

# „Triazolbrücke“: ein Disulfidbrückenersatz durch Ruthenium-katalysierte Bildung von 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazolen\*\*

Martin Empting, Olga Avrutina, Reinhard Meusinger, Sebastian Fabritz, Michael Reinwarth, Markus Biesalski, Stephan Voigt, Gerd Buntkowsky und Harald Kolmar\*

Etwa ein Viertel aller makromolekularen Peptidstrukturen, die in der Protein-Datenbank (PDB) hinterlegt sind, enthält mindestens eine Disulfidbrücke.<sup>[1]</sup> In der Natur bilden sich Disulfidbrücken in einem oxidativen Milieu, z.B. auf der Zelloberfläche oder in der extrazellulären Matrix. Viele Proteine erhalten dadurch eine signifikant erhöhte konformative Stabilität. Bei Oligopeptiden mit weniger als 30 Aminosäuren beruht die Stabilisierung der Tertiärstruktur aufgrund der begrenzten Zahl an nichtkovalenten intramolekularen Wechselwirkungen hauptsächlich auf der Makrocyclisierung durch das Cystin-Motiv. Die Bildung von Disulfidbrücken führt dabei zu einer Versteifung des Peptidgerüsts. Ein prominentes Beispiel ist die Familie der Cystinknoten-Miniproteine,<sup>[2]</sup> die aufgrund ihres konformativ fixierten Grundgerüsts eine außergewöhnliche thermische und proteolytische Stabilität aufweisen.<sup>[2a]</sup> Folglich ist die Entwicklung von disulfidverbrückten Peptiden, die für diagnostische und therapeutische Anwendungen geeignet sind, Gegenstand intensiver Forschung.<sup>[3]</sup>

Üblicherweise werden Disulfidbrücken *in vitro* nach der Festphasensynthese von Peptiden durch Einwirkung von DMSO, Luftsauerstoff oder anderen Oxidationsmitteln aufgebaut. Obwohl dieser Reaktionsschritt unter relativ milden Bedingungen in Lösung durchgeführt werden kann, ist er doch besonders im Fall von disulfidreichen Molekülen häufig mit niedrigen Ausbeuten verbunden, da eine kontrollierte regiospezifische Bildung von mehreren Disulfidbrücken nicht trivial zu erreichen ist.<sup>[4]</sup> Zusätzlich besteht das Risiko einer ungewollten intermolekularen Reaktion der freien Thiol-

gruppen, weswegen die oxidative Faltung üblicherweise in einer hochverdünnten Lösung durchgeführt wird. Trotz des Einsatzes von glutathionbasierten Redoxpuffern, polymer gebundenen Oxidationssystemen, orthogonalen Schutzgruppen und/oder einer Makrocyclisierung an der festen Phase bleibt die Kontrolle der Topologie der gebildeten Disulfidbrücken eine Herausforderung.<sup>[4a,e,f,5]</sup>

Um diese Probleme zu vermeiden und dabei die Redoxstabilität von verbrückten Peptiden zu verbessern, wurden verschiedene Konzepte für den Ersatz von Disulfidbrücken entwickelt.<sup>[6]</sup> Als Disulfidersatz kommen Thioether, Olefine oder alkanbasierte Isostere zum Einsatz.<sup>[6a,b,d-f]</sup> Während Cystathioninbrücken mehrere Syntheseschritte und eine sorgfältige Wahl der orthogonalen Schutzgruppen benötigen, erhält man im Fall der Dicarabrücke *cis/trans*-Isomere als Folge einer Ringschlussmetathese (RCM).<sup>[6a,b,f]</sup> Nur ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt oder eine Pd-katalysierte Hydrierung der ungesättigten Spezies zu dem entsprechenden Alkan führt zu einem Produkt mit definierter Konfiguration.<sup>[6b,f]</sup>

Im Jahre 2004 beschrieben Meldal et al. die Anwendung der CuAAC, d.h. der Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition, zur Bildung einer Triazolbrücke als Disulfidersatz.<sup>[6c]</sup> Wegen ihrer besonderen Eigenschaften und einer nahezu perfekten Orthogonalität zu den Reaktivitäten der Aminosäureseitenketten wurde diese „Klick“-Reaktion ausgiebig in der Peptidchemie eingesetzt.<sup>[7]</sup> So wurden unter anderem 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazole in Peptiden installiert, um Konformationen des Amidrückgrats zu imitieren und einzufrieren.<sup>[7d,8]</sup> Darüber hinaus wurden zahlreiche CuAAC-Makrocyclisierungen von Peptiden in Lösung und an der festen Phase beschrieben.<sup>[6c,8d,9]</sup>

