Totalsynthese von Thymosin β_4 , 3 [1, 2]

Klassische Synthese des Fragments [31–43] von Thymosin β_4

Total Synthesis of Thymosin β_4 , 3 [1, 2]

Conventional Synthesis of the Fragment [31–43] of Thymosin β_4

Peter Link und Wolfgang Voelter*

Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts
der Universität Tübingen, Hoppe-Seyler-Straße 4, D-72076 Tübingen

Z. Naturforsch. **48b**, 1000–1008 (1993); eingegangen am 17. März 1993

Thymosin β_4 , Fragment [31–43], Peptide, Solution Synthesis, Thymosins

As part of our total synthesis of thymosin β_4 an optimized synthesis of the C-terminal part of thymosin β_4 is described. Side chain functional residues of the tridecapeptide are masked by *tert*-butyl and the α -amino residues are protected by Z groups. The fully protected peptide derivative was obtained by WSCI/HOBt coupling of three fragments representing the segments [31–35], [36–37] and [38–43].

Einleitung

In den vorhergehenden Mitteilungen [1, 2] berichteten wir über die Synthese der kupplungsfähigen Fragmente [11–19] und [20–30] von Thymosin β_4 . Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Synthese eines weiteren für die klassische Totalsynthese von Thymosin β_4 [3, 4] benötigten Fragments. Wir beschreiben hier die Darstellung der Fragmente [31–35], [36–37] und [38–43] und deren optimaler Verknüpfung zum vollständig geschützten, C-terminalen Thymosin β_4 -Fragment Z-[31–43]-OtBu (**1a**) (siehe Abb. 1).

Ergebnisse und Diskussion

Fragment H-[38–43]-OtBu (1a**):** Zunächst werden zwei kupplungsfähige Dipeptidderivate hergestellt: Z-L-Ala-Gly-OH (**2**) wird durch Kupplung von Z-L-Ala-OSu mit dem Na-Salz von Glycin erhalten, H-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu (**1a**) gewinnt man durch katalytische Hydrierung des Z-geschützten Dipeptids (**1**), welches durch Kondensation von Z-L-Glu(OtBu)-OH und H-L-Ser(tBu)-OtBu nach der DCC/HOSu-Methode gewonnen wird. Die Verknüpfung zum vollständig geschützten Tetrapeptid Z-[40–43] (**3**) kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: Aufgrund besserer Ausbeuten nach der DCC/HOBt-Methode (91%)

im Vergleich zur Mischanhydrid-Methode mit Isobutylchloroformiat (84%) wird erstere bevorzugt. Nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzyl-oxycarbonylgruppe und anschließender Umsetzung mit Z-L-Gln-ONp erhält man Z-L-Gln-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu (**4**), dessen Reinigung, d. h. vollständiges Entfernen des *p*-Nitrophenols, zu erheblichen Ausbeuteverlusten führt (Ausbeute 65%). Eine erfolgreiche Entacylierung des Pentapeptidderivates (**4**) gelingt nur, wenn in methanolischer HCl in einem pH-Bereich von 4,5–5,5 hydriert wird. In reinem Methanol dauert die Hydrierung wesentlich länger (3 h im Vergleich zu 0,5 h), und es treten erhebliche Mengen (etwa 25%) des durch intramolekulare Zyklisierung entstandenen Pyroglutaminsäure-Nebenproduktes auf, dessen Abtrennung hier und in den folgenden Stufen nicht möglich ist. Die sofortige Umsetzung des Hydrochlorids mit Z-L-Lys(Boc)-OSu in Anwesenheit von TEA liefert in 78-proz. Ausbeute das Fragment Z-[38–43]-OtBu (**1**), aus dem nach katalytischer Hydrierung das kupplungsfähige H-L-Lys(Boc)-L-Gln-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu (**1a**) erhalten wird. Diese Hydrierung verläuft in DMF, Methanol und 60% Methanol aus unerklärlichen Gründen ausgesprochen schlecht; erst der Einsatz von Trifluorethanol führt zu einem chromatographisch reinen Produkt.

Fragment Z-[36–37]-OH (II**):** Zwei gleichwertige Syntheseverfahren führen zum C-terminal kupplungsfähigen Peptidderivat Z-L-Gln-L-Glu(OtBu)-OH (**II**). Z-L-Gln-

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Voelter.
Verlag der Zeitschrift für Naturforschung,
D-72072 Tübingen
0932-0776/93/0700-1000/\$ 01.00/0

[illegible]

Abb. 1. Syntheschema zur Darstellung des vollständig geschützten Fragments [31–43] von Thymosin β_4 .

ONp wird einmal in DMF/-Wasser mit dem Na-Salz von H-L-Glu(OtBu)-OH zur Reaktion gebracht (Ausbeute: 68%); außerdem gelingt die Umsetzung mit H-L-Glu(OtBu)-OH in absolutem DMF in Anwesenheit von NMM und katalytischen Mengen HOBt (Ausbeute 65%).

Fragment Z-[31-35]-OH (III): Das teilgeschützte Pentapeptid (III) wird sukzessive, beginnend mit dem α -carboxyfreien Glutaminsäurederi-

vat H-L-Glu(OtBu)-OH, unter Verwendung der Andersonmethode [5] aufgebaut. Die Acylierung der Aminosäure- und Peptidderivate erfolgt in organischem Medium durch die Hydroxysuccinimidester der entsprechenden Aminosäurenderivate. Auf den Zusatz eines Äquivalents Base wird – die Verknüpfung der beiden ersten Aminosäuren ausgenommen – verzichtet, wodurch eine durch tertiäre Basen hervorgerufene Racemisie-

rung ausgeschlossen ist. Das Dipeptid Z-L-Ile-Glu(OtBu)-OH (**5**) wird durch Umsetzung von Z-L-Ile-OSu und H-L-Glu(OtBu)-OH in DMF und NMM als Base in analytisch reiner Form erhalten. Nach Abspaltung der Z-Gruppe durch palladiumkatalysierte Hydrogenolyse wird H-L-Ile-L-Glu(OtBu)-OH (**5a**) mit Z-L-Thr(tBu)-OSu zur Reaktion gebracht. Das erhaltene Produkt (**6**) wird hydrogenolytisch entacyliert und mit Z-L-Glu(OtBu)-OSu zum Tetrapeptidderivat (**7**) verlängert. Große Löslichkeitsprobleme erschweren die nachfolgenden Synthesen.

