

Synthese des vermuteten Nervenwachstumsfaktor-Aktivzentrums* **

Erich Wunsch

Abteilung Peptidchemie, Max-Planck-Institut für Biochemie,
D-8033 Martinsried, Bundesrepublik Deutschland

(Eingegangen 25. Oktober 1984. Angenommen 7. November 1984)

Synthesis of the Hypothetical Active Site of the Nerve Growth Factor

The synthesis of an unsymmetrical cystine peptide corresponding to the sequence 10–25/75–88 of mouse nerve growth factor was performed via the newly developed sulfenohydrazide procedure. The triacontapeptide isolated at a high degree of purity after Sephadex-LH 20 chromatography, did not exhibit in the biological assays the expected nerve growth factor activity as reported by *Revoltella* and coworkers.

(Keywords: Nerve growth factor; Peptide synthesis; Unsymmetrical cystine peptides)

Abkürzungen

Es werden hier die von der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature empfohlenen Abkürzungen für Aminosäuren und Schutzgruppen verwendet.

Andere Abkürzungen: *DCC* = Dicyclohexylcarbodiimid; *HONSu* = *N*-Hydroxysuccinimid; *HOBt* = 1-Hydroxybenzotriazol; *NWF* = Nerven-Wachstums-Faktor, in der englischen Literatur als nerve growth factor (*NGF*) bekannt.

Einleitung

1952 gelang *Levi-Montalcini*³ die Isolierung eines Proteins aus den Speicheldrüsen von Mäusen, das spezifisch das Wachstum von Dendriten aus embryonalen sensorischen und sympathischen Nervenzellen stimuliert. Die Aktivform dieses Nerven-Wachstums-Faktors (*NWF*) offenbar

* Herrn Prof. Dr. *K. Schlögl* zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Auszugsweise vorgetragen am 8. Amer. Peptid Symposium, Tucson (1983)¹ und am 18. Europ. Peptid Symposium, Djurönäset (1984)².

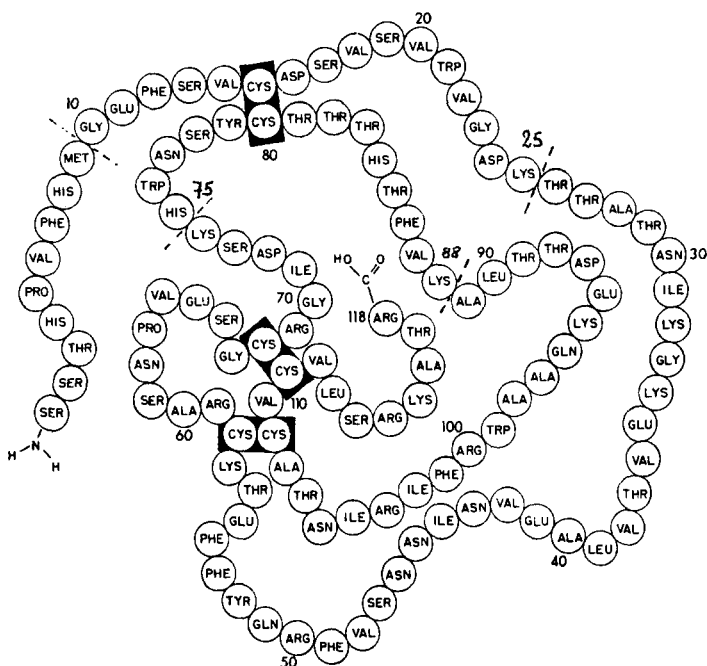


Abb. 1. Aminosäuresequenz des Nervenwachstumsfaktors (*NWF*)

te sich als dimeres Polypeptid mit je 118 Aminosäuren, dessen Primärstruktur von *Angeletti* und *Bradshaw*⁴ aufgeklärt wurde (Abb. 1).

