多肽酰肼连接法合成环四肽

唐珊 郑基深 杨可 刘磊*

(生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室 清华大学化学系 北京 100084)

摘要 环四肽在药物研发中具有重要的潜在应用价值, 然而目前尚缺乏高效率合成环四肽的方法. 我们发展了以 N 端为半胱氨酸的四肽酰肼为原料的分子内环化方法, 合成了全 L 型氨基酸组成的环四肽. 该方法通过形成 13 元环的内硫酯中间体, 再经过 S-to-N 酰基迁移形成酰胺键, 最后通过脱硫反应, 得到目标环四肽分子.

关键词 环四肽; 多肽酰肼; 连接反应; 酰基迁移

Synthesis of Cyclic Tetrapeptides via Ligation of Peptide Hydrazides

Tang, Shan Zheng, Jishen Yang, Ke Liu, Lei*

(Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology (Ministry of Education),
Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract Naturally occurring or man-made cyclic tetrapeptides have unique rigid skeletons and therefore, represent an interesting class of candidate bioactive molecules in drug discovery. However, efficient chemical synthesis of cyclic tetrapeptides often presents a difficult problem due to the large strain involved in this category of target compounds. To overcome this problem we describe in the present study the use of peptide hydrazides for the preparation of highly strained 12-membered all-L cyclic tetrapeptides. The new synthetic route starts with the easy Fmoc solid phase synthesis of a linear N-Cys-tetrapeptide hydrazide precursor. Upon quick activation by NaNO₂ at pH 3 and -10 °C for 20 min followed by treatment with a pH 7 buffer containing an external thiol (4-mercaptophenylacetic acid, 40 equiv.) at room temperature, the N-Cys-tetrapeptide hydrazide precursor is converted *in situ* to an N-Cys-tetrapeptide thioester. This thioester undergoes a fast intramolecular thioester exchange reaction to generate a 13-membered thiolactone intermediate. Then an S-to-N acyl shift is expected to take place to create an amide bond, which affords the desired cyclic tetrapeptide in a modest overall yield (ca. 40%). Finally, desulfurization of the cyclic peptide product can be carried out to produce the target cyclic tetrapeptide that does not contain any Cys residue. Through detailed ¹H, ¹³C, and TOSY NMR and HPLC analyses, it is found that the new method for tetrapeptide synthesis can be carried out at relatively high substrate concentrations (0.8–1.0 mmol/L) without causing the formation of much cyclic octapeptide byproduct. Our test also showed that the reaction can generate the desired cyclic tetrapeptide in an epimerization free manner. By using the new method we have successfully prepared several cyclic tetrapeptides including cyclo(Ala-Leu-Ala-Leu), cyclo(Ala-His-Gly-Trp), and cyclo(Ala-Val-Gly-Ile) in 18%–25% overall yields. We expect that our method of cyclic tetrapeptide synthesis may find applications in the development of cyclic peptide libraries for bioactivity screening.

Keywords cyclotetrapeptides; peptide hydrazides; ligation; acyl shift

1 引言

环四肽是一类重要的生物活性分子, 其独特的刚性环状结构在药物研发中有着潜在应用^[1]. 例如, 从 *Lactobacillus helveticus* 中分离得到的环(L-脯-L-酪-L-脯-L-异亮)四肽具有抑制酪氨酸酶的活性^[2]; 从 *Diheterospora chlamydosporia* 中分离出的环四肽 Chlamydocin 及从 *Helicoma ambiens* 中分离得到的 Trapoxin 能够抑制组蛋白去乙酰化酶的活性^[3–6].