Das Hydrierungsprodukt (**7a**), H-L-Glu(OtBu)L-Thr(tBu)-L-Ile-L-Glu(OtBu)-OH, ist in Methanol so schwerlöslich, daß es während der Hydrogenolyse ausfällt. Die Peptidkettenverlängerung in DMF mit Z-L-Lys(Boc)-OSu liefert in 81-proz. Ausbeute das Thymosin β_4 Fragment Z-[31-35]-OH (**III**), das in NMP, DMSO und DMF schwer löslich ist und für weitere Verknüpfungen nur in Trifluorethanol eingesetzt werden kann.

Fragment Z-[31-43]-OtBu (V): Zwei Synthesewege zur Darstellung des Fragments Z-[36-43]-OtBu (**IV**) werden verfolgt:

Syntheseweg 1: Die Fragmente H-[38-43]-OtBu (**Ia**) und Z-[36-37]-OH (**II**) werden nach der DCC/HOBT-Methode in DMF gekuppelt. Das entstandene Oktapeptidderivat (**IV**) und Dicyclohexylharnstoff gleichen sich so in ihren Löslichkeiten, daß eine akzeptable Trennung der Substanzen nicht möglich ist. Die Ausbeute des mit dem Harnstoffderivat verunreinigten Produkt beträgt 76%. Syntheseweg 2: H-[38-43]-OtBu (**Ia**) wird mit Fragment Z-[36-37]-OH (**II**) mit Erfolg nach der WSCI/HOBT-Methode [6] verknüpft. Die Wasserlöslichkeit des Harnstoffderivates führt dazu, daß dieser durch einfaches Auswaschen vom Oktapeptidderivat (**IV**) abgetrennt werden kann. Im Vergleich zur DCC/HOBT-Methode resultiert eine verbesserte Ausbeute – 84% im Vergleich zu 76% –, zusätzlich wird auch ein Produkt höherer Reinheit gewonnen. Die Palladium-katalysierte Hydrogenolyse von Z-[38-43]-OtBu in Trifluorethanol, die durch Zutropfen 0,25 N methanolischer HCl beschleunigt wird, liefert das Hydrochlorid HCl·H-[36-43]-OtBu (**IVa**), das nach bewährter WSCI/HOBT-Methode mit Fragment Z-[31-35]-OH (**III**) in hoher Ausbeute (90%) zum vollständig geschützten

Fragment von Thymosin β_4 [31-43] (**V**) umgesetzt wird.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte (unkorrigiert): Büchi-Apparatur. – Optische Rotationen: Perkin-Elmer Polari-meter 241; 25 °C. – Massenspektren: Varian-MAT 711. Elementaranalysen: Perkin-Elmer 240 B. Aminosäureanalysen: Hydrolysebedingungen, 6 N HCl, 24 h in evakuierten Ampullen. Gemäß Lit. [7] wurde der Aminosäuregehalt fluorimetrisch bestimmt; Biotronik-RF-535-Fluorimeter. – Dünnschichtchromatographie: Kieselgel-60-F₂₅₄-Glasplatten (Merck, Darmstadt); Laufmittel A: *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3/1/1), B: Chloroform/Methanol (3/1), C: Chloroform/Methanol (4/1), D: Chloroform/Methanol/Benzol/Wasser (8/8/8/1), E: Chloroform/Methanol (19/1), F: Chloroform/Methanol (6/1), G: Chloroform/Methanol (9/1), H: *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Essigester (3/1/1/1), I: Chloroform/Methanol/Essigsäure (18/3/0,3), J: Chloroform/Methanol/Essigsäure (17/3/0,5), K: Chloroform/Trifluorethanol/Essigsäure/Wasser (20/5/4/1), L: Chloroform/Trifluorethanol/Essigsäure/Wasser (32/7/6/1), M: Essigester/Hexan (3/1), N: Essigester/Hexan (4/1), O: Essigester/Hexan (5/1), P: Chloroform/Isopropanol/Essigsäure (40/8/1); die Detektion der Substanzen geschieht im UV-Licht bei 254 nm (UV/VIS-Gerät, Desaga), mit der Ninhydrin-[8]- und anschließend mit der Chlor/o-Tolidin-Methode [9] oder Chlor/TDM-Methode [10]. – Abkürzungen entsprechen denen unter Lit. [11] beschriebenen. Zusätzliche Abkürzungen: DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, DCH = Dicyclohexylharnstoff, DCHA = Dicyclohexylamin, DMF = Dimethylformamid, DMSO = Dimethylsulfoxid, EE = Essigester, TFE = Trifluorethanol, NMM = N-Methylmorpholin, NMP = N-Methylpyrrolidon, WSCI = N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid.

