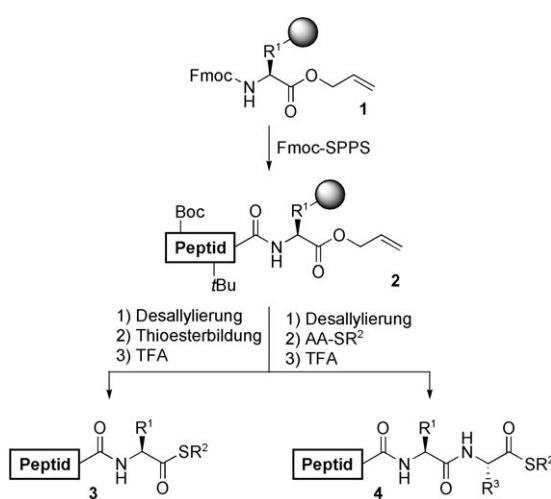
Eine Alternative zur Seitenkettenverankerung bieten Rückgrat-Amid-Linker (BAL). Ursprünglich wurde das BAL-Konzept für die organische Festphasensynthese niedermolekularer Verbindungen entworfen.<sup>[21]</sup> Barany et al. waren die ersten, die die Anwendung der BAL-Strategie bei



Franziska Mende studierte Chemie an der Humboldt-Universität zu Berlin (Diplom 2004), wo sie 2010 auch promovierte. Während ihrer Dissertation bei Prof. Oliver Seitz beschäftigte sie sich mit der Entwicklung einer Fmoc-basierten Peptidthioestersynthese mit Selbstreinigungseffekt und ihrer Anwendung in der parallelen automatisierten Synthese.

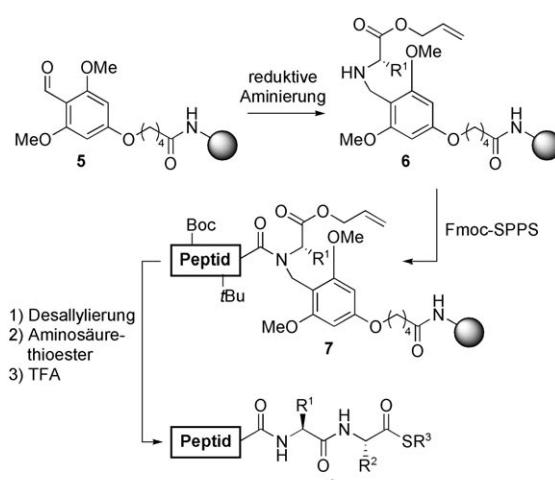


Oliver Seitz promovierte 1995 an der Universität Mainz. Nach einem Postdoktorat am Scripps Research Institute (La Jolla) bei Prof. Chi-Huey Wong wechselte er an die Universität Karlsruhe. 2000 wurde er Gruppenleiter am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund und erhielt 2003 den Ruf als Professor an die Humboldt-Universität zu Berlin. Sein Forschungsgebiet umfasst die Peptid- und Nukleinsäurechemie, molekulare Diagnostik, DNA/RNA-gesteuerte Chemie und die biomolekulare Kontrolle von Protein-Protein- und Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen.



**Schema 1.** Bildung des Thioesters an seitenkettenverankerten Peptid-allylestern.

der Fmoc-basierten Synthese von Peptidthioestern demonstrierten.<sup>[22]</sup> Die  $\alpha$ -Aminogruppe der C-terminalen Aminosäure wird über reduktive Aminierung an das Tris(alkoxy)benzaldehyd-Harz **5** gebunden (Schema 2). Die Verlängerung

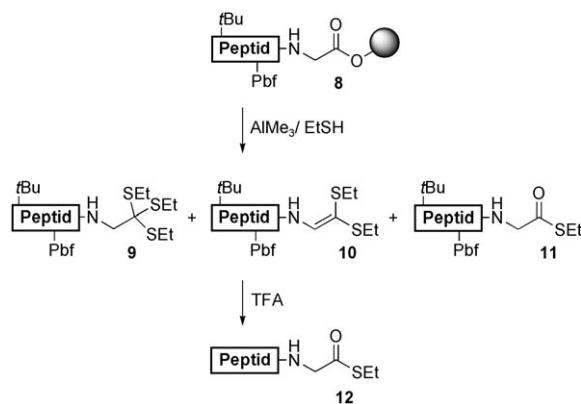


**Schema 2.** Rückgrat-Amid-Linker-Strategie.

gerung der Peptidkette ergibt das Peptid **7**, das nach Desallylierung für die Kupplung mit einem Aminosäurethioester zur Verfügung steht. Anders als die Strategie der Seitenkettenverankerung ist die Anbindung über das Peptidrückgrat unabhängig von der Peptidsequenz. Eine wesentliche Einschränkung dieser Methode ist jedoch die geringe Ausbeute bei der Kupplung der zweiten Aminosäure an das sekundäre Amin des Linkers. Außerdem wurde die Bildung von Diketopiperazinen während der Fmoc-Entschützung der zweiten Aminosäure beobachtet. Diese Nebenreaktion kann allerdings signifikant verringert werden, wenn die Thioesterfunktion als Trithioorthoester maskiert ist.<sup>[23]</sup>