Später beschrieb die *Revoltella*-Gruppe⁵ eine Bromcyanspaltung des Proteins am Methionin in Position 9 und den anschließenden tryptischen Abbau des erhaltenen Proteinfragments 10-118: Das nach diesem Verfahren isolierte unsymmetrische Cystinpeptid der *NWF*-Sequenz 10-25/75-88 soll in genannter biologischen Aktivität den natürlichen *NWF* bei gleicher molarer Konzentration um das Hundertfache übertreffen. Dieses überraschende — bis heute wohl auch einmalige — Ergebnis konnte aber in der Folgezeit von anderen Forschungsgruppen trotz wiederholter Versuche nicht reproduziert werden. Eine Aufklärung dieses strittigen Falles sollte aber die biologische Austestung eines vollsynthetischen „doppelstrangigen“ unsymmetrischen Cystinpeptids der *NWF*-Sequenz 10-25/75-88 erbringen.

Methodik zur Synthese unsymmetrischer Cystinpeptide

Die Synthese unsymmetrischer „doppelstrangiger“ Cystinpeptide ist seit Aufklärung natürlicher Peptidwirkstoffe dieser Klasse — in erster

Linie bekannt das Insulinmolekül — eine Herausforderung an die Peptidchemiker. Zwar lernte man alsbald, in einer „unspezifischen“ Art durch Oxidation zweier thioalfreier Cystein-Peptide oder durch Disproportionierung zweier unterschiedlicher symmetrischer Cystinpeptide — jeweils unter folgender Auftrennung der erhaltenen Peptidgemische — die „doppelstrangigen“ unsymmetrischen Cystinpeptide zu gewinnen.

Die gezielte Bildung eines unsymmetrischen Disulfids sollte aber zu bedeutend günstigeren Ergebnissen führen. Zwei Synthesemethoden könnten dem genügen:

a) Ein „Aufbau“, ausgehend von einem selektiv an den Amino- und Carboxylfunktionen maskierten Cystin-Restes (selektive Kettenverlängerung) mit all seinen zwangsläufig bedingten Schwierigkeiten.

b) Die Synthese zweier unterschiedlicher Cysteinpeptide (thioalfrei oder geeignet S-substituiert) und nach S-Aktivierung einer dieser Komponenten die anschließende spezifische S—S-Verknüpfung.

Diese unterschiedlichen Synthesewege erschienen lange Zeit einer relativ unkontrollierbaren Nebenreaktion unterworfen zu sein; der großen Tendenz unsymmetrischer Disulfide zu disproportionieren. Nach den in unserem Institut durchgeführten Untersuchungen läuft aber diese Nebenreaktion nicht so schnell ab, wie dies lange Zeit angenommen wurde. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß diese Disproportionierung eines unsymmetrischen Cystin-Peptids zu den beiden symmetrischen Disulfid-Verbindungen — neben dem schon bekannten Einfluß selbst milder basischer Bedingungen — in relativer Zeitabhängigkeit sehr stark thiol-katalysiert ist.

Zur spezifischen S—S-Verknüpfung zweier sequenz-verschiedener Cysteinpeptide stehen heute vier Methoden zur Verfügung:

a) *Die Rhodanolyse*⁶: d. i. die Umsetzung von Thiolen oder speziell S-substituierten Verbindungen mit Dirhodan zu Sulfenylrhodaniden; diese werden meist im „Eintopfverfahren“ erstellt und sofort mit einem zweiten Thiol-Derivat (eventuell auch S-substituiert) zum unsymmetrischen Disulfid umgesetzt. Neben dem ungesicherten Ablauf der gewünschten und gezielten S—S-Verknüpfung, noch dazu im Eintopfverfahren, ist der Einsatz des hochreaktiven Dirhodans im Überschuß im Bereich der Peptidsynthese als nicht ungefährlich einzustufen: Dirhodan kann unter den vorliegenden Umsetzungsbedingungen durchaus mit zahlreichen funktionellen Gruppen (auch im geschützten Zustand) reagieren.