N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-O-tert-butyl-L-serin-tert-butylester

[Z-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu] (**1**): 10,3 g (30,8 mmol) Z-L-Glu(OtBu)-OH, 6,68 g (30,8 mmol) H-L-Ser(tBu)-OH und 3,54 g (30,8 mmol) N-Hydroxysuccinimid werden in 150 ml absolutem DMF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Hierzu tropft man unter Rühren 6,35 g (30,8 mmol) DCC, gelöst in wenig DMF, und rührt eine Stunde bei tiefer Temperatur, sowie weitere 20 Stunden bei Zimmertemperatur. Nun entfernt man den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff, destil-

liert das DMF schonend ab und nimmt den festen Rückstand in Essigester auf. Es wird mit 10-proz. Zitronensäure (2×), mit 10-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung (2×) und mit ges. Kochsalzlösung (4×) ausgeschüttelt, sodann über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel eingeeengt. Zur Entfernung des restlichen Dicyclohexylharnstoffs wird bei -20°C aufbewahrt, wobei der Harnstoff ausfällt und abfiltriert werden kann. Die abschließende Umkristallisation aus Isopropanol/Wasser liefert ein sehr sauberes Produkt; Ausb. 12,1 g (73% d. Th.), Schmp. 93°C – 95°C , $[\alpha]_D^{22} = -5,5^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_8$ (536,66)

Ber.	C 62,67	H 8,26	N 5,22%,
Gef.	C 62,44	H 8,30	N 5,06%.

L-Glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*O*-*tert*-butyl-*L*-serin-*tert*-butylester

[H–L–Glu(O*t*Bu)–L–Ser(*t*Bu)–O*t*Bu] (**1a**): 8,2 g (15,3 mmol) Z–L–Glu(O*t*Bu)–L–Ser(*t*Bu)–O*t*Bu (**1**) werden in 150 ml Isopropanol gelöst. Nach zehnmütigem Durchleiten von Stickstoff werden 850 mg Pd(10%)/Aktivkohle hinzugefügt und nochmals zehn Minuten Stickstoff eingeleitet. Anschließend erfolgt die Hydrierung unter Wasserstoffdurchströmung, wobei die Durchflußrate über einen Blasenähler kontrolliert wird (30 Blasen pro Minute). Die Hydrierung, die dünn-schichtchromatographisch (SiO_2 : Laufmittel D) verfolgt wird, ist nach 3 h beendet. Der Katalysator wird durch Filtration abgetrennt, das Filtrat eingeeengt und das verbleibende Öl in wenig Ether aufgenommen. Nach Zugabe von *n*-Hexan kristallisiert bei -5°C das Produkt aus; es ist in den Laufmittelsystemen A und D einheitlich; Ausb. 5,15 g (84% d. Th.), Schmp.: 85 – 87°C , $[\alpha]_D^{24} = +9,8^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6$ (402,53)

Ber.	C 59,68	H 9,51	N 6,96%,
Gef.	C 59,51	H 9,50	N 6,88%.

N-Benzyloxycarbonyl-*L*-alanyl-glycin

[Z–L–Ala–Gly–OH] (**2**): 4,13 g (55 mmol) Glycin und 4,62 (55 mmol) Natriumhydrogencarbonat werden in 100 ml Wasser gelöst und unter kräftigem Rühren tropfenweise mit 16,0 g (50 mmol) Z–L–Ala–OSu in 120 ml DMF versetzt. Nach zwölfstündigem Rühren bei 23°C wird mit 2 N HCl vorsichtig neutralisiert und dann das Lösungsmittel weitgehend abdestilliert. Den Destillationsrückstand verteilt man zwischen Essigester und 10-proz. Zitronensäure, trennt die organische Phase ab, wäscht ausgiebig mit ges. Kochsalzlö-

sung und trocknet über wasserfreiem Natriumsulfat. Aus Essigester/Petrolether (40–60) kristallisiert das chromatographisch reine Produkt (Laufmittel A und D) in kleinen, farblosen Nadeln; Ausb. 10,3 g (73% d. Th.), Schmp.: 129°C , $[\alpha]_D^{22} = -21,5^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$ (280,28)

Ber.	C 55,69	H 5,75	N 9,99%,
Gef.	C 55,71	H 5,72	N 9,99%.

N-Benzyloxycarbonyl-*L*-alanyl-glycyl-*L*-glutamyl(γ -*tert*-butylester)-*O*-*tert*-butyl-*L*-serin-*tert*-butylester

[[Z–L–Ala–Gly–L–Glu(O*t*Bu)–Ser(*t*Bu)–O*t*Bu] (**3**): – Methode 1: 14,0 g (50 mmol) Z–L–Ala–Gly–OH (**2**) und 20,2 (50 mmol) H–L–Glu(O*t*Bu)–L–Ser(*t*Bu)–O*t*Bu (**1a**) werden in 300 ml trockenem DMF gelöst. Zu dieser klaren Lösung gibt man 9,5 g (70 mmol) HOBt, kühlt auf -5°C ab und fügt 10,5 g (50 mmol) DCC hinzu. Nach 20 h Rühren bei R.T. stellt man den Reaktionsansatz in den Kühltank, um die Präzipitation des Dicyclohexylharnstoffs zu vervollständigen, filtriert diesen dann ab und entfernt das DMF im Hochvakuum. Man löst den Destillationsrückstand in Essigester und schüttelt sauer (10-proz. Zitronensäure), alkalisch (10-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung) und neutral (Wasser) aus. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel abdestilliert. Der verbleibende Kristallkuchen wird aus heißem Essigester oder Methanol/Ether umkristallisiert; Ausb. 30,2 g (91% d. Th.), Schmp. 165°C , $[\alpha]_D^{23} = -6,2^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_{10}$ (664,80)

Ber.	C 59,62	H 7,88	N 8,43%,
Gef.	C 59,61	H 7,97	N 8,46%.

Methode 2: Man legt 700 mg (2,5 mmol) Z–L–Ala–Gly–OH (**2**) in 20 ml absolutem THF vor und kühlt auf -20°C ab, fügt vorsichtig mit einer 500 μl Spritze über ein Septum 279 μl (2,5 mmol) *N*-Methylmorpholin hinzu, gefolgt von 326 μl (2,5 mmol) Isobutylchloroformiat und läßt fünf Minuten reagieren. Nun werden 1,06 g (2,5 mmol) H–L–Glu(O*t*Bu)–L–Ser(*t*Bu)–O*t*Bu (**1a**) in 10 ml trockenem THF so zugetropft, daß die Innentemperatur -10°C nicht übersteigt. Nach 3 h filtriert man vom ausgefallenen NMM·Hydrochlorid ab, entfernt das THF, nimmt den sirupösen Rückstand in Essigester auf und schüttelt wie oben beschrieben aus. Nach der ersten Kristallisation erkennt man im Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel D und E) noch die Spur eines Neben-

produktes, das durch Umkristallisieren aus heißem Essigester entfernt werden kann; Ausb. 1,3 g (79% d. Th.), Schmp. 161–163 °C, $[\alpha]_D^{23} = -6,1^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{35}H_{52}N_4O_{10}$ (664,80)

Ber. C 59,62 H 7,88 N 8,43%,

Gef. C 60,07 H 8,24 N 8,96%.

