

Ein Auxiliartyp für die native chemische Peptidligation jenseits von Cystein und Glycin

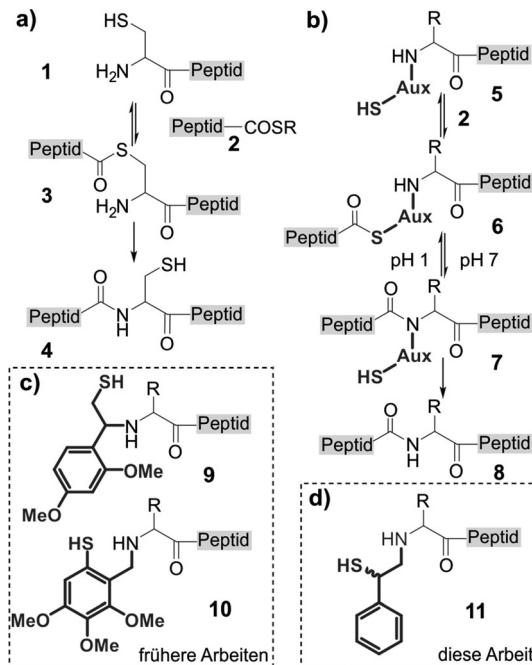
Simon F. Loibl, Ziv Harpaz und Oliver Seitz*

Professor Horst Kunz zum 75. Geburtstag gewidmet

Abstract: Um den Anwendungsbereich der nativen chemischen Ligation über N-terminale Cysteinreste hinaus zu erweitern, wurden bislang thiolfunktionalisierte Auxiliare verwendet. Allerdings sind die Reaktionsgeschwindigkeiten mit den bisher eingesetzten Auxiliaren vom N-Benzyl-Typ eher gering. Um die Bindungsspaltung durch eine radikalische Fragmentierungsreaktion zu initiieren, wurde nun ein neues Auxiliar entwickelt, das in Gegenwart von TCEP und Morpholin unter mild basischen Bedingungen (pH 8.5) abgespalten wird. Das 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliar ist anders als früher beschriebene Auxiliare nicht auf glycinhaltige Schnittstellen beschränkt, sondern ermöglicht auch sterisch anspruchsvolle Peptidligationen. Das Auxiliar wird in hoher Ausbeute durch reduktive Aminierung mit kommerziell erhältlichen Aminosäurebausteinen an der Festphase eingeführt. Der präparative Nutzen der Methode wird durch die Synthese der antimikrobiellen Proteine DCD-1L und Opistoporin-2 demonstriert.

Die native chemische Ligation (NCL) wird häufig für die chemische Totalsynthese von Proteinen genutzt.^[1] Kennzeichen dieser chemoselektiven Segmentverknüpfung sind ein Thiolaustausch zwischen einem ungeschützten Peptidthioester **2** und einem ungeschützten Cysteinylpeptid **1** und ein nachfolgender intramolekularer S→N-Acyltransfer im thioesterverknüpften Intermediat **3** (Schema 1a), der die native Peptidbindung liefert. Allerdings fehlt vielen Proteinen ein Cysteinrest.

Zwei unterschiedliche Ansätze wurden entwickelt, um die NCL auch für Ligationen an anderen Resten als Cystein zu nutzen. In der auxiliarvermittelten NCL wird eine mercaptofunktionalisierte Gruppe am N-Terminus des C-terminalen Segments angebracht (**5** in Schema 1b).^[2] Die nativen Peptide **8** werden in diesem Fall nach photolytischer^[3] oder weit häufiger acidolytischer Abspaltung^[4] des Auxiliars erhalten. Niedrige Ausbeuten an anderen als Gly-Gly-Ligationsstellen sowie die Tendenz zur Spaltung der aufgebauten Amidbindung während der acidolytischen Auxiliarentfernung sind wiederkehrende Probleme der meist verwendeten N-Benzyl-basierten Auxiliare (z. B. **9**, **10**). Alternativ bietet die Ligations-Entschwefelungs-Strategie Zugang zu cysteinfreien Li-