## 2.4. Umwandlung harzgebundener Peptidester in $\alpha$ -Peptidthioester mit Alkylaluminiumthiolaten

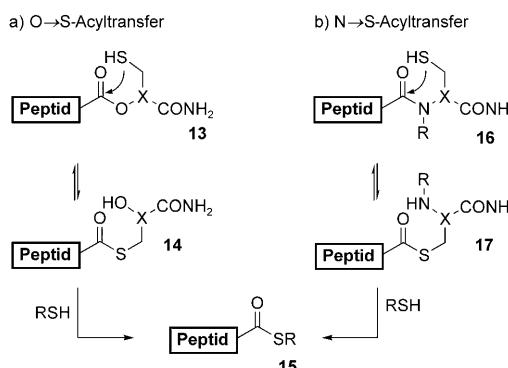
Hilvert et al. verwendeten Alkylaluminiumthiolate, um harzgebundene Peptidester abzuspalten. Auf diese Weise wurde eine Mischung aus vollständig geschützten Peptidtrithioestern **9**, -ketenthioacetalen **10** und -thioestern **11** isoliert (Schema 3).<sup>[24]</sup> Die vollständige Umwandlung der Produktmischung in **12** gelang unter Einwirkung von TFA. Die Methode ist jedoch auf Glycin als C-terminale Aminosäure beschränkt, da chirale Aminosäuren unter diesen Bedingungen epimerisieren. Zudem besteht die Gefahr der Aspartimidbildung und der Umwandlung geschützter Aspartat- und Glutamatseitenketten in Thioester.



**Schema 3.** Umwandlung harzgebundener Peptidester in Peptidthioester unter Einwirkung von Alkylaluminiumthiolaten.

## 2.5. Festphasensynthese von $\alpha$ -Peptidthioestern durch $O \rightarrow S$ - und $N \rightarrow S$ -Acyltransfer

In den letzten fünf Jahren wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, die auf der Fmoc-basierten Festphasensynthese von Peptidthioestern durch  $O \rightarrow S$ - oder  $N \rightarrow S$ -Acyltransferreaktionen basieren. Bei diesem Ansatz vermittelt ein thiolfunktionalisierter Baustein die Anbindung der Peptidester oder Peptidamide an den Polymerträger (Schema 4). Nach der Abspaltung vom Harz wirkt die Mercapto-

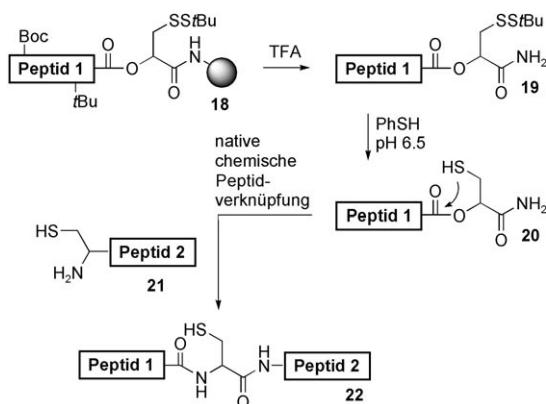


**Schema 4.**  $\beta$ -Mercaptosubstituierte a) Peptidester und b) N-alkylierte Peptidamide unterliegen einem partiellen  $O \rightarrow S$ - bzw.  $N \rightarrow S$ -Acyltransfer. X = organische Struktur.

gruppe als inneres Nucleophil. In einer Gleichgewichtsreaktion werden so die Peptidthioester **14** und **17** gebildet, die in einem nachfolgenden Thiolautausch zum Peptidthioester **15** abgefangen werden können.

### 2.5.1. Methoden auf Basis eines O→S-Acyltransfers

Danishefsky und Mitarbeiter entwickelten die erste Peptidthioestersynthese durch O→S-Acyltransfer.<sup>[25]</sup> Vollständig geschützte Peptidsäuren wurden in Lösung in Disulfidgeschützte α-2-Mercaptophenylester umgewandelt. Die resultierenden Peptidsegmente konnten direkt in einer nativen chemischen Peptidkupplung zur Reaktion gebracht werden. Botti et al. waren die ersten, die einen Peptidester-Linker beschrieben, der auch als latenter Thioester in der Festphasensynthese diente. Sie stellten den Peptidester **18** her, der in β-Position eine als Disulfid geschützte Thiolfunktion aufwies. Nach acidolytischer Freisetzung vom Harz wurde das Segment **19** in der Verknüpfung mit dem Cysteinylpeptid **21** eingesetzt (Schema 5).<sup>[26]</sup> Die reduktiven Bedingungen der

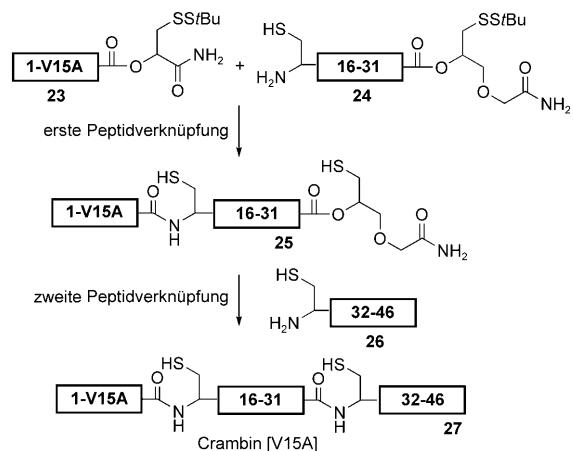


**Schema 5.** Der Peptid-2-mercaptopcarboxamidester **19** wird direkt in der nativen chemischen Peptidverknüpfung eingesetzt.

nativen chemischen Verknüpfung bewirkten die Spaltung des Disulfids, wodurch der O→S-Acyltransfer in **20** initiiert wurde. Als Einschränkung stellte sich die Hydrolyse des Esters (10–20 %) während der Verknüpfung heraus. Dennoch gelangen auf diesem Weg die Synthesen von cyclischen Peptiden sowie von phosphoryliertem und acetyliertem Histon H2B.<sup>[27]</sup> Kürzlich nutzten Liu et al. die unterschiedliche Reaktivität von *O*-Alkylestereinheiten. In einer kinetisch kontrollierten sequenziellen Verknüpfung der drei Peptidsegmente **23**, **24** und **26** (Schema 6) gelang so der Aufbau des 46-meren Polypeptids Crambin[V15A] (**27**).<sup>[28]</sup>