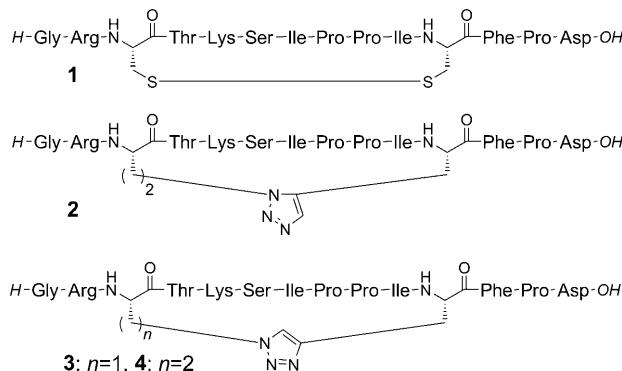
Ausgehend von den gleichen azid- und alkinfunktionalisierten Bausteinen können auch 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazole durch die Ruthenium(II)-katalysierte Variante (RuAAC) aufgebaut werden.<sup>[10]</sup> Diese Reaktion erweitert das Spektrum von selektiv zugänglichen Peptidmimetika basierend auf den gleichen Vorläufermolekülen, wobei unterschiedliche biologische Aktivitäten aus den unterschiedlichen Architekturen der eingebauten Triazole resultieren können.<sup>[10c,f-h]</sup>

Unseres Wissens wurden bisher 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazole nicht als Disulfidbrückenersatz in Betracht gezogen. In dieser Arbeit berichten wir über den Einbau von 1,4- und 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazolen in die monocyclische Variante des „Sunflower-Trypsininhibitors I“ (SFTI-1[1,14], 1,<sup>[11]</sup> Abbildung 1) und zeigen, dass im Unterschied zu den Peptidmimetika **3** und **4** mit einem „1,4“-Substitutionsmuster

[\*] M. Empting, Dr. O. Avrutina, Dr. R. Meusinger, S. Fabritz, M. Reinwarth, Prof. Dr. H. Kolmar  
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Technische Universität Darmstadt  
Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt (Deutschland)  
Fax: (+49) 6151-16-5399  
E-Mail: kolmar@biochemie.tud.de  
Homepage: <http://www.chemie.tu-darmstadt.de/kolmar>  
Prof. Dr. M. Biesalski  
Ernst-Berl-Institut für Technische und Makromolekulare Chemie  
Technische Universität Darmstadt (Deutschland)  
S. Voigt, Prof. Dr. G. Buntkowsky  
Eduard-Zintl-Institut für Anorganische und Physikalische Chemie  
Technische Universität Darmstadt  
Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant Ko 1390/9-1), den LOEWE-Forschungsschwerpunkt Soft Control und das BMBF unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201008142> zu finden.



**Abbildung 1.** Chemische Struktur von monocyclischem SFTI-1[1,14] (**1**), [<sup>[11]</sup> [Ala<sup>3</sup>(&<sup>1</sup>), Ala<sup>11</sup>(&<sup>2</sup>)]]SFTI-1[1,14][(&<sup>1</sup>-CH<sub>2</sub>-1,5-[1,2,3]triazolyl-&<sup>2</sup>)] (**2**), [<sup>[11]</sup> [Ala<sup>3</sup>(&<sup>1</sup>), Ala<sup>11</sup>(&<sup>2</sup>)]]SFTI-1[1,14][(&<sup>1</sup>-1,4-[1,2,3]triazolyl-&<sup>2</sup>)] (**3**) und [<sup>[11]</sup> [Ala<sup>3</sup>(&<sup>1</sup>), Ala<sup>11</sup>(&<sup>2</sup>)]]SFTI-1[1,14][(&<sup>1</sup>-CH<sub>2</sub>-1,4-[1,2,3]triazolyl-&<sup>2</sup>)] (**4**), &= Verknüpfung des Peptidrückgrats mit dem jeweiligen Makrocyclisierungsmotiv.

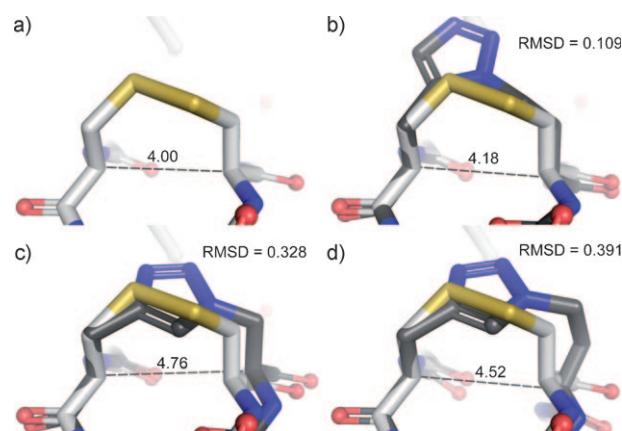
die „1,5“-Variante **2** fast die gleiche biologische Aktivität wie **1** hat.