L-Alanyl-glycyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-O-tert-butyl-L-serin-tert-butylester

[H-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu] (**3a**): Durch eine Lösung von 3,5 g (5,2 mmol) Z-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu (**3**) in 25 ml 90-proz. Methanol (oder Isopropanol) wird zehn Minuten Stickstoff geleitet, 350 mg Pd(10%)/Aktivkohle zugegeben und nochmals Stickstoff durchgeleitet. Anschließend wird im Wasserstoffdurchflußverfahren 2 h hydriert, der Pd-Katalysator entfernt und das Filtrat bis zur Trockene eingedampft. Eventuell vorhandener Dicyclohexylharnstoff kann nach Auflösen des Destillationsrückstandes in wenig Ether bei –20 °C ausgefällt werden. Nach der Filtration gibt man bis zur beginnenden Trübung Petrolether zu und stellt in den Kühlschrank. So erhält man ein sehr sauberes (Laufmittel E), kristallines Produkt; Ausb. 2,4 g (87%) d. Th.), Schmp.: 107–109 °C, $[\alpha]_D^{21} = -6,9^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{25}H_{45}N_4O_8$ (529,65)

Ber. C 56,69 H 8,56 N 10,58%,

Gef. C 56,61 H 8,84 N 10,64%.

N-Benzylloxycarbonyl-L-glutaminy-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-O-tert-butyl-L-serin-tert-butylester

[Z-L-Gln-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu] (**4**): Zur auf 0 °C abgekühlten Lösung von 12,7 g (24 mmol) H-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu (**3a**) in 100 ml absolutem DMF, tropft man 9,6 g Z-L-Gln-ONp, gelöst in 50 ml DMF, und rührt 36 h bei R.T. Der grüngelbliche Reaktionsansatz wird nun in 300 ml eiskalte 10-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung eingerührt und das präzipitierte gelbliche Produkt auf einer Fritte gesammelt. Nacheinander wird mit Wasser, 10-proz. Zitronensäure, Wasser und Methanol/Ether (1/3) gewaschen und erneut aus DMF/Wasser umgefällt. Wiederholtes Waschen und abschließendes Trocknen über P_2O_5 im Hochvakuum liefern schließlich ein farbloses, amorphes Pulver, das in mehreren Laufmitteln (C, D und E) chromatographisch sauber erscheint;

Ausb. 12,3 g (65% d. Th.), Schmp. = 223 °C (Zers.), $[\alpha]_D^{22} = -3,5^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{38}H_{60}N_6O_{12}$ (792,92)

Ber. C 57,56 H 7,63 N 10,60%,

Gef. C 57,31 H 7,70 N 10,41%.

N α -Benzylloxycarbonyl-N ϵ -tert-butylloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminy-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-O-tert-butyl-L-serin-tert-butylester

[Z-L-Lys(Boc)-L-Gln-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu] (**I**): Unter gelindem Erwärmen werden 3,8 g (4,8 mmol) Z-L-Gln-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu (**4**) in 100 ml Methanol/DMF (4/1) gelöst und unter Stickstoff mit 400 mg Hydrierkatalysator (Pd(10%)/C) versetzt. Die Hydrierung erfolgt unter Wasserstoffdurchfluß, wobei durch Zutropfen von 0,5 N methanolischer Salzsäure der pH-Wert der Lösung auf 4,5–5,5 gehalten wird. Schon nach 30 Minuten ist die Reduktion beendet und der Katalysator wird vorsichtig abgetrennt, das Lösungsmittel teilweise abdestilliert und mit wenig Ether versetzt. Man erhält eine kristalline Substanz, die sehr hygroskopisch ist und am besten gleich weiter umgesetzt wird; Ausb. 2,8 g (84% d. Th.).

1,4 g (2,0 mmol) des erhaltenen Hydrochlorid-Derivates (**4a**) werden zusammen mit 955 mg (2,0 mmol) Z-L-Lys(Boc)-Osu in 10 ml absolutem DMF vorgelegt und bei 0 °C tropfenweise mit 200 μ l (2,0 mmol) Triethylamin in 2 ml DMF versetzt. Nach 22 h gießt man den gesamten Reaktionsansatz auf 60 ml eiskalte 10-proz. Natriumbicarbonatlösung, rührt eine Stunde und saugt den ausgefallenen Niederschlag ab. Dieser wird sorgfältig mit 10-proz. Zitronensäure, Wasser und etwas Ether digeriert und schließlich im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet. Das erhaltene amorphe Pulver ist chromatographisch (Laufmittel C, D und H) sauber; Ausb. 1,6 g (78% d. Th.), Schmp. 207–208 °C (Zers.), $[\alpha]_D^{24} = -8,9^\circ$ ($c = 0,98$, DMF). – Aminosäureanalyse: Ala 1,00 (1), Glu 2,15 (2), Gly 0,98 (1), Lys 0,95 (1), Ser 0,94 (1); Racemattest: 1,87% D-Glu, 1,42% D-Lys, 0,56% D-Ser.

$C_{49}H_{80}N_8O_{15}$ (1021,23)

Ber. C 57,63 H 7,90 N 10,97%,

Gef. C 57,77 H 7,73 N 10,61%.