### 2.5.2. Methoden auf Basis eines N→S-Acyltransfers

Vorherr et al. beobachteten den N→S-Acyltransfer als Nebenreaktion, wenn die Dmmb-Gruppe als Verknüpfungsauxiliar an N-terminalem Glycin verwendet wurde.<sup>[29]</sup> Dieser Befund begründete die Dmmb-vermittelte Synthese von Peptidthioestern (Schema 7 a).<sup>[30]</sup> Nach Entschützen der triptylgeschützten Mercaptogruppe in **28** führt ein säureindu-

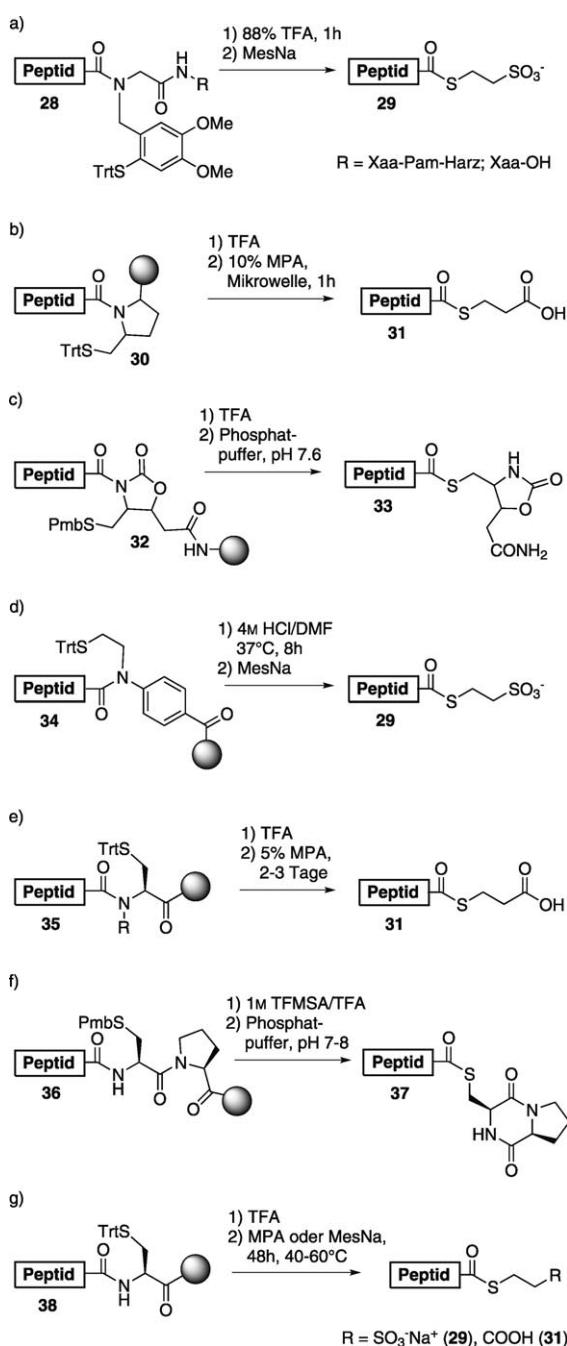


**Schema 6.** Synthese von Crambin[V15 A] durch kinetisch kontrollierte Peptidkupplung unter Verwendung latenter Peptidthioester unterschiedlicher Reaktivität.<sup>[28]</sup>

zierteter N→S-Acyltransfer zur partiellen Bildung eines Peptidthioesters, der durch ein externes Thiol wie MesNa abgefangen wird. Diese Umlagerung kann sowohl in Lösung als auch am Harz erfolgen. Zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit wird der Acyltransfer bei 37°C über 3 h durchgeführt. Mit dieser Methode gelangen die Synthesen eines 41-meren Segments von TRF2 (telomere repeat-binding factor 2) sowie von phosphorylierten und methylierten Peptidthioestern.<sup>[31]</sup>

Hojo, Nakahara et al. untersuchten ein mercaptomethyliertes Prolinderivat (Schema 7 b).<sup>[32]</sup> Der Acyltransfer in **30** wird durch Umsetzen mit 10–40-proz. wässriger MPA induziert. Für akzeptable Reaktionsgeschwindigkeiten ist Mikrowellenbestrahlung vonnöten. Unter diesen Bedingungen wurde jedoch die partielle Spaltung der Asp-Ser-Bindung beobachtet. Die α-mercaptomethylierten *N*-Peptidylloxazolidinone **32** sind wesentlich reaktiver (Schema 7 c).<sup>[33]</sup> Sie können daher direkt in Peptidverknüpfungen eingesetzt werden, sind jedoch auch empfindlich gegen Piperidin, was den Einsatz nichtnucleophiler Reagentienmischungen für die Fmoc-Abspaltung in der SPPS bedingt. Als Haupteinschränkung dieser Methode ist die Epimerisierung der C-terminalen Aminosäure während der Fmoc-Entschützung zu nennen. Robustere, aber auch weniger reaktive Verankerungen finden sich bei den Peptidanilidderivaten **34** (Schema 7 d).<sup>[34]</sup> Der N→S-Acyltransfer wird durch Umsetzen mit 4 M HCl/DMF in Gegenwart von 1 % TCEP über 8 h bei 37°C erreicht. Die abschließende Thiolyse mit MesNa bewirkt die Freisetzung des Thioesters **29**.