Verbindung **1** wurde aus mehreren Gründen als Modellpeptid für die Untersuchung von Triazolbrücken als Disulfidersatz ausgewählt. SFTI-1 ist ein kleiner, aber hoch potenter Trypsininhibitor.<sup>[11,12]</sup> Folglich lassen sich die Auswirkungen der verschiedenen Makrocyclisierungsarten anhand der biologischen Aktivität der betreffenden synthetischen Varianten mithilfe eines Serinprotease-Inhibitionstest leicht überprüfen.<sup>[3e,6e,11,12c,13]</sup>

Craik und Mitarbeiter untersuchten intensiv die Struktur und die proteolytische Stabilität der monocyclischen und der linearen Variante von SFTI-1 und zeigten, dass die Disulfidbrücke für die Inhibitoraktivität der offenkettigen Spezies essenziell ist.<sup>[12a,b,14]</sup> Des Weiteren haben Roller et al. und Rolka et al. gezeigt, dass ein Disulfidersatz toleriert wird, sofern er den sterischen Ansprüchen am Rest 3 genügt (Abbildung 1).<sup>[6e,12c,15]</sup>

Die publizierte Struktur von SFTI-1[1,14] (PDB-Code: 1JBN)<sup>[12a]</sup> ermöglichte es uns, die verschiedenen Triazol-verbrückten Peptidketten zu modellieren und ihre Übereinstimmung mit der disulfidverbrückten Vorlage **1** zu bewerten (Abbildung 2).

Die Überlagerung der berechneten Strukturen der Peptidmimetika **2–4** mit der von Peptid **1** gab einen Einblick in die sterischen Gegebenheiten der ausgewählten Triazolbrücken und lieferte Hinweise auf eine mögliche Störung der Konformation des Peptidrückgrats (Abbildung 2b–d). Die Implementierung von 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazolen führte zu einem vergrößerten Abstand der C<sub>a</sub>-Atome zwischen Rest 3 und 11 gegenüber dem der Cysteine in **1** (Abbildung 2c,d). Im Fall der 1,5-disubstituierten Spezies hingegen blieb der Abstand nahezu gleich (Abbildung 2a,b). Bedingt durch die starre planare Struktur des aromatischen Heterocycles sind die „1,4“-Varianten **3** und **4** nicht in der Lage, die native Konformation von **1** exakt anzunehmen, und der Abstand zwischen den Resten 3 und 11 wird größer. Im Vergleich dazu scheint das „1,5“-Substitutionsmuster von **2** kompatibel mit der intrinsischen Geometrie von **1** zu sein.