N-Benzylloxycarbonyl-L-glutaminy-L-glutamyl(γ -tert-butylester)

[Z-L-Gln-L-Glu(OtBu)-OH] (**II**): – Methode 1: 4,7 g (23,0 mmol) H-L-Glu(OtBu)-OH

und 1,9 g (23,0 mmol) Natriumhydrogencarbonat werden in 100 ml DMF gelöst. Nach Abkühlen auf 0 °C tropft man 9,23 g (23,0 mmol) Z–L–Gln–ONp, gelöst in 80 ml DMF, hinzu, rührt eine Stunde in der Kälte und 14 h bei R.T. Nun wird mit 20-proz. Zitronensäure ein pH-Wert von 7 eingestellt, das DMF vorsichtig destillativ entfernt und der verbleibende Rückstand zwischen Essigester und 10-proz. Zitronensäure (kochsalzgesättigt) verteilt. Nach zweimaligem sauren Ausschütteln wird mehrmals, bis das Waschwasser neutral ist, mit Kochsalzlösung gewaschen und schließlich über Natriumsulfat getrocknet. Beim Einengen der organischen Phase fällt das Produkt aus; es ist aber noch nicht sauber (Grünfärbung durch *p*-Nitrophenol) und wird deshalb aus DMF/Wasser umgefällt. Zum Schluß wird aus Methanol/Ether kristallisiert, wobei ein farbloses Produkt erhalten wird, das kein *p*-Nitrophenol und kein Z–L–Gln–OH enthält; Ausb. 7,3 g (68% d. Th.), Schmp. 138–141 °C, $[\alpha]_D^{23} = -0,42^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

C₂₂H₃₁N₃O₈ (465,5)

Ber. C 56,76 H 6,71 N 9,03%,
Gef. C 56,49 H 6,72 N 8,64%.

Methode 2: Man suspendiert 2,2 g (11,0 mmol) H–L–Glu(O*t*Bu)–OH in 40 ml absolutem DMF, versetzt mit 1,2 ml (11,0 mmol) N-Methylmorpholin, sowie einer Spatelspitze 1-Hydroxybenzotriazol und kühlt ab. Hierzu tropft man langsam die Lösung von 4,0 g (10,0 mmol) Z–L–Gln–ONp in 20 ml absolutem DMF. Die nach einigen Stunden klar werdende Lösung wird insgesamt 24 h gerührt und nach schonendem Abdestillieren des Solvens wie beschrieben (siehe Methode 1) aufgearbeitet. Die abschließende Kristallisation aus Methanol/Ether ergibt das chromatographisch reine, farblose Dipeptid; Ausb. 3,0 g (65% d. Th.), Schmp. 140–142 °C, $[\alpha]_D^{23} = -0,44^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

C₂₂H₃₁N₃O₈ (465,5)

Ber. C 56,76 H 6,71 N 9,03%,
Gef. C 56,44 H 6,72 N 8,96%.

N-Benzyloxycarbonyl-*L*-isoleucyl-*L*-glutaminsäure(γ -*tert*-butylester)

[Z–L–Ile–L–Glu(O*t*Bu)–OH] (5): 1,06 g (5,2 mmol) H–L–Glu(O*t*Bu)–OH werden in 30 ml wasserfreiem DMF suspendiert, mit 548 μ l (4,9 mmol) N-Methylmorpholin versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 1,8 g (4,9 mmol) Z–L–Ile–OSu in 20 ml absolutem DMF wird 48 h bei 23 °C gerührt, wobei eine klare Lösung resultiert, die dann im Hochvakuum vollständig ein-

gedampft wird. Den festen Rückstand nimmt man in Essigester auf und schüttelt mit 10-proz. Zitronensäure, ges. Kochsalzlösung und Wasser aus. Die beim Einengen der über Natriumsulfat getrockneten organischen Phase einsetzende Kristallisation wird durch Zugabe von *n*-Hexan vervollständigt. Man erhält ein in den Fließmitteln C und D chromatographisch einheitliches Produkt; Ausb. 1,85 g (84% d. Th.), Schmp. 126,5 °C, $[\alpha]_D^{20} = -19,8^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

C₂₃H₃₄N₂O₇ (450,55)

Ber. C 61,32 H 7,60 N 6,21%,
Gef. C 61,43 H 7,74 N 6,21%.

L-Isoleucyl-*L*-glutaminsäure(γ -*tert*-butylester)

[H–L–Ile–L–Glu(O*t*Bu)–OH] (5a): 6,3 g (14,0 mmol) Z–L–Ile–L–Glu(O*t*Bu)–OH (5) werden in 70 ml 80-proz. Methanol gelöst, unter Stickstoff mit 700 mg Pd(10%)/Aktivkohle versetzt und wie üblich im Durchflußverfahren hydriert. Nach 3,5 h ist die Abspaltung vollständig und der Katalysator wird abgetrennt. Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels verbleibende viskose Öl wird in wenig Wasser aufgenommen, mit Isopropanol versetzt und über Nacht bei –2 °C aufbewahrt. Hierbei scheiden sich farblose, nadelartige Kristalle ab; Ausb. 4,15 g (94% d. Th.), Schmp. 173 °C, $[\alpha]_D^{20} = 9,2^\circ$ ($c = 0,6$, Essigsäure).

C₁₅H₂₈N₂O₅ (316,4)

Ber. C 56,94 H 8,91 N 8,85%,
Gef. C 56,25 H 9,26 N 8,25%.