使用化学方法合成环四肽是将该类分子用于药物研究的第一步. 然而, 由于环四肽的结构中含有高度限制的 12 元环, 使得通常具有平面结构的酰胺键被扭

曲^[5,7]. 结果导致环四肽具有较大的分子内张力, 造成其合成非常困难^[8,9]. 使用常规方法将线性四肽进行环合, 即使在高度稀释的条件下, 也将主要生成分子间寡聚物, 而不是分子内环化产物^[10,11]. 为克服这一困难, 前人发展出几种特别的方法来合成环四肽(图 1): (1)“假稀释(pseudo dilution)”策略. 通过将线性四肽负载在树脂上, 限制活化线性四肽的自由扩散, 从而减少了线性四肽分子间碰撞的机会, 达到了高度稀释的目的. Papini 等将含 RGD (Arg-Gly-Asp)序列的四肽通过天冬氨酸的侧链羧基连接到树脂上, 在固相下实现线性四肽首尾的环化, 而没有分子间寡聚环化副产物产生^[12](图 1a). 使用该方法合成首尾环化四肽时, 需要至少三维正交保护

* E-mail: lliu@mails.tsinghua.edu.cn

Received April 28, 2012; published May 24, 2012.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20932006 and 91013007).

项目受国家自然科学基金(Nos. 20932006, 91013007)资助.

策略, 四肽序列中必须包含天门冬氨酸, 谷氨酸等含侧链官能团的氨基酸. (2) 引入“分子内构象辅助因子(internal conformational elements)”策略. 线性四肽活化的 C 端与 N 端在构象上的拉近是成功合成首尾环化四肽的关键, 因此通过在四肽分子中引入构象辅助因子, 可以促进环四肽的合成. Jolliffe 等^[13]通过在线性四肽中引入转角诱导分子(turn inducer)脯脯氨酸, 成功合成了含丝氨酸或苏氨酸全 *L* 型高张力环四肽(图 1b). 利用该策略合成环四肽时, 由于脯脯氨酸后的氨基酸缩合效率差, 常需要先制备二肽单元用于线性肽的合成^[9], 此外该策略的实现需要四肽中含有丝氨酸/苏氨酸. Smythe 等^[8,14]用“环缩小”策略, 通过引入 HnB 辅助基团, 先缩合形成张力小的 16 元环中间体, 再通过 O-to-N 迁移实现环四肽(12 元环)的合成(图 1c), 并利用该方法合成了环四肽库. 但是, 该方法会使 C 端氨基酸消旋. (3) 利用“分子外构象辅助因子(external conformational elements)”促进环四肽的合成. Beck 等^[15]通过金属离子介导两分子二肽在碱性条件下缩合, 合成了 C_2 -对称的环四肽. Lin 等^[16]利用分子印迹的纳米腔作模板诱导线性四肽的环化, 提高了环四肽合成效率.

在我们近期关于蛋白质化学合成的研究中^[17], 发现使用含有 N 端半胱氨酸的多肽酰肼作为原料, 可以高效率地合成含 5~42 个氨基酸的环肽(图 2a)^[18]. 该方法的原理是 C 端酰肼在 NaNO_2 的活化条件下原位生成硫酯, 通过分子内硫酯交换生成大环内硫酯, 再经过自发的 S-to-N 酰基迁移得到环化产物. 在之前研究中, 我们没有考察这一方法是否能够用于合成更小的环四肽. 随后我们认识到, 不少课题组近期在环四肽合成方面仍然存在有较大技术困难^[9~16]. 因此我们使用酰肼法对环四肽的合成进行了尝试(图 2b). 实验结果表明, 使用酰肼法合成环四肽不仅可行, 而且操作非常简便、产率也较高, 因此有望成为一种高效率合成环四肽的通用方法.

2 结果与讨论

2.1 四肽酰肼环化反应的发现

以环(丙-酪-精-苯丙)^[14]为模型化合物, 我们首先合成四肽酰肼 H-Cys-Tyr-Arg-Phe-NHNH₂ (**1a**), 再利用已优化出的条件进行环化测试^[18](图 3). 实验表明, 浓度为 1.0 mmol/L 的未经纯化的四肽酰肼 **1a** (ESI found

图 1 前人合成环四肽的策略.