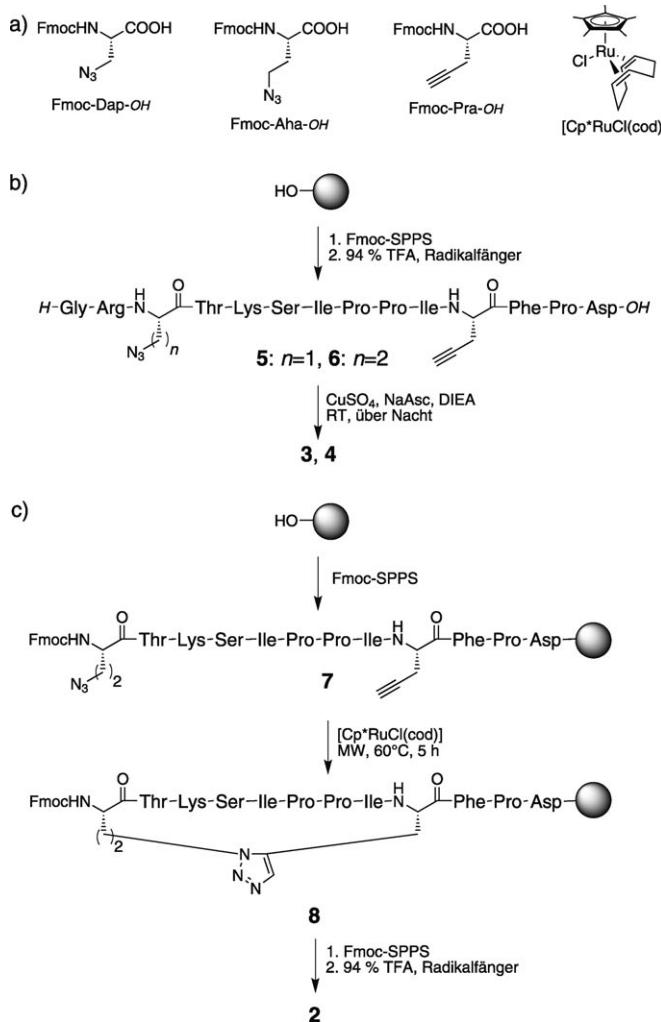
**Abbildung 2.** Struktur und Überlagerung der energieminierten 3D-Modelle von den SFTI-1-Varianten **1–4** (gezeigt ist die Region der Disulfidbrücke und der jeweiligen Triazolbrücken): a) **1**, b) **1** und **2**, c) **1** und **3**, d) **1** und **4**.<sup>[12a]</sup> Die Modelle wurden an dem betreffenden Carbonylkohlenstoffatom, C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub> und dem Amidstickstoffatom des Restes 11 ausgerichtet. Die berechneten quadratisch gemittelten Abweichungen (RMSD) für die Carbonylkohlenstoffatome C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub> und die Amidstickstoffatome der Reste 3 und 11 der verglichenen Strukturen sind in Å gegeben. Die gemessenen Abstände zwischen den C<sub>α</sub>-Atomen der Reste 3 und 11 der entsprechenden Strukturen sind durch gestrichelte Linien veranschaulicht, und ihre Werte sind in Å angegeben. Blau: Stickstoff, hellgrau: Kohlenstoffatome von **1**, dunkelgrau: Kohlenstoffatome von **2–4**, rot: Sauerstoff, gelb: Schwefel; Wasserstoffatome sind aus Übersichtsgründen weggelassen (für Details siehe die Hintergrundinformationen).

Nach diesem Modell ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Inhibitionseigenschaften der Verbindungen **2**, **3** und **4**, abhängig von der Art ihrer Makrocyclisierung, zu erwarten.

SFTI-1[1,14] (**1**) wurde durch mikrowellenunterstützte Fmoc-SPPS synthetisiert und anschließend mit DMSO oxidiert (siehe die Hintergrundinformationen). In gleicher Weise wurden **3** und **4** mithilfe der kommerziell verfügbaren SPPS-Bausteine Fmoc-L-Propargylglycin (Fmoc-Pra-OH) und Fmoc-L-Azidoalanin (Fmoc-Aza-OH) oder Fmoc-L-Azido-homoalanin (Fmoc-Aha-OH) synthetisiert, was zunächst jeweils zu den linearen Vorstufen **5** ([Aza<sup>3</sup>,Pra<sup>11</sup>]SFTI-1[1,14]) und **6** ([Aha<sup>3</sup>,Pra<sup>11</sup>]SFTI-1[1,14]) führte (Schema 1a,b). Nach der Abspaltung von der festen Phase unter sauren Bedingungen wurde die CuAAC-Makrocyclisierung der ungeschützten Peptide **5** und **6** in verdünnter Lösung durchgeführt.