Schema 1. Überblick zu a) NCL und b) auxiliarvermittelter Peptidligation. c) Beispiele für derzeit gängige Auxiliare, d) Struktur des von uns entworfenen 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliars.

gationsstellen.^[5] Hier werden thiolmodifizierte Aminosäuren am N-Terminus des C-terminalen NCL-Reaktionspartners eingesetzt. Allerdings können nur 4 der 13 Ligationsschnittstellen, die mithilfe der bisher bekannten thiolmodifizierten Bausteine zugänglich sind, mit kommerziell verfügbaren Aminosäuren erschlossen werden.^[5c,h,m] Die Notwendigkeit, die kommerziell nicht erhältlichen Bausteine über aufwendige Mehrstufensynthesen (> 50 Stufen für die Vorstufen zu Arg,^[5j] Asp,^[5k] Gln,^[5l] Glu,^[5l] Leu,^[5g] Lys,^[5e] Phe,^[5b] Thr^[5f]) herzustellen, ist eine Beeinträchtigung. Dies ist vermutlich der Grund, weshalb die Anwendung der Ligations-Entschwefelungs-Strategie momentan auf wenige spezialisierte Labors beschränkt ist.

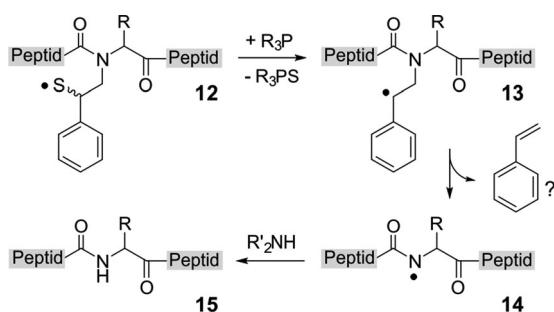
Mit dem Ziel, eine generell anwendbare Ligationsmethode zu entwickeln, die den Einsatz kommerziell erhältlicher Aminosäurebausteine ermöglicht, überdachten wir das Auxiliarkonzept. Die gängigen 2-Mercapto-1-phenethyl-Auxiliare wie **9**^[4b,g] weisen eine Verzweigung am α -Kohlenstoffatom auf (Schema 1c). Dies führt bei Ligationsstellen, die kein Glycin enthalten, zu einer drastischen Verringerung der S→N-Acyltransfersgeschwindigkeit. Alternativ werden 2-

[*] S. F. Loibl, Z. Harpaz, Prof. Dr. O. Seitz
Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201505274> zu finden.

Mercaptobenzyl-Auxiliare wie **10**^[4f] in der erweiterten NCL eingesetzt. Allerdings sind die Ligationsreaktionen eher langsam, da die Reaktion über einen sechsgliedrigen (anstelle eines fünfgliedrigen) Übergangszustand verläuft. Zusätzlich stellt die Reversibilität des S→N-Acyltransfers ein oft beobachtetes Problem dar, das auftritt, sobald die tertiären Amidbindungen den sauren Bedingungen der Auxiliarspaltung ausgesetzt werden.^[4f]

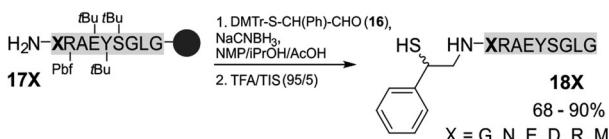
Der Entwurf unseres Auxiliars basiert auf dem 2-Mercapto-2-phenethyl-Grundgerüst **11** (Schema 1d). Da die Ligation über einen fünfgliedrigen Übergangszustand erfolgt und keine α -Verzweigung vorliegt, sollte eine schnelle Reaktion möglich sein. Die Abspaltung sollte unter nichtsauren Bedingungen gelingen. Wir dachten an eine radikalische β -Fragmentierung (Schema 2). Nach unserer Hypothese sollte



Schema 2. Hypothetischer Mechanismus zur Entfernung eines 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliars.