Figure 1 Strategies developed for synthesis of cyclic tetrapeptides

(a) Solid-phase synthesis of cyclic tetrapeptide beginning from aspartic acid which is attached to the solid support by its side chain. (b) Synthesis of C_2 -symmetric, all-*L* cyclic tetrapeptides by two turn-inducer pseudoprolines. (c) Use of HnB (a photolabile auxiliary) in a ring-contraction strategy to make highly strained cyclic tetrapeptides

(a) Peptide hydrazides for cyclic peptide/protein synthesis (previous work)

(b) Peptide hydrazides for cyclic-tetrapeptide synthesis (this work)

图2 多肽酰肼合成环四肽

Figure 2 Synthesis of cyclic tetrapeptides through ligation of tetrapeptide hydrazides

图3 模型四肽酰肼环化测试

Figure 3 Cyclization of model tetrapeptide hydrazide H-Cys-Tyr-Arg-Phe-NHNH₂

(1) Reactant **1a** used for cyclization. (2) Cyclization for 2 h under optimized conditions. (3) Desulfurization of **2a** for 5 h. Note: *: internal standard; **: MPAA; *** derived from VA-044

602.4, calcd for [M+H] 602.3), 在 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 3.0 磷酸缓冲盐中, 用 NaNO_2 氧化 20 min, 加入 40 equiv. MPAA, 调节 pH 至 7.0, 室温反应 2 h, 得到单环化产物 **2a** (ESI found 570.3, calcd for [M+H] 570.3). 色谱产率为 86%, 分离产率为 45%; 分离纯化得到 **2a**, 使用 VA-044 脱硫反应 5 h, 定量得到 **2a'** (ESI found 538.4, calcd for [M+H]: 538.3). 两步总分离产率为 28%.

2.1.1 四肽酰肼浓度与单环化效率的关系

环四肽的产率依赖于线性四肽的浓度. 我们测试了不同浓度下 **1a** 环化成 **2a** 的产率(图 4), 发现当 **1a** 的浓度小于或等于 1.0 mmol/L 时, 得到单环化的产率大于 86%. 而在浓度为 0.5 mmol/L 时, 反应产率达到 94%. 反应浓度继续降低时, 产率没有提高. 而当 **1a** 的浓度大于 3.0 mmol/L 时, 主要生成二聚的副产物环八肽 cyclo(Cys-Tyr-Arg-Phe-Cys-Tyr-Arg-Phe) (**2c**, ESI found 1140.3, calcd 1139.5), 此时环四肽产率仅为 42%. 基于这些结果, 下文所有的环化均在 $0.8\sim 1.0\text{ mmol/L}$ 下进行.

图4 四肽酰肼 1a 的浓度与环化效率的关系

Figure 4 Concentration dependence for cyclization of **1a**

2.1.2 四肽酰肼环化条件优化

随后, 我们对 **1a** (1.0 mmol/L) 的环化条件进行了优化. 不同的硫醇添加剂 MPAA(对巯基苯甲酸), MesNa(巯乙磺酸钠), PhSH(苯硫酚)均能有效地催化反应的进行, 并给出相似的反应产率. 在第二步反应中, 在 MPAA 催化下 pH 为 7.0 最有利于环化产物的生成. 当 pH 偏酸性(6.0)或者偏碱性(8.0)时, 环四肽产率均有所下降, 反应体系中水解副产物增多(表 1).

表 1 四肽酰肼环化条件优化

Table 1 Optimization of the reaction conditions for cyclization of tetrapeptide hydrazide^a

序号	环化条件	色谱产率/%	
1	MPAA	86.3	
2	硫醇添加剂	MesNa	88.5
3		PhSH	91.2
4		6.0	54.4
5	pH ^b	8.0	76.1
6		9.0	63.5

^a Peptide **1a** (1.0 mmol/L) was dissolved into the aqueous phosphate buffer (0.2 mol/L) containing 6.0 mol/L guanidinium chloride and the pH was adjusted to 7.0 in the second step; ^b pH value of the second step.