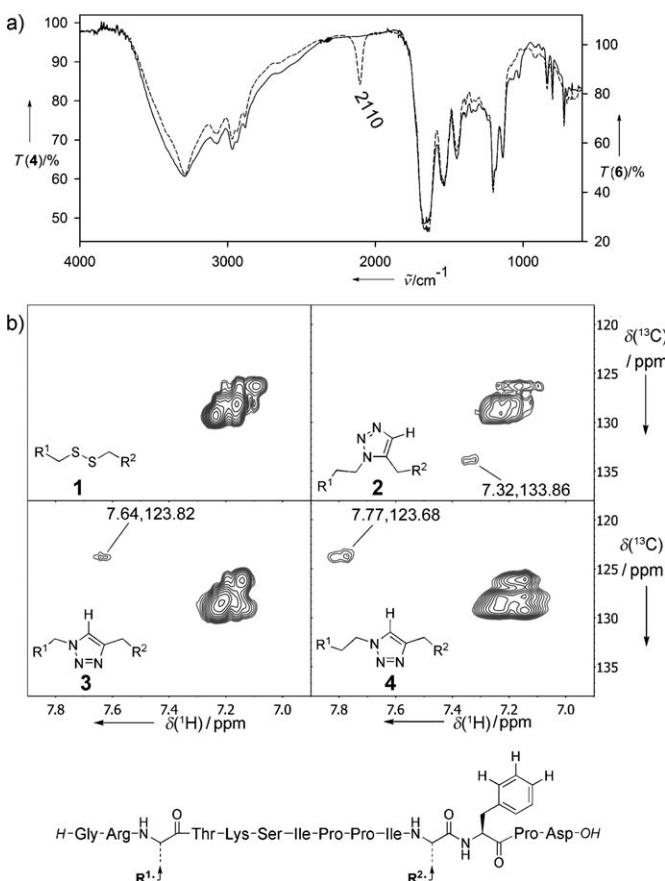
Die RuAAC-Methode ist, wie erwartet, mit einer Makrocyclisierung des ungeschützten Peptids **6** in Lösung nicht kompatibel, da dies zu einer Mischung mit undefinierten Nebenprodukten führt. Allerdings konnte der 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazolring erfolgreich während der Festphasensynthese mithilfe des Katalysators [Cp<sup>\*</sup>RuCl(cod)] und Mikrowelleneinstrahlung installiert werden, was zu Verbindung **2** führte, die allerdings in geringer Ausbeute anfiel (2.1% gemäß der Anfangsbeladung des Harzes, Schema 1c). Die aufgereinigten Peptide **1–6** wurden durch RP-HPLC, ESI-MS, IR- und NMR-Spektroskopie charakterisiert.

Die Bildung einer intramolekularen Triazolbrücke hat keine Änderung der Molmasse zur Folge und kann deshalb durch Massenspektrometrie nicht ohne weiteres detektiert



**Schema 1.** a) Die nichtnatürlichen Aminosäurebausteine Fmoc-L-Azidoalanin (Fmoc-Aza-OH), Fmoc-L-Azidohomoalanin (Fmoc-Aha-OH), Fmoc-L-Propargylglycin (Fmoc-Pra-OH) und der Katalysator für die RuAAC-Makrocyclisierung. b) Synthese der Peptidmimetika **3** und **4**, verbrückt durch 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazole. c) Synthese von Peptidmimetikum **2**, verbrückt durch ein 1,5-disubstituiertes 1,2,3-Triazol. Cp\* =  $\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5$ , cod = 1,5-Cyclooctadien, DIEA = N,N-Diisopropylethylamin, Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl, NaAsc = Natriumascorbat, SPPS = Protein-Festphasensynthese, TFA = Trifluoressigsäure.

werden. Allerdings verfügt die Azidgruppe über eine charakteristische IR-Absorptionsbande um  $2100\text{ cm}^{-1}$ .<sup>[16]</sup> Diese Bande ist in der Regel durch keines der vielen IR-Signale eines gewöhnlichen Peptids überlagert, und ihr Verschwinden bei den Produkten **2**, **3** und **4** zeigt somit die Bildung des Triazols an (Abbildung 3a). 2D-HSQC-NMR-Studien ermöglichen uns, die 1,4- und 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazole durch die Messung der chemischen Verschiebung des  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Kopplungssignals des einzigen Kohlenstoff-gebundenen Protons in beiden Heterocyclen zu unterscheiden (Abbildung 3b). Die Signale dieses einen Protons und des dazugehörigen Kohlenstoffkerns an Position 5 oder 4 in den 1,4- bzw. 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazol-verbrückten Verbindungen **2**, **3** und **4** befinden sich im aromatischen Bereich zwischen  $\delta = 7.8$  und  $7.3\text{ ppm}$  ( $^1\text{H}$ ) bzw.  $\delta = 135$  und  $120\text{ ppm}$

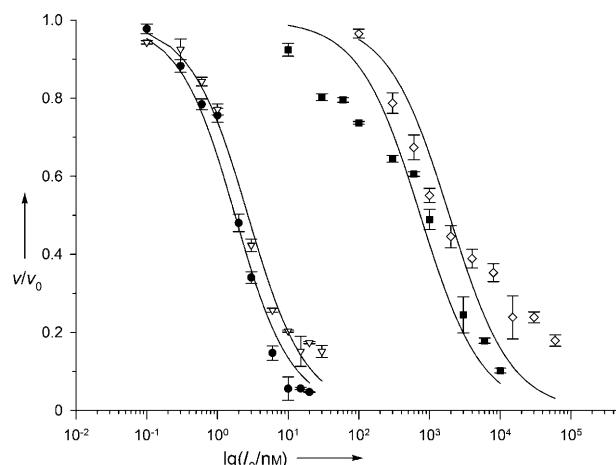


**Abbildung 3.** a) Übereinandergelegte IR-Transmissionsspektren der Peptide **4** (—) und **6** (----); die Bande der asymmetrischen NNN-Streckschwingung der Azidgruppe von **6** erscheint bei  $2110\text{ cm}^{-1}$ . b) Aromatische Region der 2D-HSQC-NMR-Spektren ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Korrelation) für die Peptide **1–4**. Angegeben sind die zugehörigen Strukturen und die  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebungen des einzigen Kohlenstoff-gebundenen Protons der 1,4- und 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazole.