das Thiylradikal **12** analog wie bei der radikalischen Entschwefelung^[6] durch Reaktion mit einem Phosphoran das Benzylradikal **13** bilden. Bei Abwesenheit eines reaktiven Wasserstoffdonors sollten durch β -Fragmentierung das Amidradikal **14** und Styrol entstehen, wobei letzteres unter den Abspaltbedingungen möglicherweise Folgereaktionen unterliegt. Wir vermuteten, dass das stickstoffzentrierte Amidradikal einfach durch Amine abgefangen werden könnte, die wie Morpholin nicht reaktiv genug für das Abfangen des Benzylradikals **13** sind.^[7]

Da das Auxiliar nach erfolgter Ligation entfernt wird, spielt seine Chiralität für das Endprodukt keine Rolle. Aus diesem Grund kann das 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliar einfach durch reduktive Aminierung des racemischen Alkylaldehyds mit dem N-Terminus des Peptids in der letzten Stufe der Festphasenpeptidsynthese eingeführt werden (Schema 3). Das Auxiliar wurde mit dem racemischen Aldehyd **16** (Synthese in Schema S1 in den Hintergrundinformationen) im



Schema 3. Synthese auxiliarsubstituierter Peptide durch reduktive Aminierung während der Festphasenpeptidsynthese. DMTr: 4,4'-Dimethoxytrityl, NMP: N-Methyl-2-pyrrolidon, TFA: Trifluoressigsäure, TIS: Triisopropylsilan.

Überschuss und $NaCNBH_3$ (Schema 3) an das ans Harz gebundene Glycin-Modellpeptid **17G** gekuppelt. Die UPLC-MS-Analyse des nach der TFA-Abspaltung erhaltenen Rohprodukts belegte einen nahezu quantitativen Umsatz zum gewünschten auxiliarsubstituierten Peptid **18G** innerhalb von vier Stunden (Abbildung S2). Eine ähnliche Vorgehensweise ergab die Asparagin-, Glutaminsäure-, Asparaginsäure-, Arginin- und Methioninpeptide **18X**.

Anschließend setzten wir das 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliar in NCL-Reaktionen ein. Wir verglichen die Geschwindigkeiten von acht Peptidligationen (Abbildung 1a). Die Ligation war viel schneller als mit den gängigen Auxiliaren. Wie vermutet, verlief die Gly-Gly-Ligation besonders rasch und erreichte innerhalb von 60 min einen vollständigen Umsatz (Abbildung 1a). Wie schon für andere NCLs berichtet,^[9] ergab die Reaktion kleine Mengen (ca. 6%) des N- und S-acylierten Ligationsprodukts **21GG** (Abbildung 1b). Im Fall der sterisch etwas anspruchsvoller Ser-Gly-Ligation wurde keine doppelte Acylierung beobachtet (Abbildung 1c). Die Reaktionen an den Ala-Gly- und Leu-Gly-Schnittstellen benötigten 2–4 h, um $\geq 80\%$ des Produkts zu