为验证上述环化反应是否导致 C 端氨基酸消旋, 我们以 H-Cys-Tyr-Arg-Phe(_D)-NHNH₂ (**1b**)为原料, 合成 cyclo(Cys-Tyr-Arg-Phe(_D)) (**2b**, ESI found 570.5, calcd for [M+H] 570.3). 发现以 **1a** 为原料时, 消旋产物 <1%(图 5). 当 **2a** 和 **2b** 在 60 °C 下共进样时, 环化产物保留时间缩短, 且 **2a** 的峰形比常温下尖锐, 与文献[14]报道一致, 从而再次确认环四肽 C 端氨基酸没有消旋.

图 5 四肽酰肼 **1a** 消旋测试.Figure 5 Epimerization test of **1a**

(1) Purified **2a**; (2) Purified **2b**; (3) Co-injection of **2a** and **2b**; (4) Co-injection of **2a** and **2b** at 60 °C. Note: *: MPAA

2.2 环四肽产物的鉴定

为进一步证明 **2a** 是环状内酰胺产物(而非大环内硫酯), 我们将纯化的 **2a** 溶液用 4 mol/L NaOH 调至 pH 14.0, 反应 0.5 h 后调节 pH 至中性, 从色谱保留时间不变(图 6)及 ESI-MS 数据(加入 NaOH 后, ESI found 570.4)证明 **2a** 不能水解. 这表明 **2a** 并非大环内硫酯.

图 6 pH=14.0 时 **2a** 的 NaOH 解实验Figure 6 Treatment of **2a** with NaOH at pH=14.0

(1) Purified **2a**. (2) Purified **2a** in pH 14.0 solution for 30 min

我们纯化得到产物 **2a'**, 将其溶于 DMSO-*d*₆ 中, 并测得相应的 ¹H-谱和 TOCSY 二维谱(图 7). 谱图结果与文献报道一致[14]. 同时, 以八肽酰肼为原料合成 **2c**, 得到环八肽 **2c'** cyclo(Ala-Tyr-Arg-Phe-Ala-Tyr-Arg-Phe)的 ¹H-谱和 TOCSY 二维谱(图 7). 从图中我们可以发现, **2a'** 比 **2c'** 的峰要宽(尤其是高场部分), 这可能是由于环四肽构象缓慢转换导致. 两个分子对应的非 N—H 键 ¹H 化学位移基本一致.

2.3 四肽底物扩展研究

我们选择不同 C 端氨基酸的四肽酰肼来测试该方法合成环四肽的适用性(表 2). 其中, 环四肽 **2d'** [cyclo(Ala-Leu-Ala-Leu)] 是一种海洋微生物代谢产物[19], 以 H-Cys-Leu-Ala-Leu-NHNH₂ 为原料, 经过环化和脱硫反应, 得到 24% 的分离总产率. 环四肽 **2e'** 与 **2f'** 曾在 Smythe 等[8]的研究中被尝试合成. 使用本文的方法, **2e'** 的分离产率为 25%, 比 Smythe 等方法的产率(7%)显著提高. 而对于化合物 **2f'**, Smythe 等使用环缩小策略没有得到目标产物, 而我们得到 18% 的目标产物. 这些比较表明, 本文的合成方法在效率上比之前一些方法有较大提高. 此外, 对于 C 端为 Gly 的 **2g**, 我们也能分离得到 25% 的环化脱硫产物.

值得一提的是, 在合成环肽 **2g'** 时, 我们用羧基被 ¹³C 标记的甘氨酸, 纯化出环化产物 **2g**. ¹³C NMR 数据(图 8)显示, 在 δ 175.2 有信号, 而在 δ 200 处没有信号. 这进一步证明 **2g** 经环化处理后生成了酰胺键, 而非内硫酯键[20].

最后需要强调指出, 除甘氨酸外, 大多数氨基酸均能够在 β 位或者 γ 位进行硫化, 例如 Leu, Val, Phe, Lys, Pro, Glu 等氨基酸[21]都已经成功实现 β 或 γ 位硫化. 因此, 通过环化再脱硫的策略, 可以使用本文的酰肼法合成各种环四肽, 而并不局限于含有半胱氨酸的环四肽.