b) *Die Sulfensäure-diacylamid-thiolyse*⁷: d. i. eine zweistufige Synthese von Sulfenylphthalimiden aus symmetrischen Disulfiden via Sulfenylbromide und Umsetzung der ersteren mit Thiolen zu unsymmetrischen Disulfiden. Der umständlichen Erstellung der S-Aktivzwischenstufe unter Einschluß des nicht problemlosen Arbeitens mit freiem Brom steht aber der Vorteil ihrer Isolierbarkeit gegenüber.

c) *Die Sulfensäure-alkylkohlen säureanhydrid-thiolyse*⁸: d. i. die Gewinnung eines isolierbaren Thioanhydrids aus Thiol oder dessen speziell S-substituierten Derivat und seine Umsetzung mit dem zweiten Thiol zum unsymmetrischen Disulfid. Als Nachteil dieses Verfahrens muß allerdings die Entstehung von freiwerdendem Chlorwasserstoff während der Aktivierungsreaktion — eine Neutralisation ist wegen der großen Basenempfindlichkeit der Thioanhydride nicht möglich — genannt werden; dies erfordert die Vornahme der S-Aktivierung mittels Alkoxycarbonylsulphenyl-chlorid in neutralem oder schwach saurem Milieu. Unter diesen Voraussetzungen reagiert aber auch die Indolgruppierung des Tryptophans in hohem Umfang mit Sulphenylchlorid unter Bildung von 2-Thioindol-Derivaten.

d) *Die Sulfenohydrazid-thiolyse*⁹: d. i. die Erstellung gut isolierbarer Sulfenohydrazide aus Thiolen und Azodicarbonsäurederivaten und deren Umsetzung mit einer zweiten Thiolkomponente. Dieses S-Aktivierungsverfahren wie auch die anschließende Thiolyse ist durchführbar in Gegenwart von Indol-, Thioether- (auch speziell geschützten Cystein-Derivaten) und Imidazol-Gruppierungen.

Da in der Teilsequenz des *NWF* 10-25/75-88 zwei Tryptophane (je Kette ein Rest), zwei Histidine und eine hohe Anzahl anderer mehrfunktioneller Aminosäuren vorkommen, sollte sich hierfür das „*Wünsch-Romani*-Verfahren“ am geeignetesten erweisen; dies um so mehr als sich auch „freie“ Cystein-Peptide, d. h. α -Amino-, Carboxyl- und Drittfunktionen unmaskiert, nach unseren Erfahrungen mit Azodicarbonsäure-Derivaten zu Sulfenohydrazide umsetzen lassen, wobei im Fall der Wasserlöslichkeit das Azodicarbonsäuredimorpholid¹⁰ das Reagenz der Wahl ist. Auch die folgende Thiolyse mit einem zweiten „freien“ Cysteinpeptid läuft ohne Nebenreaktionen ab.