( $^{13}\text{C}$ ). Somit konnten diese von nicht Kohlenstoff-gebundenen Protonen und dem intrinsischen Phenylmultiplett der Seitenkette von Rest 12 eindeutig unterschieden werden. Die gemessenen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebungen sind in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten<sup>[10d]</sup> und zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen dem „1,4“- und dem „1,5“-Substitutionsmuster. Somit konnten die vorhergesagten Konstitutionen der RuAAC- und CuAAC-Produkte **2**, **3** und **4** bestätigt werden (Abbildung 3b).

Die inhibitorische Aktivität der Peptide **1–6** wurde durch kinetische Studien mit Trypsin, dessen aktives Zentrum zuvor titriert worden war, bestimmt (siehe Abbildung 4 und die Hintergrundinformationen).<sup>[17]</sup>

Die bestimmten  $K_{\text{i}}^{\text{app}}$ -Werte für die Verbindungen **1–6** sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Das Peptidmimetikum **2** mit dem „1,5“-Substitutionsmuster zeigte eine Inhibition im nanomolaren Bereich, die mit der der disulfidverbrückten Variante **1** vergleichbar ist. Dagegen zeigten die monocyclischen SFTI-1-Varianten **3** und **4**, die durch CuAAC-Makrocyclisierungen erhalten worden waren, eine wesentlich geringere inhibitorische Aktivität gegen Trypsin. Zwei Ursachen können als plausible Erklärung für diesen Befund ge-



**Abbildung 4.** Kinetische Daten der Inhibition der von Trypsin katalysierten Proteolyse des chromogenen Substrates Boc-QAR-pNA (Bachem) durch die SFTI-1-Varianten **1** (●), **2** (▽), **3** (◇) und **4** (■) und die daraus folgende Kurve der Morrison-Gleichung (Anpassung unter Verwendung des Marquardt-Levenberg-Algorithmus von SigmaPlot 11). Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung jedes Messpunktes (Dreifachbestimmung).

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der ermittelten  $K_i^{\text{app}}$ -Werte der Verbindungen **1–6**.

| Nr.      | Verbrückungsmotiv                     | $K_i^{\text{app}} [\text{nM}]^{[a]}$ | relative Aktivität <sup>[b]</sup> |
|----------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>1</b> | Cystin                                | $1.48 \pm 0.1$                       | 1                                 |
| <b>2</b> | 1,5-disubstituiertes<br>1,2,3-Triazol | $2.4 \pm 0.14$                       | 1.6                               |
| <b>3</b> | 1,4-disubstituiertes<br>1,2,3-Triazol | $1908 \pm 261$                       | 1288                              |
| <b>4</b> | 1,4-disubstituiertes<br>1,2,3-Triazol | $742 \pm 88$                         | 501                               |
| <b>5</b> | –                                     | $1916 \pm 205$                       | 1293                              |
| <b>6</b> | –                                     | $13\,845 \pm 1835$                   | 9347                              |

[a] Standardfehler der nichtlinearen Regression ist angegeben. [b] Relative Aktivität ist gegeben als Verhältnis der  $K_i^{\text{app}}$ -Werte für die betreffende Verbindung und das Peptid **1**.

nannt werden. Erstens erscheint eine genaue Einpassung des „1,4“-Musters in die aktive Konformation aufgrund des starren 1,2,3-Triazolrings nicht möglich, weswegen sich der Verbrückungsabstand des Peptidrückgrats erhöht. Über eine gewisse Toleranz des Rückgrats von monocyclischem SFTI-1 bezüglich der Länge beweglicher, flexibler Linker wurde kürzlich berichtet.<sup>[15]</sup> Allerdings können, wie unsere Daten zeigen, die Auswirkungen eines Disulfidbrückenersatzes mit starrer Struktur drastisch sein. Als einen weiteren Grund für die reduzierte Aktivität der Verbindungen **3** und **4** sollte man sterische Aspekte in Nachbarschaft oder direkt am  $\text{C}_\beta$ -Atom des Restes 3 in Betracht ziehen, da zuvor gezeigt wurde, dass sperrige Reste an dieser Position den inhibitorischen Effekt stark vermindern können.<sup>[15a]</sup>