Hojo beschrieb den *N*-Alkylcystein-Linker in **35**, der Peptidthioester ohne das Problem der C-terminalen Epimerisierung liefert (Schema 7 e).<sup>[35]</sup> Die N→S-Acylwanderung und der Thiolautausch werden durch saure Behandlung mit 5 % MPA über zwei bis drei Tage bei Raumtemperatur ausgelöst. Dieser Ansatz wurde in den Synthesen des 95-meren Chemokins CCL27 und des glycosylierten Mausproopiomelanocortins (1–74) angewendet.<sup>[36]</sup> In einem aktuellen Beispiel gelang Dawson, Brik et al. die Totalsynthese eines Ubiquitin-thioesters durch native chemische Peptidverknüpfung.<sup>[37]</sup>



**Schema 7.** Fmoc-basierte Festphasensynthese von Peptidthioestern auf Grundlage eines  $N \rightarrow S$ -Acyltransfers: a) Dmrb-vermittelte Peptidthioestersynthese; b)  $\beta$ -mercaptopromethylierter Prolin-Linker; c) mercaptomethylierter Oxazolidin-Linker; d) N-Mercaptoethylanilin-Linker; e)  $N$ -Alkylcystein-vermittelte Peptidthioestersynthese; f) CPE-basierte Peptidthioestersynthese; g) reverse native chemische Peptidverknüpfung.

Während der Synthese war die C-terminale Peptidthioester-Einheit als geschütztes  $N$ -Methylcysteinamid maskiert und wurde im letzten Schritt durch Umsetzen mit MPA eingeführt.

Aimoto et al. berichteten, dass die Cystein-Prolin-Einheit in **36** als autoaktivierende Einheit fungiert (Schema 7f).<sup>[38]</sup> Es wurde angenommen, dass das durch den  $N \rightarrow S$ -Acyltransfer freigesetzte Cysteinamin in einer irreversiblen Folgereaktion

unter Bildung des Diketopiperazins **37** abgefangen wird. Die Reaktionssequenz ist nach 24 h bei Raumtemperatur und ca. pH 7 beendet. Um eine verfrühte Diketopiperazinbildung zu vermeiden, ist es notwendig, die Cys-Pro-Einheit als Dipeptid an die feste Phase zu binden.

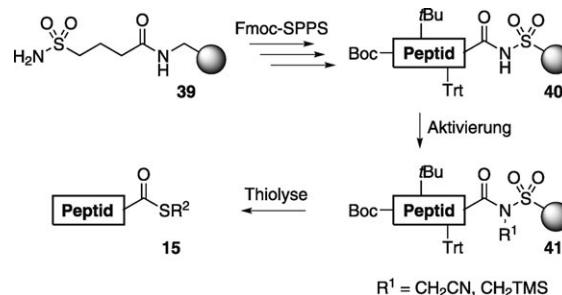
Macmillan et al. beobachteten, dass Peptide mit inneren Gly-Cys-, His-Cys- und Cys-Cys-Einheiten unter Einwirken von MPA zu Gly-, His- bzw. Cys-Thioesterfragmenten zerstellt werden (Schema 7g).<sup>[39]</sup> Diese reverse native chemische Verknüpfung wurde optimiert und in der Synthese eines 33 Aminosäuren langen Neoglycopeptidthioesters von EPO (1–33) verwendet.<sup>[40]</sup> Das optimierte His-Cys-Motiv wurde innerhalb von 48 h bei erhöhten Temperaturen ( $60^{\circ}\text{C}$ ) gespalten. Sequenzinterne Cysteine sollten während der säureinduzierten Thioveresterung geschützt bleiben.

## 2.6. Das „Safety-Catch“-Prinzip in der Festphasensynthese von $\alpha$ -Peptidthioestern

Bei einem „Safety-Catch“-Linker wird die Reaktivität der Peptid-Acyl-Gruppe durch eine chemische Modifikation erhöht. Die gewünschten Peptidthioester resultieren aus der nucleophilen Spaltung der aktivierten Peptidverankerung.

### 2.6.1. Festphasensynthese von $\alpha$ -Peptidthioestern am Sulfonamid-Linker

Weithin gebräuchlich ist die Festphasensynthese von Peptidthioestern an Ellmans Modifikation (**39**) von Kenners Sulfonamid-Linker (Schema 8).<sup>[41]</sup> Nach der Verlängerung



**Schema 8.** Fmoc-basierte Peptidthioestersynthese am Sulfonamid-„Safety-Catch“-Harz.

der Peptidkette wird die Peptid-Sulfonamid-Bindung in **40** durch Iodacetonitril oder Trimethylsilyldiazomethan alkaliert. Das resultierende  $N$ -Alkyl- $N$ -acylsulfonamid **41** ist nunmehr nucleophilen Angriffen zugänglich. Thiolyse liefert die vollständig geschützten Peptidthioester, die abschließend durch Umsetzen mit TFA entschützt werden.<sup>[42]</sup>

Verschiedene Peptidthioester mit einer Länge von bis zu 35 Aminosäuren wurden mit diesem Verfahren hergestellt.<sup>[43,44]</sup> Als Einschränkungen sind das Epimerisierungsrisko während der langwierigen Harzbefestigung, Nebenreaktionen während der Aktivierung und die Aggregation vollständig geschützter Peptidthioester zu nennen.<sup>[45,46]</sup> Der Einsatz von Aminosäurefluoriden und die Kupplung von Ami-

nothiosäuren zu harzgebundenen Sulfonaziden bieten Lösungsansätze für das Epimerisierungsproblem,<sup>[47]</sup> wohingegen Nebenreaktionen während der Aktivierung durch die Verwendung von Trimethylsilyldiazomethan minimiert werden.<sup>[48]</sup> Unverzagt et al. beobachteten die unerwünschte Acetylierung des Acylsulfonamids während des Capping-Schrittes (Capping: N-terminale Acetylierung von Peptidketten, die in der Kupplungsreaktion nicht reagierten).<sup>[44]</sup>