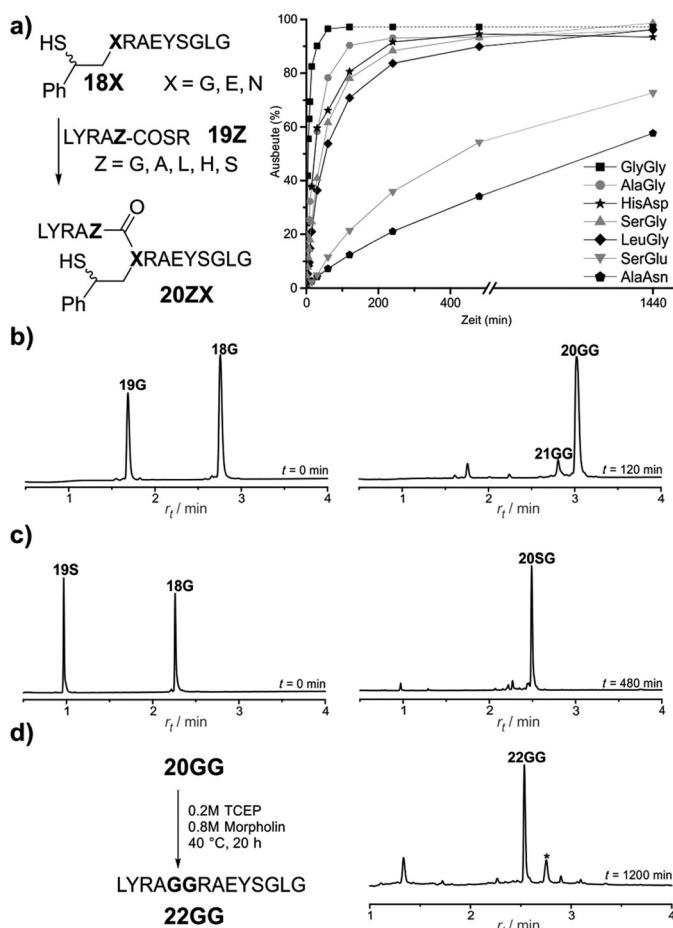


Abbildung 1. a) Zeitlicher Verlauf der Ligation zwischen den Peptiden **18X** und den Peptidthioestern **19Z**; Ligationsbedingungen: 5 mm Peptid, 20 mm TCEP, 100 mM Phosphat, 3 Vol.-% PhSH,^[9] 25 °C, pH 7.5. UPLC-Analyse (UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography; $\lambda = 210$ nm) der b) Gly-Gly-, c) Ser-Gly-Ligation und d) Abspaltung des Auxiliars vom gereinigten Ligationsprodukt **20GG** nach 20 h.

liefern (siehe Abbildung S18). Bemerkenswert ist vor allem, dass mit dem 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliar Ligationen an Schnittstellen möglich sind, die kein Glycin enthalten. Solche Reaktionen haben sich mit den gängigen Auxiliaren als schwierig, wenn nicht unmöglich erwiesen. Die His-Asp-Ligation verlief besonders schnell (90% Ausbeute nach 4 h), aber auch die Ala-Asn- und Ser-Glu-Ligation ergaben bei niedriger Konzentration (5 mm) innerhalb von 8–24 h mehr als 50% Produkt (siehe auch Abbildung S19). Höhere Ausbeuten wurden erreicht, wenn die Reaktionen mit dem Thioester im Überschuss durchgeführt wurden (siehe unten).

Im nächsten Schritt sollte das Auxiliar vom gereinigten Ligationsprodukt entfernt werden. Auf Grundlage unserer früheren Erfahrungen^[10] erwarteten wir, dass bei hohen Konzentrationen an Triscarboxyethylphosphan (TCEP) das Benzylradikal **13** zügig gebildet werden sollte, vermutlich initiiert durch Einwirkung von Licht oder Sauerstoff. Als Amidradikalfänger testeten wir unterschiedliche Amine (Abbildung S22) und fanden heraus, dass eine Behandlung der Auxiliar tragenden Ligationsprodukte, z.B. **20GG**, mit einer wässrigen Lösung von TCEP (0.2 M) und Morpholin im Überschuss (0.8 M) bei pH 8.5 in einer glatten Reaktion innerhalb von 20 h zur quantitativen Abspaltung des Auxiliars führte (Abbildung 1d). Erwähnenswert ist, dass die Abspaltungsreaktion durch den klassischen Radikalfänger TEMPO vollständig unterdrückt wurde (Abbildung S24).

Um eine intermediäre HPLC-Reinigung zu vermeiden, entwickelten wir eine geradlinigere Eintopfvariante, bei der sich der Peptidligation die Auxiliarabspaltung direkt anschließt (Tabelle 1), indem nach Beendigung der Ligation eine wässrige Lösung von TCEP und Morpholin (pH 8.5) zugegeben wird. Zum Aufbau der Gly-Gly-Bindung von **22GG** wurde der Thioester **19G** und das auxiliarsubstituierte Peptid **18G** in 2 mm Konzentration im Phosphatpuffer bei pH 7.5 zur Reaktion gebracht. Nach zwei Stunden wurde die Reaktion mit einer wässrigen Lösung von TCEP (200 mM) und Morpholin (800 mM) verdünnt und 36 h bei 40 °C inkubiert.