3 结论

环四肽是重要的一类生物活性分子, 然而目前尚缺乏高效率合成环四肽的方法. 我们发展了以 N 端为半胱

图7 2a'与2c'的¹H及TOCSY谱Figure 7 ¹H and TOCSY spectra of 2a' and 2c'

NMR spectra were recorded in DMSO-*d*₆ at 298 K on a Bruker Avance III 400 spectrometer

表2 四肽底物扩展环化研究

Table 2 Scope of the method for cyclic tetrapeptide synthesis

四肽序列	环化产物	脱硫产物	环四肽			脱硫环四肽	
			色谱产率/%	分离产率 ^a %	分子量 ^b	总分离产率 ^c %	分子量 ^b
H-Cys-Leu-Ala-Leu-NHNH ₂	2d	2d'	86	40	401.3	24	369.2
H-Cys-His-Gly-Trp-NHNH ₂	2e	2e'	79	38	484.1	25	452.1
H-Cys-Val-Gly-Ile-NHNH ₂	2f	2f'	76	30	373.2	18	341.3
H-Cys-His-Trp-Gly-NHNH ₂ ^d	2g	2g'	78	40	485.3	25	453.3

^a The isolated yield was calculated upon purified cyclic product after lyophilization and the crude peptide used for cyclization. ^b Molecular weight was obtained by ESI-MS and in agreement with the calculated mass. ^c The isolated yield was calculated based on the weight of each peptide purified after desulfurization and the crude peptide used for cyclization. ^d The carboxyl carbon of Gly is ¹³C labeled.

图8 ¹³C 标记的环(Cys-His-Trp-Gly)的¹³C核磁谱图Figure 8 ¹³C NMR spectra of ¹³C-labeled cyclo(Cys-His-Trp-Gly)

NMR spectra were recorded in DMSO-*d*₆ at 298 K on a Bruker Avance III 400 spectrometer

氨酸的四肽酰肼为原料的分子内环化方法, 合成了全 *L* 型氨基酸组成的环四肽. 该方法不会导致 C 端氨基酸消旋, 环化可以在 0.8~1.0 mmol/L 浓度下反应, 环化产率较高. 使用该方法我们合成了天然环四肽分子 cyclo(Ala-Leu-Ala-Leu) 及衍生物 cyclo(Ala-His-Gly-Trp) 和 cyclo(Ala-Val-Gly-Ile). 结果表明新方法具有几方面的优点: (1)原料容易制备; (2)合成操作简单; (3)单环化产率高. 本方法有潜力为发现新型环四肽生物活性分子提供工具.

4 实验部分

4.1 四肽酰肼的合成

称取 200 mg 2-Cl-Trt(Cl)树脂(取代度为 0.5 mol/g)于固相多肽合成管中, 使用 2 mL DMF (*N,N*-二甲基甲酰胺)溶胀 15 min 后, 加入含 5% NH₂NH₂·H₂O 的 DMF (4 mL), 室温反应 30 min. 抽干, 再加入含 5% NH₂NH₂·H₂O 的 DMF (2 mL), 反应 30 min 后抽干, 用 DMF, DCM (CH₂Cl₂), DMF 各洗涤 5 次, 抽干. 然后按照标准 Fmoc 固相合成多肽方法合成相应的线性四肽酰肼. 将活化的氨基酸溶液(4 equiv. 氨基酸, 3.6 equiv. HCTU (6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯), 8 equiv. DIEA (*N,N*-二异丙基乙胺), 活化时间不超过 5 min)加入多肽合成管中, 反应 1 h. 用 DMF, DCM, DMF 各洗涤 5 次, 加入 20% 哌啶 DMF 溶液反应 15 min (5 min, 10 min 各一次), 脱除 Fmoc. 肽链固相组装完成后, 加入 5 mL 切割试剂[95% TFA, 2.5% H₂O, 2.5% TIPS (三异丙基硅烷)]于多肽合成管中, 反应 2 h, 将多肽从树脂

上切下来,并脱掉侧链保护基.将切割试剂收集到 50 mL 离心管中,并用 2 mL TFA 洗涤树脂,将溶液收集在一起,用 N_2 鼓吹浓缩溶液(由于四肽分子量小,不易沉淀析出,此处溶液最好浓缩到 0.5 mL 以下),然后用冰冻的干燥乙醚沉淀,离心,得到粗肽.产物用 ESI-MS 鉴定.