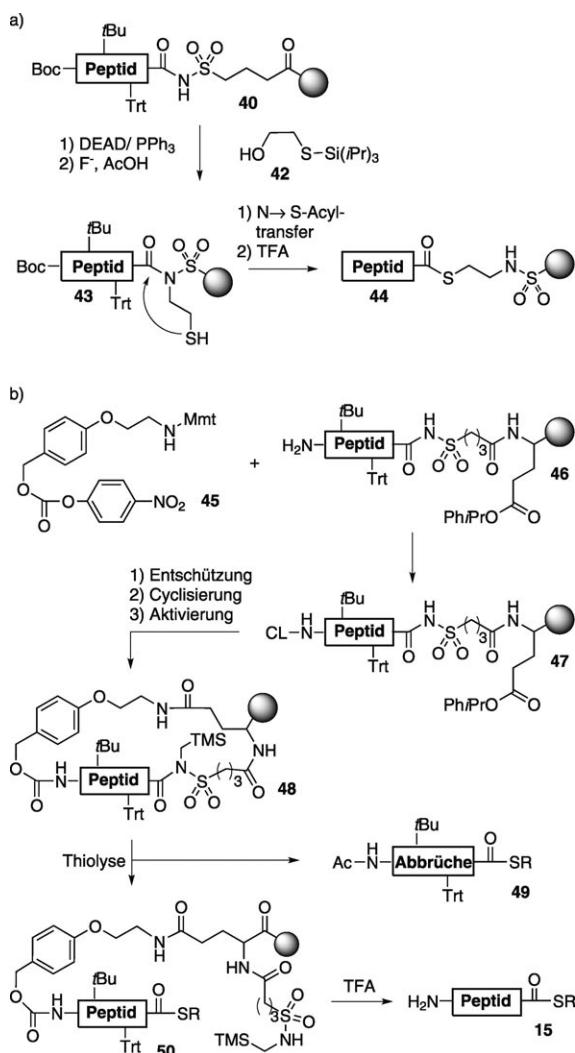
Der zweistufige Ansatz aus Alkylierung der Sulfonamidbindung und nachfolgender nucleophiler Spaltung bietet vielfältige Möglichkeiten des Reaktionsdesigns. So waren beispielsweise polymergebundene Peptidthioester durch eine Reaktionsfolge zugänglich, die a) eine Mitsunobu-Reaktion mit S-silyliertem Mercaptoethanol **42** zur Alkylierung des Sulfonamids **41**, b) Fluorid-vermittelte Entschützung der Thiolfunktion ( $\rightarrow$ **43**) und c) nachfolgende intramolekulare Thiolyse umfasste (Schema 9a).<sup>[48]</sup> Die Umsetzung des Seitenkettengeschützten Peptidthioesterharzes mit TFA lieferte den ungeschützten Peptidthioester in 20–25 % Gesamtausbeute unter Verwendung von Rinkamidharz. Das Weglassen

des Rink-Linkers ermöglichte die Synthese harzgebundener Peptidthioester **44**, die nachfolgend in einer nativen chemischen Peptidverknüpfung am Harz Anwendung fanden.

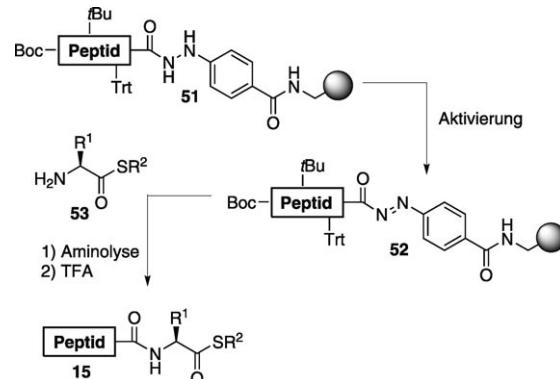
Wir berichteten kürzlich über die automatisierte Parallelsynthese von Peptidthioestern mit Selbstreinigungseffekt (Schema 9b).<sup>[49]</sup> Der Aufbau des Peptids erfolgt dabei an einem carboxyfunktionalisierten Sulfonamidharz. Die N-terminale Modifikation des Volllängenpeptids **46** mit dem Cyclisierungs-Linker **45** markiert das harzgebundene Peptid für eine Rückgrat-zu-Seitenketten-Cyclisierung. Das Acetylieren nach fehlgeschlagenen Aminosäurekupplungen während der Festphasenpeptidsynthese schließt Abbruchsequenzen von der Einführung des Cyclisierungs-Linkers aus. Somit geht nur das Volllängenprodukt die Cyclisierung ein. Die nachfolgende Alkylierung des N-Acylsulfonamids liefert die aktivierte Peptid-Sulfonamid-Bindung in **48**. Thiolyse öffnet den Makrocyclus. Der so gebildete Peptidthioester **50** verbleibt an der festen Phase, während die nichtcyclischen, acetylierten Abbruchpeptide **49** in Lösung gehen. Die Säurelabilität des Cyclisierungs-Linkers ermöglicht die Freisetzung des Peptidthioesters **15**, die simultan mit der Seitenkettenentschützung durch Umsetzung mit TFA erfolgt. Dieser Ansatz lieferte Rohprodukte von bis zu 40 Aminosäuren Länge in hoher Reinheit, die ohne weitere HPLC-Reinigung bei Verknüpfungsreaktionen und beim Aufbau eines SH3-Domänen-Arrays eingesetzt wurden.

#### 2.6.2. Festphasensynthese von $\alpha$ -Peptidthioestern am Arylhydrazin-Linker

Die Oxidation von Acylhydraziden zu den reaktiveren Acyldiazenen ist die Grundlage für die Fmoc-basierte Synthese von Peptidthioestern am Arylhydrazin-Linker **51** (Schema 10).<sup>[50]</sup> Das Peptyldiazen **52** wird durch milde



**Schema 9.** a) Synthese harzgebundener Peptidthioester durch intramolekularen N→S-Acyltransfer. b) Fmoc-basierte Peptidthioestersynthese mit Selbstreinigungseffekt.