Tabelle 1: Ausbeuten von Eintopf-Ligations-Auxiliarabspaltungs-Reaktionen.^[a]

19Z	18X	Ligation Ausb. ^[b]	Abspaltung ^[b]	22ZX ^[c]
				Zeit
19G ^[d]	18G	> 99 / 1 h	74	22GG (58)
19L ^[d]	18G	86 / 14 h	76	22LG (44)
19C ^[d]	18N	94 / 20 h	82	22GN (49)
19H ^[d]	18D	> 99 / 24 h	79	22HD (45)
19L ^[e]	18R	77 / 24 h	88	22LR (35)
19F ^[e]	18M	91 / 24 h	89	22FM (37)

[a] Bedingungen: Die Peptide (2–5 mM) werden in Puffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH,^[9] pH 7.5) gelöst, und nach der Ligation wird durch Zugabe einer wässrigen Lösung von TCEP (0.1–1.0 M) und Morpholin (1–4 M) bei pH 8.5 das Auxiliar abgespalten; für Details siehe die Hintergrundinformationen. [b] Analytische Ausbeute in %, bestimmt durch UPLC-MS-Analyse. [c] Die Ausbeute (über zwei Stufen) nach HPLC-Reinigung ist in Klammern angegeben. [d] R = (CH₂)₃CONHCH₂CONH₂. [e] R = Ph.

bietet. Nach HPLC-Reinigung wurde das native Peptid **22GG** in einer Gesamtausbeute von 58% erhalten. Da 75% Rückgewinnung für die verwendete HPLC/Gefrieretrocknungs-Prozedur ermittelt wurden, ist dies eine hohe Ausbeute. Bei der Synthese der Leu-Gly- und Gly-Asn-Ligationsprodukte wurde die Peptidkonzentration auf 5 mM erhöht und dem Puffer Guanidinhydrochlorid (GnHCl) zugesetzt. Nach 14–20 h war die Ligation beendet. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit einer wässrigen Lösung von TCEP und Morpholin verdünnt. Die Abspaltung des Auxiliars lief ebenfalls in GnHCl-haltigem Puffer ab. Die beiden nativen Peptide wurden in einer Ausbeute von 44% und 49% (über zwei Stufen) erhalten.

Als Nächstes wendeten wir uns mit His-Asp-, Leu-Arg- und Phe-Met-Ligationen Eintopfreaktionssequenzen zu, bei denen Glycin nicht an der Ligation beteiligt ist. Um die Reaktion anzutreiben, wurde nach 8 h (Leu-Arg, Phe-Met) oder 24 h (His-Asp) zusätzlicher Peptidthioester (0.5–1 Äquiv.) zugegeben. Die Ligationsprodukte zeigten in 0.1-proz. TFA eine Tendenz zur Bildung des unerwünschten N→S-Acyltransferprodukts (Abbildung S21b). Diese Nebenreaktion verdeutlicht den Vorteil der mild basischen (statt sauren) Bedingungen, unter denen das 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliar ohne Hinweis auf eventuell ablaufende N→S-Acyltransferreaktionen entfernt werden konnte (Abbildung S21c).

Wir verwendeten das 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliar für die Synthese von Dermcidin DCD-1L (**26**, Abbildung 2). Dieses antimikrobielle Peptid wird in menschlichen Schweißdrüsen exprimiert und dient als Vorstufe für mehrere kurze, bioaktive Peptide.^[11] Das Protein enthält eine Gly-Gly-Schnittstelle, die sich ideal für den Einsatz einer auxiliarvermittelten NCL eignet. Für die Synthese des N-terminalen DCD-1L-Segments **23** (1–16) wurde die geschützte Peptidsäure an einem Chlortritylharz aufgebaut und dann durch Reaktion der vollständig geschützten Peptidsäure mit PyBOP und Thiophenol in Lösung in den reaktiven Arylthioester **23** überführt (Abbildung S32).^[12] Die Synthese des C-terminalen