Hier haben wir die Eignung von 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazolbrücken als Disulfidersatz demonstriert. Im Vergleich zu den natürlichen Bausteinen können für diesen Disulfidersatz aufgrund seiner Redoxstabilität und seiner Andersar-

tigkeit verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften erwartet werden. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Reihe von biologisch aktiven Molekülen keine derartig ausgeprägte Präferenz des „1,5“-Substitutionsmusters gegenüber den „1,4“-Varianten zeigt wie die hier beschriebenen Strukturen. Die Variation zwischen den RuAAC- und CuAAC-Makrocyclisierungsstrategien bietet einen modularen Ansatz für maßgeschneiderte heterodetische Verbindungen unter Verwendung kommerziell erhältlicher Bausteine. Experimente zur Synthese von Peptiden, die sowohl eine Triazol- als auch eine Disulfidbrücke enthalten, werden derzeitig durchgeführt. Eine solche Strategie könnte helfen, die Schwierigkeiten zu überwinden, die oftmals während der oxidativen Faltung von cysteinreichen Peptiden *in vitro* auftreten.

Eingegangen am 23. Dezember 2010,  
veränderte Fassung am 21. Februar 2011  
Online veröffentlicht am 4. Mai 2011

**Stichwörter:** Disulfidbrücken · Klick-Chemie · Peptidmimetika · SFTI-1 · Trypsininhibition

- [1] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- [2] a) H. Kolmar, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *9*, 608–614; b) D. J. Craik, J. S. Mylne, N. L. Daly, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 9–16.
- [3] a) A. Berezov, H. T. Zhang, M. I. Greene, R. Murali, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2565–2574; b) A. Shrivastava, M. A. von Wronski, A. K. Sato et al., *Protein Eng. Des. Sel.* **2005**, *18*, 417–424; c) M. A. Fazio, V. X. Oliveira, Jr., P. Bulet, M. T. Miranda, S. Daffre, A. Miranda, *Biopolymers* **2006**, *84*, 205–218; d) T. S. Han, M. M. Zhang, A. Walewska, P. Gruszczynski, C. R. Robertson, T. E. Cheatham III, D. Yoshikami, B. M. Olivera, G. Bulaj, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 406–414; e) R. G. Boy, W. Mier, E. M. Nothelfer, A. Altmann, M. Eisenhut, H. Kolmar, M. Tomaszowski, S. Kramer, U. Haberkorn, *Mol. Imaging Biol.* **2010**, *12*, 377–385.
- [4] a) L. Moroder, D. Besse, H. J. Musiol, S. Rudolph-Bohner, F. Siedler, *Biopolymers* **1996**, *40*, 207–234; b) I. Annis, B. Hargittai, G. Barany, *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 198–221; c) C. J. Armishaw, J. L. Dutton, D. J. Craik, P. F. Alewood, *Biopolymers* **2009**, *94*, 307–313; d) J. Zhang, S. Diamond, T. Arvedson, B. J. Sasu, L. P. Miranda, *Biopolymers* **2010**, *94*, 257–264; e) M. Muttenthaler, S. T. Nevin, A. A. Grishin et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3514–3522; f) A. M. Steiner, G. Bulaj, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 1–7.
- [5] a) I. Annis, L. Chen, G. Barany, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7226–7238; b) B. Hargittai, G. Barany, *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 468–479.
- [6] a) L. Yu, Y. Lai, J. Wade, S. M. Coutts, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6633–6636; b) A. K. Galande, J. O. Trent, A. F. Spatola, *Biopolymers* **2003**, *71*, 534–551; c) M. Roice, I. Johannsen, M. Meldal, *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 662–673; d) J. Elaridi, J. Patel, W. R. Jackson, A. J. Robinson, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7538–7545; e) S. Jiang, P. Li, S. L. Lee, C. Y. Lin, Y. Q. Long, M. D. Johnson, R. B. Dickson, P. P. Roller, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 9–12; f) M. A. Hossain, K. J. Rosengren, S. Zhang, R. A. Bathgate, G. W. Tregear, B. J. van Lierop, A. J. Robinson, J. D. Wade, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1547–1553.
- [7] a) C. W. Tornøe, M. Meldal, *Peptides: The Wave of the Future*, Proceedings of the Second International and the Seventeenth