4.2 四肽酰肼的环化

由于线性四肽酰肼的纯度都较高,不必进行中间体纯化.将粗肽用 CH_3CN/H_2O (1:1, V/V) 溶解后,用冷冻干燥机冻干,直接用于环化实验.

4.2.1 四肽酰肼环化实验的基本操作

根据各线性四肽酰肼的分子量,用 pH 3.0 的盐酸胍磷酸盐缓冲液(6.0 mol/L $Gn \cdot HCl$, 0.2 mol/L NaH_2PO_4)配制 2.0 mmol/L 的溶液(比如 1 mL).将溶液置于 $-10\text{ }^\circ\text{C}$,加入 10 equiv. $NaNO_2$ (0.2 mol/L 水溶液, 100 μL),氧化 20 min 后,加入 40 equiv. MPAA (13.4 mg 溶于 0.9 mL 磷酸盐缓冲液中),使反应终体积为 2 mL.将 pH 调为 7.0,室温反应 2 h.用 HPLC 监测环化反应进度.

4.2.2 四肽酰肼 1a 浓度与环化效率实验

为了得到 1a 浓度与产率间的关系,我们用 HPLC 纯化出 10 mg 1a 用于实验.称取 2.4 mg 1a 溶于 0.5 mL pH 3.0 的盐酸胍磷酸盐缓冲液,得到溶液 1 (8.0 mmol/L).取出 0.25 mL 溶液 1,加入 0.25 mL pH 3.0 缓冲液,得到溶液 2 (4.0 mmol/L).用同样操作得到溶液 3 (2.0 mmol/L), 4 (1.0 mmol/L).同理,称取 1.8 mg 1a,按照相同方法配出溶液 5 (6.0 mmol/L), 6 (3.0 mmol/L), 7 (1.5 mmol/L), 8 (0.75 mmol/L).再分别将这些溶液进行环化实验.

4.2.3 四肽酰肼 1a 环化条件优化实验

配制 2.0 mmol/L 1a 溶液 6 mL,平均分配到 6 个相同的反应容器(4 mL 的 EP 管)中,编号为 1', 2', 3', 4', 5', 6'.将反应容器置于 $-10\text{ }^\circ\text{C}$,加入 10 equiv. $NaNO_2$ (0.2 mol/L 水溶液, 100 μL),氧化 20 min 后,在管 1', 4', 5', 6' 中加入 40 equiv. MPAA (13.4 mg 溶于 0.9 mL 磷酸盐缓冲液), 2', 3' 分别加入 40 equiv. MesNa (13.1 mg 溶于 0.9 mL 磷酸盐缓冲液), PhSH (8 μL 溶于 0.9 mL 磷酸盐缓冲液). 1', 2', 3' 调 pH 至 7.0, 4', 5', 6' 调 pH 分别为 6.0, 8.0, 9.0. 室温反应 2 h, 用 HPLC 监测环化反应进度.