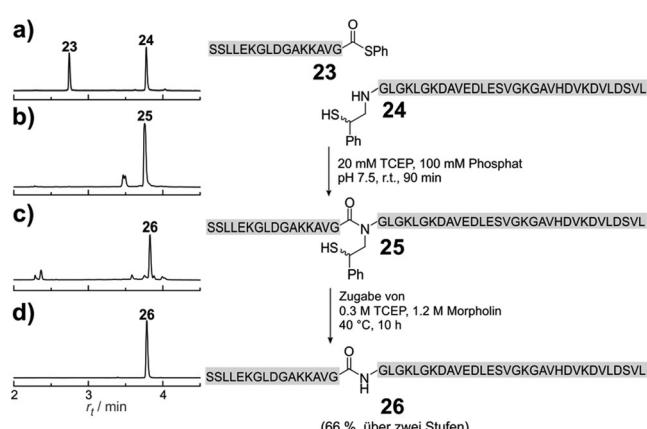


Abbildung 2: Eintopfsynthese von nativem DCD-1L (**26**) durch auxiliarvermittelte Peptidligation und anschließende Auxiliarabspaltung. UPLC-Analyse ($\lambda = 210$ nm) a) vor und b) nach der Ligation, c) des Rohprodukts nach Abspaltung des Auxiliars und d) von gereinigtem **26**. (66 %, über zwei Stufen)

DCD-1L-Segments **24** (17–48) erwies sich als schwieriger. Der Einsatz von Pseudoprolindipeptiden^[13] an den Positionen 31 und 46 führte zu einer deutlich höheren Ausbeute der Fmoc-Festphasensynthese. Nach Einbau des Auxiliars in den N-terminalen Glycinrest über reduktive Aminierung an der festen Phase wurde das HPLC-gereinigte Peptid **24** in einer Gesamtausbeute von 13% erhalten. Die Verknüpfung der beiden Fragmente verlief glatt und in weniger als zwei Stunden (Abbildung 2b). Die anschließende Zugabe der wässrigen TCEP/Morpholin-Lösung (pH 8.5) bei 40°C löste die gewünschte Abspaltung des Auxiliars aus (Abbildung 2c). Die Reinigung durch HPLC nach 10 h lieferte natives DCD-1L (**26**) in hoher Reinheit und mit einer Ausbeute von 66% (über zwei Stufen; Abbildung 2d).

Für die chemische Synthese von Opistoporin-2 (OP2)^[14] nahmen wir uns einer anspruchsvolleren Ligationsstelle an (Abbildung 3). Das antimikrobielle, α -helicale porenbildende

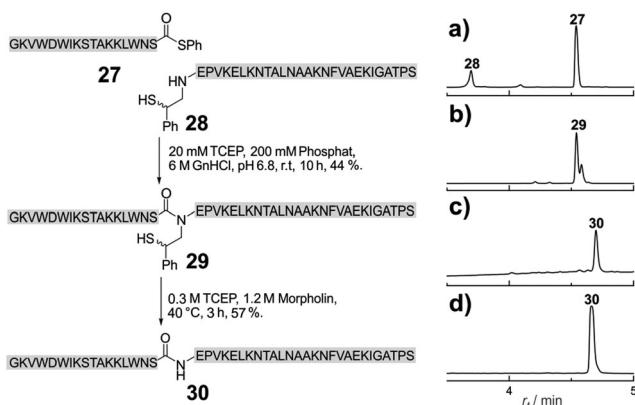


Abbildung 3. Synthese von OP2. UPLC-Analyse ($\lambda = 210$ nm) a) vor der Ligation, b) des gereinigten Ligationsprodukts (**29**), c) des Rohprodukts nach Abspaltung des Auxiliars und d) von gereinigtem **30**.