N-Benzyloxycarbonyl-*O*-*tert*-butyl-*L*-threonyl-*L*-isoleucyl-*L*-glutaminsäure(γ -*tert*-butylester)

[Z–L–Thr(*t*Bu)–L–Ile–Glu(O*t*Bu)–OH] (6): Zur Suspension von 4,8 g (15,0 mmol) H–L–Ile–L–Glu(O*t*Bu)–OH (5a) in 120 ml DMF abs. gibt man bei –5 °C 6,3 g (15,5 mmol) Z–L–Thr(O*t*Bu)–OSu, gelöst in 30 ml DMF abs. Man rührt anschließend 18 h bei Zimmertemperatur und erhält dabei eine klare Lösung. Um den überschüssigen Aktivester zu vernichten, werden 10 Tropfen 2-Aminoethylpiperazin zugegeben und eine Stunde gerührt. Dann entfernt man das DMF destillativ, verteilt den Destillationsrückstand zwischen Essigester und 10-proz. Zitronensäure und verwirft die wäßrige Phase. Die Essigesterlösung wird noch mehrmals wie üblich gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und nach der Filtration soweit eingeeengt, bis die Kristallisation einsetzt. Die Kristalle werden abgesaugt und in heißem Ether gelöst. Beim Abkühlen scheidet sich ein hochreines kristallines Produkt ab, Ausb. 7,5 g

(82% d. Th.), Schmp. 131–132 °C, $[\alpha]_D^{20} = -12,6^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

$C_{31}H_{49}N_3O_9$ (607,74)

Ber. C 60,97 H 8,12 N 6,91%,

Gef. C 61,02 H 8,13 N 6,82%.

O-tert-Butyl-L-threonyl-L-isoleucyl-L-glutaminsäure(γ -tert-butylester)

[H–L–Thr(*t*Bu)–L–Ile–Glu(*O*tBu)–OH] (**6a**): 3,05 g (5,0 mmol) Z–L–Thr(*t*Bu)–L–Ile–L–Glu(*O*tBu)–OH (**6**) werden in 200 ml 80-proz. Methanol vorgelegt und unter Stickstoff mit 300 mg Pd-Katalysator versetzt. Nach dreistündigem Hydrieren im Durchflußverfahren wird vorsichtig der Katalysator entfernt und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt, und zwar soweit, bis die Präzipitation des Produktes einsetzt. Man stellt es über Nacht in den Kühlschrank, saugt dann die feinnadeligen Kristalle ab, wäscht mit Methanol/Wasser 1/3, Ether und trocknet im Hochvakuum über P_2O_5 . Chromatographisch (Fließmittel C und D) sind keine Fremdstoffe erkennbar, Ausb. 2,4 g (97% d. Th.), Schmp. 198 °C (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -15,2^\circ$ ($c = 1$, Essigsäure).

$C_{23}H_{43}N_3O_7 \cdot H_2O$ (491,62)

Ber. C 56,71 H 9,07 N 8,68%,

Gef. C 56,71 H 9,20 N 8,63%.

N-Benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-*O*-tert-butyl-L-threonyl-L-isoleucyl-L-glutaminsäure(γ -tert-butylester)

[Z–L–Glu(*O*tBu)–L–Thr(*t*Bu)–L–Ile–L–Glu(*O*tBu)–OH] (**7**): 7,1 g (15,0 mmol) H–L–Thr(*t*Bu)–L–Ile–L–Glu(*O*tBu)–OH (**6a**) werden in 120 ml absolutem DMF suspendiert. Nach Abkühlen auf 0 °C werden im Verlauf einer Stunde 6,5 g (15,0 mmol) Z–L–Glu(*O*tBu)–OSu, gelöst in 30 ml DMF, zugegeben. Die Reaktionsmischung rührt man 20 h bei R.T. und entfernt dann das DMF. Den erhaltenen Destillationsrückstand löst man in Dichlormethan auf und wäscht nacheinander mit 10-proz. Zitronensäure und ges. Kochsalzlösung. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Abdestillieren des Lösungsmittels nimmt man den Kristallkuchen in wenig Methanol auf, versetzt bis zur Eintrübung mit Ether und stellt zur Kristallisation in den Kühlschrank; Ausb. 8,9 g (75% d. Th.), Schmp. 191,8–192,5 °C, $[\alpha]_D^{24} = +13,8^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{40}H_{64}N_4O_{12} \cdot 0,5 H_2O$ (802,04)

Ber. C 59,91 H 8,17 N 6,99%,

Gef. C 59,92 H 8,17 N 6,99%.

L-Glutamyl(γ -tert-butylester)-*O*-tert-butyl-L-threonyl-L-isoleucyl-L-glutaminsäure(γ -tert-butylester)

[H–L–Glu(*O*tBu)–L–Thr(*t*Bu)–L–Ile–L–Glu(*O*tBu)–OH] (**7a**): 3,0 g (3,8 mmol) Z–L–Glu(*O*tBu)–L–Thr(*t*Bu)–L–Ile–L–Glu(*O*tBu)–OH (**7**) werden in 200 ml 90-proz. Methanol gelöst und nach Einleiten von Stickstoff mit 300 mg Pd(10%)/Aktivkohle versetzt. Unter Wasserstoffdurchfluß wird dann 3 h hydriert, wobei nach ungefähr einer Stunde das Produkt teilweise ausfällt. Um vom Katalysator abfiltrieren zu können, fügt man noch 200 ml Methanol hinzu, erwärmt auf 35 °C und filtriert dann ab. Beim Eindampfen des Filtrats auf ein Volumen von 100 ml beginnt das Produkt auszufallen. Man stellt über Nacht in den Kühlschrank und saugt dann den mikrokristallinen Niederschlag über eine Fritte ab. Dieser wird mit Wasser, Methanol/Wasser 1/1 und Ether auf der Fritte gewaschen und bei 0,1 Torr über P_2O_5 getrocknet; Ausb. 2,23 g (90% d. Th.), Schmp. 202–205 °C (Zers.).

$C_{32}H_{58}N_4O_{10} \cdot 0,5 H_2O$ (667,84)

Ber. C 57,55 H 8,90 N 8,39%,

Gef. C 57,30 H 8,80 N 8,10%.