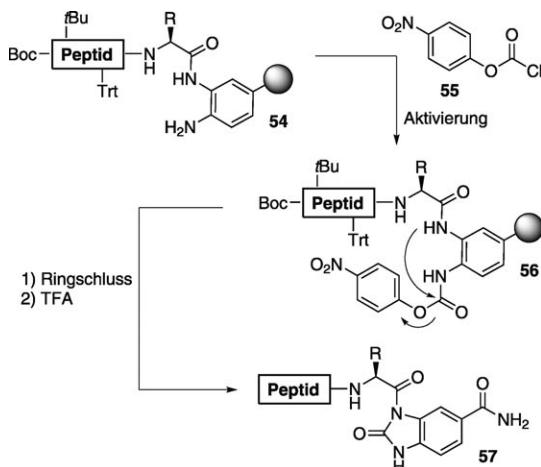
**Schema 10.** Fmoc-basierte Peptidthioestersynthese am Hydrazinharz.

Oxidation mit *N*-Bromsuccinimid gebildet. Die direkte Thiolyse des aktivierten **52** gelingt nicht, weil Mercaptane die Reduktion der Diazeneinheit bewirken würden. Daher wird aminolytisch mit Aminosäurethioestern **53** gespalten. Die abschließende TFA-Umsetzung erfolgt in Lösung. Mehrere Modellpeptide konnten auf diese Weise in 70–90 % Ausbeute synthetisiert werden. Zudem gelang die Herstellung eines 23-meren Peptidthioesterfragments der N-terminalen SH3-Domäne.

mäne des c-Crk-Adapterproteins. Cystein und Methionin können allerdings im Oxidationsschritt Nebenreaktionen eingehen.

### 2.6.3. $\alpha$ -Peptidarylbenzimidazolone als Vorstufen für $\alpha$ -Peptidthioester

Dawson und Blanco-Canosa führten kürzlich ein neues „Safety-Catch“-Prinzip ein.<sup>[51]</sup> Der Aufbau der Peptidkette erfolgt dabei an einem 3,4-Diaminobenzoyl-Linker (Schema 11). Die Acylierung der Aminogruppe in **54** durch 4-Ni-

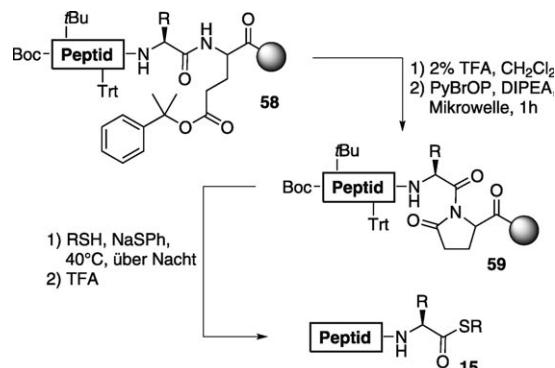


**Schema 11.** Synthese von Peptidbenzimidazolonen als hochreaktiven Vorstufen für Peptidthioester.

trophenylchlorformiat (**55**) initiiert einen spontanen Ringschluss in **56**. In der Gegenwart von Mercaptanen wird das resultierende *N*-Acylbenzimidazolon **57** leicht in einen Thioester überführt und kann daher direkt in einer nativen chemischen Verknüpfung eingesetzt werden. Die Blockierung nicht umgesetzter Peptidketten (Capping) über Acetylierung sollte jedoch vermieden werden, um der Acylierung der ungeschützten Anilin-Aminogruppe in **54** vorzubeugen. Die Synthese eines 29-meren Peptidbenzimidazolons gelang in 36 % Ausbeute. Der Nutzen dieser Methode wurde bei der chemischen Totalsynthese des HIV-1-Tat-Proteins<sup>[52]</sup> und der zweiten Typ-1-Wiederholung von Thrombospondin-1 (TSR2)<sup>[53]</sup> sowie bei der Semisynthese der N-terminalen Domäne des Anthrax-Lethalfaktors<sup>[54]</sup> demonstriert.

### 2.6.4. Rückgrat-Pyroglutamylimide als Vorstufen für $\alpha$ -Peptidthioester

Conde-Friboes, Hoeg-Jensen et al. entwarfen einen Peptid-Linker **58**, der durch die Bildung einer Pyroglutamylstruktur einer nucleophilen Spaltung zugänglich wird (Schema 12).<sup>[55]</sup> Dem Aufbau des Peptids an der festen Phase folgt die selektive Acidolyse des Phenylisopropylesters in **58**. Die Aktivierung der Seitenketten-Carboxygruppe mit PyBrOP unter basischen Bedingungen und Mikrowellenbestrahlung führt zum Pyroglutamylimid **59**. Diese Verbindung ist nun einer Thiolyse zugänglich. Wegen der relativ geringen



**Schema 12.** Pyroglutamylimidbildung aktiviert das Peptidrückgrat für eine thiolytische Spaltung.

Reaktivität des Pyroglutamylimids sind erhöhte Temperaturen und lange Reaktionszeiten notwendig, um die Peptidthioester in 45–60 % Ausbeute zu erhalten.

### 3. Schlussfolgerungen

In diesem Kurzaufsatzen haben wir den neuesten Stand der Forschung bei der Fmoc-basierten Festphasensynthese von Peptidthioestern aufgezeigt. Als konzeptionell neue Entwicklungen sind latente Thioester zu nennen, die auf Peptidamid- oder Peptidsäurestrukturen zurückgehen und einen N→S- oder O→S-Acyltransfer ermöglichen. Das Gleichgewicht dieser Umlagerung liegt typischerweise auf Seiten der Amid- oder Esterstruktur. Externe Mercaptane fangen jedoch die S-Acylprodukte ab und verschieben somit das Gleichgewicht zugunsten des Peptidthioesters. Die Reaktivität der latenten Thioester kann eingestellt werden, was kinetisch kontrollierte zwei- oder dreistufige Verknüpfungsreaktionen ermöglicht.