Peptid verfügt über keinen geeigneten positionierten Glycinrest. Wir wählten daher die Ser¹⁷-Glu¹⁸-Schnittstelle. Der reaktive Arylthioester **27** des N-terminalen OP2-Fragments (1–17) wurde wie für **23** beschrieben erhalten. Eine kleine Menge an racemisiertem Peptidthioester (3%) wurde bei der HPLC-Reinigung entfernt (Abbildung S35). Zur Synthese des C-terminalen OP2-Segments (18–44) wurde ein Pseudoprolindipeptid (Asn²⁵-Thr²⁶) verwendet. Das Auxiliar wurde, wie zuvor, durch reduktive Aminierung eingeführt (Abbildung S34). Die Ligation gelang in 6 M GnHCl bei pH 6.8 und Raumtemperatur. Nach nur 10 h wurde das Ligationsprodukt **29** durch HPLC-Reinigung erhalten (44%; Abbildung 3b, Doppelpeak wegen der Auf trennung der Diastereomeren Auxiliarformen). Die anschließende Behandlung mit einer wässrigen Lösung von TCEP (0.3 M) und Morphin (1.2 M) bei pH 8.5 verlief ohne Bildung von Nebenprodukten und ergab bei 40°C innerhalb von 3 h natives **30** in 57% Ausbeute (Abbildung 3c). Wir führten die Peptidligation und die anschließende Auxiliarabspaltung sowohl im kleinen wie im präparativen Maßstab und auch im Eintopfformat durch und erhielten ähnliche Ausbeuten (Abbildungen S37, S39, S40).

Die bislang eingesetzten N-Auxiliare waren für die Abspaltung durch Acidolyse oder Photolyse konzipiert. Allerdings führen die α -Verzweigung am sekundären Amin (**9**, Schema 1c) und/oder die Arylsubstituenten (**10**, Schema 1c) eine sterische Hinderung ein, die den Anwendungsbereich und die Ausbeuten der auxiliarvermittelten NCL einschränken. Die Idee eines radikalischen Abspaltungsmechanismus ermöglichte uns, eine neue Auxiliarklasse zu entwerfen, durch die α -Verzweigungen am sekundären Amin vermieden werden können. Das 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliar kann einfach und in hohen Ausbeuten durch reduktive Aminierung am Harz gebundenen Peptid eingeführt werden. Mit nur einer einzigen Verbindung können so vielfältige Ligationschnittstellen erschlossen werden.

Der wohl wichtigste Aspekt und größte Unterschied zu bisher beschriebenen Auxiliaren ist, dass das 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliar nicht auf Gly-haltige Ligationschnittstellen beschränkt ist. Dies eröffnet der NCL-Chemie neue Möglichkeiten. Um intermediaire Reinigungsschritte zu vermeiden, entwickelten wir eine zuverlässige Eintopfvariante, bei der die gewünschten nativen Peptide erhalten werden, indem die Auxiliarabspaltung unmittelbar im Anschluss an die Peptidligation durchgeführt wird. Die Methode basiert auf einer (selektiven) Abspaltung des Auxiliars unter mild basischen Bedingungen (pH 8.5), was für den Zugang zu Proteinen mit säureempfindlichen Modifizierungen interessant sein sollte. Wir beschrieben des Weiteren die chemische Totalsynthese von zwei antimikrobiellen Peptiden, DCD-1L und Opistoporin-2. Selbst wenn Ligationen an Schnittstellen, die β -verzweigte Aminosäuren enthalten, immer noch schwierig zu sein scheinen (Abbildung S43), erwarten wir, dass sich Anwendungsbreite und Effizienz des 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliars als nützlich erweisen werden, die Möglichkeiten der NCL auszuweiten. Da die Methode auf der radikalischen Entschwefelung basiert, müssen Cysteinreste geschützt werden (siehe Abbildungen S44 und S45). Im Vergleich zu der momentan am häufigsten eingesetzten Ligations-Entschwefelungs-Strategie ist es mit Sicherheit von Vorteil, dass bei dem von uns hier vorgestellten Verfahren keine nichtkommerziellen Aminosäurebausteine nötig sind. Aus diesem Grund und wegen der größeren Anwendungsbreite erwarten wir, dass dieses neue Auxiliarkonzept künftige Proteinsynthesen befähigen wird.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt (Se819-15/1, SPP 1623). Wir danken Luxembourg Bio Technologies Ltd. für die Bereitstellung von OxymaPure.