N $^{\alpha}$ -Benzyloxycarbonyl-*N* $^{\epsilon}$ -tert-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-*O*-tert-butyl-L-seryl-L-isoleucyl-L-glutaminsäure(γ -tert-butylester)

[Z–L–Lys(Boc)–L–Glu(*O*tBu)–L–Thr(*t*Bu)–L–Ile–L–Glu(*O*tBu)–OH] (**III**): Zur auf 0 °C abgekühlten Suspension von 3,3 g (5,0 mmol) H–L–Glu(*O*tBu)–L–Thr(*t*Bu)–L–Ile–L–Glu(*O*tBu)–OH (**7a**) in 100 ml absolutem DMF gibt man 2,4 g (5,0 mmol) Z–L–Lys(Boc)–OSu und rührt kräftig. Nach einigen Stunden klart die Reaktionsmischung auf und wird dann zunehmend zähflüssiger, weshalb noch 50 ml DMF zugegeben werden. Der Abbruch der Reaktion erfolgt nach 36 h, in dem der Reaktionsansatz auf 300 ml Eiswasser gegossen wird, wobei das Produkt flockig ausfällt. Der Niederschlag wird auf einer Fritte gesammelt, mit 10-proz. Zitronensäure, Wasser, DMF/Wasser 1/1, Wasser und Ether gewaschen. Nach Wiederholen der Reinigungsoperationen und Trocknen des erhaltenen Pulvers im Hochvakuum über P_2O_5 , gelangt man zu einem chromatographisch einheitlichen (Fließmittelsysteme D, H und I) Produkt, das in trockenem Zustand in den gängigen Lösungsmitteln (DMF, DMSO, Methanol etc.) schwerlöslich ist; Ausb. 4,14 g (81% d. Th.), Schmp. 210–215 °C, $[\alpha]_D^{25} = +0,45^\circ$ (ges. DMF-Lösung). – Aminosäureanaly-

se: Glu 1,96 (2), Ile 1,00 (1), Lys 1,03 (1), Thr 0,86 (1); Racemattest: 1,55% D-Glu 0,72% D-Lys.

$C_{31}H_{84}N_6O_{15} \cdot 0,5 H_2O$ (1030,568)

Ber. C 58,94 H 8,34 N 8,09%,

Gef. C 59,06 H 8,30 N 8,06%.

N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-glutamyl-(γ -tert-butylester)-N^ε-tert-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminyl-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl-(γ -tert-butylester)-O-tert-butyl-L-serin-tert-butylester

[Z-L-Gln-L-Glu(OtBu)-L-Lys(Boc)-L-Gln-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu] (IV): 1,74 g (1,7 mmol) Z-L-Lys(Boc)-L-Gln-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu (Ia) werden in 25 ml Trifluorethanol gelöst und wie gewohnt im Wasserstoffdurchflußverfahren an 200 mg Pd(10%)/Aktivkohle hydriert. Die Reaktion, die dünnschichtchromatographisch verfolgt wird (Laufmittel D), ist nach 2,5 h zu Ende. Nun filtriert man den Katalysator ab, entfernt das Trifluorethanol destillativ und trocknet über P_2O_5 . Das chromatographisch reine (Laufmittel C, D und K), farblose Pulver wird sofort für die Kupplung zum vollgeschützten Oktapeptid eingesetzt.

Methode 1: Das unmittelbar aus der Hydrierung erhaltene Produkt und 800 mg (1,7 mmol) Z-L-Gln-L-Glu(OtBu)-OH (II) sowie 280 mg (1,85 mmol) N-Hydroxybenzotriazol werden in 20 ml absolutem DMF gelöst. Diese Reaktionsmischung wird auf 0 °C abgekühlt, mit 376 mg (1,82 mmol) DCC versetzt und 2 h in der Kälte gerührt. Nach zwanzigstündigem Rühren bei R.T. verdünnt man die zähflüssige Lösung mit DMF, stellt sie über Nacht in den Kühlschrank und filtriert den ausgefallenen DCH über eine Fritte ab. Das Filtrat wird auf Wasser gegossen, der Niederschlag auf einer Fritte gesammelt, mit 10-proz. Zitronensäure, ges. Natriumbicarbonatlösung Wasser und abschließend mit Ether gewaschen. Da im DC noch erhebliche Mengen DCH nachweisbar sind, wird der Fällungs- und Waschprozeß nochmals wiederholt. Weiterhin wird mit DMF/Wasser 1/2 und abschließend mit Ether gewaschen. Auf diese Weise erhält man, nach Trocknen im Hochvakuum über P_2O_5 , ein amorphes Pulver, das nicht frei von DCH ist (Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln A, H und K); Ausb. 1,72 g (76% d. Th.), Schmp. 200–225 °C (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = -11,7^\circ$ ($c = 0,8$, DMF). – Aminosäureanalyse: Ala 1,02 (1), Glu 4,08 (4), Gly 1,04 (1), Lys 0,99 (1), Ser 0,89 (1).

$C_{63}H_{103}O_{20}N_{11}$ (1334,574)

Ber. C 56,70 H 7,78 N 11,54%,

Gef. C 57,55 H 7,85 N 10,65%.

Methode 2: Das unmittelbar aus der Hydrierung erhaltene Produkt und 800 mg (1,7 mmol) Z-L-Gln-L-Glu(OtBu)-OH (II) sowie 280 mg (1,85 mmol) N-Hydroxybenzotriazol werden in 20 ml absolutem DMF gelöst. Diese Reaktionsmischung wird auf 0 °C abgekühlt, mit 350 mg (1,82 mmol) WSCI versetzt und 2 h in der Kälte gerührt. Nach zwanzigstündigem Rühren bei R.T. gießt man die mittlerweile zähflüssige Lösung auf 100 ml eiskalte 10-proz. Zitronensäure, sammelt den ausgefallenen weißen Niederschlag auf einer Fritte und digeriert mit 10-proz. Zitronensäure, ges. Natriumbicarbonatlösung und Wasser. Weiterhin wird mit DMF/Wasser 1/2 und abschließend mit Ether gewaschen. Auf diese Weise erhält man, nach Trocknen im Hochvakuum über P_2O_5 , ein feinpulvriges Produkt, das keine Neben- und Ausgangsprodukte mehr enthält (Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln A, H und K); Ausb. 1,9 g (84% d. Th.), Schmp. 211–215 °C (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = -11,2^\circ$ ($c = 0,8$, DMF). – Aminosäureanalyse: Ala 1,01 (1), Glu 4,03 (4), Gly 1,02 (1), Lys 0,99 (1), Ser (0,94 (1); Racemattest: 1,80% D-Ala, 1,51% D-Glu, 1,00% D-Lys, 0,28% D-Ser.