Aus der Vielfalt an beschriebenen Methoden werden wahrscheinlich jene, die auf Seitenkettenverankerung, Rückgrat-Amid- oder Sulfonamid-Linker zurückgreifen, am häufigsten angewendet. Interessante Möglichkeiten eröffnet dabei das Design von Reaktionssequenzen, in denen das „Safety-Catch“-Prinzip mit anderen chemischen Reaktionen kombiniert wird. So verbindet beispielsweise die Peptidthioestersynthese am neuartigen 3,4-Diaminobenzoyl-„Safety-Catch“-Linker einen Aktivierungsschritt (Acylierung) mit einem nachfolgenden O→N-Acyltransfer, was in der Bildung eines hochreaktiven Peptidbenzimidazolons resultiert, das eine schnelle Thioveresterung eingeht. Die Verwendung des etablierten Sulfonamid-Linkers in Kombination mit einer Makrocyclisierung am Harz, gefolgt von einer thiolytischen Ringöffnung, ermöglicht die selektive Freisetzung der Volllängenpeptidthioester. Diese Methode mit „Selbstreinigungseffekt“ kommt daher meist ohne eine HPLC-Reinigung der synthetisierten Peptidthioester aus.

Reaktionsschritte in Lösung können nur schwerlich automatisiert werden. In einem idealen Syntheseverfahren würden daher alle Reaktionsstufen am Harz durchgeführt werden. Leider erfüllen nur wenige Methoden dieses Kriterium. Dies schließt vor allem jene Methoden ein, die auf

Seitenketten- oder Rückgratverankerung basieren sowie auf den Sulfonamid-Linker in Kombination mit entweder intramolekularem N→S-Acyltransfer oder einer Reaktionssequenz aus Makrocyclisierung und thiolytischer Ringöffnung zurückgreifen. Der neue Diaminobenzoësäure-Linker fällt ebenfalls unter diese Kategorie, weil die durch TFA freigesetzten Peptidylimidazolone unter den Bedingungen der nativen chemischen Peptidverknüpfung die Peptidthioester liefern.

Die Fortschritte bei der Fmoc-basierten Festphasensynthese von Peptidthioestern sind enorm. Eine Vielzahl an Methoden eröffnet einen zuverlässigen Zugang zu Peptidthioestern von bis zu 40 Aminosäuren Länge. Diese leistungsverbesserten Methoden können zudem in so gut wie jedem Labor angewendet werden. Bisher wurde allerdings noch über keine Fmoc-basierte Synthese von 60–80-meren Peptidthioestern berichtet. Trotz der erzielten Fortschritte liegen die aktuellen Methoden noch weit hinter den wesentlich einfacheren Syntheseverfahren von Peptidsäuren und Peptidamiden zurück. Zweifelsohne werden weitere Forschungen die nötigen Verbesserungen entweder durch die Entwicklung neuer Methoden und/oder durch die intelligente Verzahnung bestehender Methoden erbringen. Dies wird in Zukunft nicht nur die chemische Synthese modifizierter Peptidthioester erleichtern, sondern auch die chemische Synthese von Proteinen und die Proteinforschung im Allgemeinen befördern.

#### 4. Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
BAL	Rückgrat-Amid-Linker
Boc	tert-Butoxycarbonyl
Bn	Benzyl
CPE	Cysteinprolinester
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
Dmmb	4,5-Dimethoxy-2-mercaptophenyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPO	Erythropoietin
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
HMPB	4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxo)buttersäure
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
MPA	Mercaptopropionsäure
MesNa	Mercaptoethansulfonsäure-Natriumsalz
Mmt	Monomethoxytrityl
NMP	N-Methylpyrrolidon
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pmb	p-Methoxybenzyl
PyBrOP	Bromtris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
SPPS	Festphasenpeptidsynthese

TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Trimethylsilyl
Trt	Trityl

Wir danken für Unterstützung durch den SFB 765.

Eingegangen am 18. August 2010  
Online veröffentlicht am 29. Dezember 2010

- [1] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960.
- [2] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182–10228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074.
- [3] a) T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129–149; b) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [4] a) C. Haase, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1575–1579; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1553–1556; b) C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6912–6915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6807–6810; c) C. Haase, O. Seitz, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2096–2101; d) H. Rohde, O. Seitz, *Biopolymers* **2010**, *94*, 551–559.
- [5] S. Aimoto, *Biopolymers* **1999**, *51*, 247–265.
- [6] a) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143; b) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941; c) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9–12.
- [7] J. A. Camarero, Y. Kwon, M. A. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14730–14731.
- [8] H. Hojo, S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 111–117.
- [9] X. Q. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8669–8672.
- [10] X. Z. Bu, G. Y. Xie, C. W. Law, Z. H. Guo, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2419–2422.
- [11] A. B. Clippingdale, C. J. Barrow, J. D. Wade, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 225–234.
- [12] a) S. Futaki, K. Sogawa, J. Maruyama, T. Asahara, M. Niwa, H. Hojo, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6237–6240; b) N. Yamamoto, Y. Tanabe, R. Okamoto, P. E. Dawson, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 501–510.
- [13] a) A. R. Mezo, R. P. Cheng, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3885–3891; b) J. L. Zhu, Q. Wan, G. Ragupathi, C. M. George, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4151–4158; c) T. L. Aboye, R. J. Clark, D. J. Craik, U. Goransson, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 103–113; d) R. von Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger, M. Beyer, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3551–3554.
- [14] A. C. Nagalingam, S. E. Radford, S. L. Warriner, *Synlett* **2007**, 2517–2520.
- [15] S. Flemer, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 693–696.
- [16] S. Manabe, T. Sugioka, Y. Ito, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 849–853.
- [17] K. Nakamura, N. Hanai, M. Kanno, A. Kobayashi, Y. Ohnishi, Y. Ito, Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 515–518.
- [18] a) L. Li, P. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 29–32; b) D. Leilièvre, P. Barta, V. Aucagne, A. F. Delmas, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4016–4019.
- [19] S. Ficht, R. J. Fayne, R. T. Guy, C. H. Wong, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 3620–3629.
- [20] J. Tulla-Puche, G. Barany, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4101–4107.
- [21] U. Boas, J. Brask, K. J. Jensen, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2092–2118.
- [22] J. Alsina, T. S. Yokum, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8761–8769.