Stichwörter: Entschwefelung · N $^{\alpha}$ -Auxiliare · Peptidligationen · Proteinsynthesen · Radikalreaktionen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15055–15059
Angew. Chem. **2015**, *127*, 15269–15273

[1] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.

[2] L. E. Canne, S. J. Bark, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5891–5896.

[3] a) T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 6059–6061; b) C. Marinzi, J. Offer, R. Longhi, P. E. Dawson, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 2749–2757; c) C. Chatterjee, R. K. McGinty, J.-P. Pellois, T. W. Muir, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2814–2818; *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2872–2876; d) C. Nadler, A. Nadler, C. Hansen, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 3095–3102; e) C. Bello, S. Wang, K. W. Moremen, C. F. W. Becker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 7711–7715; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 7823–7828.

[4] a) J. Offer, P. E. Dawson, *Org. Lett.* **2000**, 2, 23–26; b) P. Botti, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 1831–1833; c) T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto, *Org. Lett.* **2001**, 3, 1403–1405; d) D. W. Low, M. G. Hill, M. R. Carrasco, S. B. Kent, P. Botti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 6554–6559; e) C. Marinzi, S. J. Bark, J. Offer, P. E. Dawson, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2323–2328; f) J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4642–4646; g) D. Macmillan, D. W. Anderson, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4659–4662; h) S. Tchertchian, O. Hartley, P. Botti, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 9208–9214; i) B. Wu, J. Chen, J. D. Warren, G. Chen, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4116–4125; *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4222–4231.

[5] a) L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 526–533; b) D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10064–10065; c) C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6807–6810; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6912–6915; d) K. S. Ajish Kumar, M. Haj-Yahya, D. Olszewski, H. A. Lashuel, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8090–8094; *Angew. Chem.* **2009**, 121, 8234–8238; e) R. Yang, K. K. Pansuooiti, F. Li, X.-W. Liu, C.-F. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13592–13593; f) J. Chen, P. Wang, J. Zhu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2010**, 66, 2277–2283; g) Z. Harpaz, P. Siman, K. S. A. Kumar, A. Brik, *ChemBioChem* **2010**, 11, 1232–1235; h) S. Shang, Z. Tan, S. Dong, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10784–10786; i) P. Siman, S. V. Karthikeyan, A. Brik, *Org. Lett.* **2012**, 14, 1520–1523; j) L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *ChemBioChem* **2013**, 14, 559–563; k) R. E. Thompson, B. Chan, L. Radom, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 9723–9727; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 9905–9909; l) K. M. Cergol, R. E. Thompson, L. R. Malins, P. Turner, R. J. Payne, *Org. Lett.* **2014**, 16, 290–293; m) L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 260–266; n) L. R. Malins, R. J. Payne, *Aust. J. Chem.* **2015**, 68, 521–537.

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

[7] J. Hioe, D. Sakic, V. Vrcek, H. Zipse, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 157–169.

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

[9] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640–6646.

[10] H. Rohde, J. Schmalisch, Z. Harpaz, F. Diezmann, O. Seitz, *ChemBioChem* **2011**, 12, 1396–1400.

[11] B. Schittek, R. Hipfel, B. Sauer, J. Bauer, H. Kalbacher, S. Stevanovic, M. Schirle, K. Schroeder, N. Blin, F. Meier, G. Rassner, C. Garbe, *Nat. Immunol.* **2001**, 2, 1133–1137.

[12] 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. Beyer, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 3551–3554.

[13] a) T. Haack, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 1589–1592; b) T. Wöhr, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3847–3848.

[14] L. Moerman, S. Bosteels, W. Noppe, J. Willems, E. Clynen, L. Schoofs, K. Thevissen, J. Tytgat, J. Van Eldere, J. van der Walt, F. Verdonck, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 4799–4810.

Eingegangen am 9. Juni 2015,
veränderte Fassung am 17. September 2015
Online veröffentlicht am 6. November 2015