References

- [1] (a) Horton, D. A.; Bourne, G. T.; Smythe, M. L. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 893; (b) Rajiv, D.; Hemendra, G. *Chin. J. Chem.* **2011**, *29*, 1911; (c) Li, X.; Huang, D.; Sun, L.; Xiu, Z.; Norikazu, N. *Chin. J. Org. Chem.* **2011**, *31*, 312 (in Chinese) (李晓晖, 黄大卫, 孙蕾, 修志龙, 西野宪和, 有机化学, **2011**, *31*, 312.)
- [2] Kawagishi, H.; Somoto, A.; Kuranari, J.; Kimura, A.; Chiba, S. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3439.
- [3] Stahelin, H.; Trippmacher, A. *Eur. J. Cancer* **1974**, *10*, 801.
- [4] De Schepper, S.; Bruwiere, H.; Verhulst, T.; Steller, U.; Andries, L.; Wouters, W.; Janicot, M.; Arts, J.; Van Heusden, J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *304*, 881.
- [5] Kawai, M.; Jasensky, R. D.; Rich, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4456.
- [6] Kijima, M.; Yoshida, M.; Sugita, K.; Horinouchi, S.; Beppu, T. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22429.
- [7] Kawai, M.; Pottorf, R. S.; Rich, D. H. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2409.
- [8] Horton, D. A.; Bourne, G. T.; Coughlan, J.; Kaiser, S. M.; Jacobs, C. M.; Jones, A.; Ruhmann, A.; Turner, J. Y.; Smythe, M. L. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1386.
- [9] White, C. J.; Yudin, A. K. *Nature Chem.* **2011**, *3*, 509.
- [10] Schmidt, U.; Langner, J. *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 67.
- [11] Pastuszak, J.; Gardner, J. H.; Singh, J.; Rich, D. H. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2982.
- [12] Alcaro, M. C.; Sabatino, G.; Uziel, J.; Chelli, M.; Ginanneschi, M.; Rovero, P.; Papini, A. M. *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 218.
- [13] Fairweather, K. A.; Sayyadi, N.; Luch, I. J.; Clegg, J. K.; Jolliffe, K. A. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3136.
- [14] Meutermaans, W. D. F.; Bourne, G. T.; Golding, S. W.; Horton, D. A.; Campitelli, M. R.; Craik, D.; Scanlon, M.; Smythe, M. L. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2711.
- [15] Haas, K.; Ponikwar, W.; Noth, H.; Beck, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1086.
- [16] (a) Tai, D. F.; Lin, Y. F. *Chem. Commun.* **2008**, *44*, 5598. (b) Lin, Y. F.; Lee, S.-M.; Chen, C.-T.; Lu, K.-H.; Tai, D.-F. *J. Chin. Chem. Soc.* **2009**, *56*, 127.
- [17] (a) Zheng, J.-S.; Chang, H.-N.; Wang, F.-L.; Liu, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11080; (b) Fang, G.-M.; Li, Y.-M.; Shen, F.; Huang, Y.-C.; Li, J.-B.; Lin, Y.; Cui, H.-K.; Liu, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7645; (c) Shen, F.; Tang, S.; Liu, L. *Sci. China Chem.* **2011**, *54*, 110; (d) Zheng, J.-S.; Chang, H.-N.; Shi, J.; Liu, L. *Sci. China Chem.* **2012**, *55*, 64; (e) Fang, G.-M.; Cui, H.-K.; Zheng, J.-S.; Liu, L. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1061; (f) Zheng, J.-S.; Cui, K.-C.; Fang, G.-M.; Xi, W.-X.; Liu, L. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 511.
- [18] Zheng, J.-S.; Tang, S.; Guo, Y.; Chang, H.-N.; Liu, L. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 542.
- [19] Yin, W. Q.; Zou, J. M.; She, Z. G.; Vrijmoed, L. L. P.; Jones, E. B. G.; Lin, Y. C. *Chin. Chem. Lett.* **2005**, *16*, 219.
- [20] Zheng, J.-S.; Xi, W.-X.; Wang, F.-L.; Li, J.; Guo, Q.-X. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2655.
- [21] (a) Crich, D.; Banerjee, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10064; (b) Haase, C.; Rohde, H.; Seitz, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6807; (c) Chen, J.; Wan, Q.; Yuan, Y.; Zhu, J.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8521; (d) Yang, R. L.; Pasunooti, K. K.; Li, F. P.; Liu, X. W.; Liu, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13592; (e) Kumar, K. S. A.; Brik, A. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 524; (f) Harpaz, Z.; Siman, P.; Kumar, K. S. A.; Brik, A. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1232; (g) Rohde, H.; Seitz, O. *Biopolymers* **2010**, *94*, 551; (h) Shen, F.; Zhang, Z.-P.; Li, J.-B.; Lin, Y.; Liu, L. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 568; (i) Shang, S.; Tan, Z.; Dong, S.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10784; (j) Siman, P.; Karthikeyan, S. V.; Brik, A. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1520.

(Zhao, C.)