$C_{63}H_{103}O_{20}N_{11}$ (1334,574)

Ber. C 56,70 H 7,78 N 11,54%,

Gef. C 56,39 H 7,91 N 11,48%.

N^α-Benzoyloxycarbonyl-N^ε-tert-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-O-tert-butyl-L-threonyl-L-isoleucyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-L-glutaminyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-N^ε-tert-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-glutaminyl-L-alanyl-glycyl-L-glutamyl(γ -tert-butylester)-O-tert-butyl-L-serin-tert-butylester

[Z-L-Lys(Boc)-L-Glu(OtBu)-L-Thr(tBu)-L-Glu(OtBu)-L-Ile-L-Glu(OtBu)-L-Gln-L-Glu(OtBu)-L-Lys(Boc)-L-Gln-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu] (V): 1,33 g (1,0 mmol) Z-L-Gln-L-Glu(OtBu)-L-Lys(Boc)-L-Gln-L-Ala-Gly-L-Glu(OtBu)-L-Ser(tBu)-OtBu (IV) werden in 160 ml Methanol/Trifluorethanol 15/1 unter gelindem Erwärmen gelöst. Die Hydrierung erfolgt an 150 mg Pd(10%)/Aktivkohle im Wasserstoffdurchfluß, wobei zur Vermeidung einer Zyklisierung, ein pH-Wert von 4,5–5,5 durch Zutropfen 0,25 N methanolischer HCl aufrechterhalten wird. Nach 45 Minuten bleibt der pH-Wert konstant und der Katalysator wird abfiltriert, das Filtrat eingedampft und getrocknet. Das in den Fließmittelsystemen A, H und K chromatographisch einheitliche Produkt

setzt man ohne weitere Reinigung im folgenden Syntheseschritt ein. Das erhaltene Hydrochlorid (**IVa**) wird zusammen mit 1,02 (1,0 mmol) Z-L-Lys(Boc)-L-Glu(O t Bu)-L-Thr(t Bu)-L-Ile-L-Glu(O t Bu)-OH (**III**), 166 mg (1,2 mmol) HOBt und 110 μ l (1,0 mmol) N-Methylmorpholin in 60 ml DMF/NMP 5/1 gelöst und auf -5°C abgekühlt. Nach 12 h fügt man weitere 191 mg (1,0 mmol) WSCI hinzu, gefolgt von 110 μ l (1,0 mmol) N-Methylmorpholin und rührt insgesamt 22 h bei Zimmertemperatur. Die gallertige Reaktionsmischung wird auf 150 ml eiskalte 10-proz. Zitronensäure gegossen, eine Stunde gerührt und der Niederschlag abfiltriert. Dann löst man das Präzipitat in 150 ml DMF auf und läßt in 150 ml vorgekühlte ges. Natriumbicarbonatlösung einfließen, wobei ein flockiger Niederschlag ausfällt. Dieser wird auf

einer Fritte gesammelt, gründlich mit Wasser gewaschen und zur Abtrennung organischer Beiprodukte zum Schluß mit Acetonitril und Ether digestiert. Nach Trocknen im Hochvakuum erhält man ein sehr feines, amorphes Pulver, dessen Reinheit durch Chromatographie in mehreren Laufmittelsystemen (J, K und L) bestätigt wird; Ausb. 2,0 g (90% d. Th.), Schmp. 220°C (Zers.), $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = 0,95^\circ$ ($c = 0,5$, DMF). – Aminosäureanalyse: Ala 1,01 (1), Glu 6,20 (6), Gly 0,97 (1), Ile 1,00 (1), Lys 1,96 (2), Ser 0,91 (1), Thr 0,94 (1); Racemattest: 1,14% D-Ala, 3,66% D-Glu, 1,68% D-Lys, 0,24% D-Ser.

$\text{C}_{106}\text{H}_{179}\text{N}_{17}\text{O}_{32} \cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$ (2203,68)

Ber. C 57,00 H 8,16 N 10,63%,

Gef. C 57,07 H 8,22 N 10,67%.

- [1] A. Kapurniotu und W. Voelter, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 1251–1257.
- [2] A. Kapurniotu und W. Voelter, *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 361–370.
- [3] W. Voelter, H. Echner, H. Kalbacher, A. Kapurniotu und P. Link, in J. Rivier und G. Marshall (eds.): *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, S. 1057–1058, Escom, Leiden (1990).
- [4] A. Kapurniotu, P. Link und W. Voelter, in G. Jung und E. Bayer, (eds): *Peptides 1988*, S. 97, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1988).
- [5] G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Calahan, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1836 (1964).
- [6] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank und L. Boshart, *J. Org. Chem.* **26**, 2525 (1961).
- [7] E. Hannappel, H. Kalbacher, W. Voelter, *Arch. Biochem. Biophys.* **260**, 456 (1988).
- [8] A. R. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki, M. Brenner, *Helv. Chim. Acta* **44**, 2022 (1961).
- [9] F. Reindel, W. Hoppe, *Chem. Ber.* **87**, 1103 (1954).
- [10] E. von Arx, M. Faupel und M. Brugger, *J. Chromatogr.* **120**, 224 (1976).
- [11] IUPAC–IUB Recommendations 1983 on „Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides“, *Pure Appl. Chem.* **56**, 595 (1984).