- [23] J. Brask, F. Albericio, K. J. Jensen, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2951–2953.
- [24] 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.
- [25] J. D. Warren, J. S. Miller, S. J. Keding, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6576–6578.
- [26] P. Botti, M. Villain, S. Manganiello, H. Gaertner, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4861–4864.
- [27] a) E. A. George, R. P. Novick, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4914–4924; b) K. P. Chiang, M. S. Jensen, R. K. McGinty, T. W. Muir, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2182–2187.
- [28] J. S. Zheng, H. K. Cui, G. M. Fang, W. X. Xi, L. Liu, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 511–515.
- [29] J. Vizzavona, F. Dick, T. Vorherr, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1963–1965.
- [30] a) T. Kawakami, M. Sumida, K. Nakamura, T. Vorherr, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8805–8807; b) K. Nakamura, M. Sumida, T. Kawakami, T. Vorherr, S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *79*, 1773–1780; c) K. Nakamura, H. Mori, T. Kawakami, H. Hojo, Y. Nakahara, S. Aimoto, *Int. J. Protein Pept. Res.* **2007**, *13*, 191–202.
- [31] K. Nakamura, T. Kanao, T. Uesugi, T. Hara, T. Sato, T. Kawakami, S. Aimoto, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 731–737.
- [32] F. Nagaike, Y. Onuma, C. Kanazawa, H. Hojo, A. Ueki, Y. Nakahara, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4465–4468.
- [33] Y. Ohta, S. Itoh, A. Shigenaga, S. Shintaku, N. Fujii, A. Otaka, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 467–470.
- [34] S. Tsuda, A. Shigenaga, K. Bando, A. Otaka, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 823–826.
- [35] H. Hojo, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 25–28.
- [36] a) H. Hojo, Y. Murasawa, H. Katayama, T. Ohira, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1808–1813; b) C. Ozawa, H. Katayama, H. Hojo, Y. Nakahara, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3531–3533; c) H. Katayama, H. Hojo, I. Shimizu, Y. Nakahara, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1966–1972.
- [37] L. A. Erlich, K. S. A. Kumar, M. Haj-Yahya, P. E. Dawson, A. Brik, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2392–2396.
- [38] a) G. Zanotti, F. Pinnen, G. Lucente, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5481–5484; b) T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1903–1905; c) T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3871–3877.
- [39] J. Kang, J. P. Richardson, D. Macmillan, *Chem. Commun.* **2009**, 407–409.
- [40] a) J. Kang, N. L. Reynolds, C. Tyrrell, J. R. Dorin, D. Macmillan, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4918–4923; b) J. P. Richardson, C. H. Chan, J. Blanc, M. Saadi, D. Macmillan, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1351–1360.
- [41] a) G. W. M. Kenner, R. C. Sheppard, *J. Che. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 636–637; b) B. J. Backes, A. A. Virgilio, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3055–3056; c) B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322–2330; d) P. Heidler, A. Link, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 585–599.
- [42] R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11369–11374.
- [43] 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*, 11684–11689; b) N. Wehofsky, N. Koglin, S. Thust, F. Bordusa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6126–6133; c) T. L. R. Grygiel, A. Teplyakov, G. Obmolova, N. Stowell, R. Holland, J. F. Nemeth, S. C. Pomerantz, M. Kruszynski, G. L. Gilliland, *Biopolymers* **2010**, *94*, 350–359.
- [44] S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1677–1681; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1650–1654.
- [45] R. R. Flavell, M. Huse, M. Goger, M. Trester-Zedlitz, J. Kurian, T. W. Muir, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 165–168.
- [46] R. Quaderer, D. Hilvert, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3181–3184.
- [47] a) R. Ingenito, D. Dreznjak, S. Guffler, H. Wenschuh, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1187–1188; b) R. Merkx, M. J. van Haren, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4574–4577.
- [48] N. Ollivier, J. B. Behr, O. El-Mahdi, A. Blanpain, O. Melnyk, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2647–2650.
- [49] a) F. Mende, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4661–4665; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4577–4580; b) F. Mende, M. Beisswenger, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11110–11118.
- [50] a) T. Wieland, J. Lewalter, C. Birr, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1970**, *740*, 31–47; b) C. R. Millington, R. Quarrell, G. Lowe, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7201–7204; c) F. Stieber, U. Grether, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1142–1145; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1073–1077; d) J. A. Camarero, B. J. Hackel, J. J. de Yoreo, A. R. Mitchell, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4145–4151.
- [51] J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6957–6961; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6851–6855.
- [52] Z. Harpaz, P. Siman, K. S. A. Kumar, A. Brik, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1232–1235.
- [53] T. K. Tiefenbrunn, J. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, *Biopolymers* **2010**, *94*, 405–413.
- [54] B. L. Pentelute, A. P. Barker, B. E. Janowiak, S. B. H. Kent, R. J. Collier, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 359–364.
- [55] A. P. Tofteng, K. K. Sorensen, K. W. Conde-Frieboes, T. Hoeg-Jensen, K. J. Jensen, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7547–7550; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7411–7414.