- American Peptide Symposium **2001**, S. 263–264; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; c) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064; d) Y. L. Angell, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674–1689; e) G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278–308; f) J. F. Lutz, Z. Zarafshani, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 958–970; g) O. Avrutina, M. Empting, S. Fabritz, M. Daneschdar, H. Frauendorf, U. Diederichsen, H. Kolmar, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4177–4185.
- [8] a) W. S. Horne, M. K. Yadav, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366–15367; b) A. Brik, J. Alexandratos, Y. C. Lin, J. H. Elder, A. J. Olson, A. Wlodawer, D. S. Goodsell, C. H. Wong, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1167–1169; c) K. Oh, Z. Guan, *Chem. Commun.* **2006**, 3069–3071; d) J. M. Beierle, W. S. Horne, J. H. van Maarseveen, B. Waser, J. C. Reubi, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4819–4823; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4725–4729.
- [9] a) J. H. van Maarseveen, W. S. Horne, M. R. Ghadiri, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4503–4506; b) Y. Angell, K. Burgess, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9595–9598; c) V. D. Bock, R. Perciaccante, T. P. Jansen, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 919–922; d) R. A. Turner, A. G. Oliver, R. S. Lokey, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5011–5014; e) V. Goncalves, B. Gautier, A. Regazzetti, P. Coric, S. Bouaziz, C. Garbay, M. Vidal, N. Inguimbert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5590–5594; f) V. D. Bock, D. Speijer, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 971–975; g) S. Cantel, C. Isaad Ale, M. Scrima et al., *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5663–5674; h) R. Jagasia, J. M. Holub, M. Bollinger, K. Kirshenbaum, M. G. Finn, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2964–2974; i) A. Le Chevalier Isaad, A. M. Papini, M. Chorev, P. Rovero, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 451–454; j) M. Nahrwold, T. Bogner, S. Eissler, S. Verma, N. Sewald, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1064–1067.
- [10] a) L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998–15999; b) L. K. Rasmussen, B. C. Boren, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5337–5339; c) G. Appendino, S. Bacchiesca, A. Minassi, M. G. Cascio, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9472–9475; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9312–9315; d) A. Tam, U. Arnold, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12670–12671; e) B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923–8930; f) A. R. Kelly, J. Wei, S. Kesavan, J. C. Marie, N. Windmon, D. W. Young, L. A. Marcaurelle, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2257–2260; g) W. S. Horne, C. A. Olsen, J. M. Beierle, A. Montero, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4812–4818; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4718–4724; h) D. Tietze, M. Tischler, S. Voigt, D. Imhof, O. Ohlenschlager, M. Gorlach, G. Buntkowsky, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7572–7578.
- [11] M. L. Korsinczky, H. J. Schirra, D. J. Craik, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 351–364.
- [12] a) M. L. Korsinczky, H. J. Schirra, K. J. Rosengren, J. West, B. A. Condie, L. Otvos, M. A. Anderson, D. J. Craik, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 579–591; b) U. C. Marx, M. L. Korsinczky, H. J. Schirra, A. Jones, B. Condie, L. Otvos, Jr., D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 21782–21789; c) P. Li, S. Jiang, S. L. Lee, C. Y. Lin, M. D. Johnson, R. B. Dickson, C. J. Michejda, P. P. Roller, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5976–5983.
- [13] E. Zablotna, K. Kazmierczak, A. Jaskiewicz, M. Stawikowski, G. Kupryszewski, K. Rolka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 855–859.
- [14] a) M. L. Korsinczky, R. J. Clark, D. J. Craik, *Biochemistry* **2005**, *44*, 1145–1153; b) M. L. Colgrave, M. J. Korsinczky, R. Clark, F. Foley, D. J. Craik, *Biopolymers* **2010**, *94*, 665–672.
- [15] a) A. Legowska, D. Debowski, R. Lukajtis, M. Wysocka, C. Czaplewski, A. Lesner, K. Rolka, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8188–8193; b) A. Legowska, E. Bulak, A. Jaskiewicz, I. Maluch, M. Sieracki, M. Wysocka, A. Lesner, K. Rolka, *Protein Pept. Lett.* **2010**, *17*, 1223–1227.
- [16] a) C. J. Nielsen, C. E. Sjøgfogren, *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1987**, *150*, 361–379; b) F. F. Chen, F. Wang, *Molecules* **2009**, *14*, 2656–2668.
- [17] a) O. Avrutina, H. U. Schmoldt, D. Gabrijelcic-Geiger, D. Le Nguyen, C. P. Sommerhoff, U. Diederichsen, H. Kolmar, *Biol. Chem.* **2005**, *386*, 1301–1306; b) J. F. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* **1969**, *185*, 269–286.