Ergebnisse und Diskussion

Synthese des „doppelstrangigen“ NWF-Peptids 10-25/75-88

Weg A

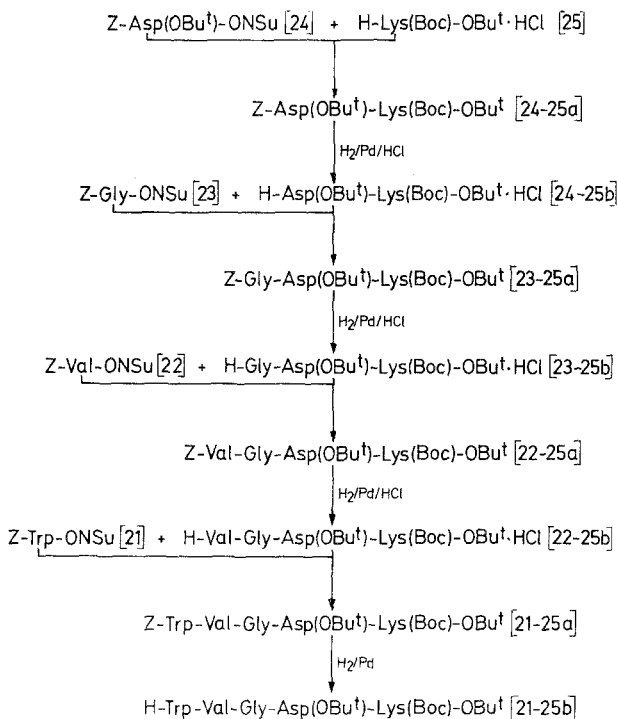
Basierend auf unseren umfangreichen Erfahrungen sollte als einfachster Weg einer Synthese der *NWF*-Teilsequenz 10-25/75-88 die vorhergehende getrennte Erstellung der beiden Cysteinpeptide der A-Kette (Sequenz 10-25) und B-Kette (Sequenz 75-88) nach der *Schwyzer-Wünsch*-Strategie¹¹ unter Verwendung eines S-*tert*-Butylthio-Schutzes¹² für Cystein und letztlich deren gezielte S—S-Verknüpfung nach der Sulfenohydrazid-Methode sein.

1. Darstellung der A-Kette

Das S-geschützte Hexadecapeptid der *NWF*-Teilsequenz 10-25, d. i. H-Gly-Glu-Phe-Ser-Val-Cys(*S*Bu^t)-Asp-Ser-Val-Ser-Val-Trp-Val-Gly-Asp-Lys-OH, wurde auf folgendem Weg synthetisiert:

a) Erstellung der Fragmente

Fragment A-I, d. i. H-Trp-Val-Gly-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OBu^t [21—25 b], war durch stufenweisen Aufbau ausgehend von H-Lys(Boc)-OBu^t mit den *N*-Hydroxysuccinimidestern der *N*-Benzyloxycarbonyl-Derivate von Asp(OBu^t), Gly, Val und Trp* in Sequenzfolge (jeweils mit intermediärer N²-Deblockierung der Benzyloxycarbonyl-Peptide) in einer Ausbeute von 43% zugänglich (s. Schema 1):

Schema 1. Teilsequenz 21—25 (*Fragment A-I*)

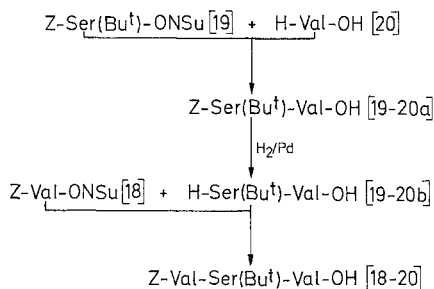
* Die angewandten Aminosäure-Derivate wurden nach bekannten Verfahren hergestellt¹⁴.

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3 : 1 : 1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20); Schmp. 94—98 °C; $[\alpha]_D^{20}$: —18.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —22.3° ($c = 1$, in Methanol); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (24 h; 110 °C unter Thioglykolsäure-Zusatz): Trp 0.92 (1) Val 0.92 (1) Gly 1.01 (1) Asp 1.06 (1) Lys 1.09 (1); gaschromatographische Enantiomeren-Bestimmung¹³: *D*-Val 0.4%; *D*-Asp 1.7%; *D*-Lys 2.4%; *D*-Trp < 1%.

$C_{41}H_{65}N_7O_{10} \cdot 1/2 H_2O$ (825.04). Ber. C 59.69 H 8.06 N 11.88.
Gef. C 59.85 H 8.11 N 11.77.

Fragment A-II, d.i. *Z*-Val-Ser(*Bu*^t)-Val-OH [18—20], wurde nach gleichem stufenweisen Aktivester-Anbau von *Z*-Ser(*Bu*^t)-ONSu und *Z*-Val-ONSu ausgehend von Valin in 81% Ausbeute synthetisiert (s. Schema 2):

Schema 2. Teilsequenz 18—20 (*Fragment A-II*)



Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3 : 1 : 1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20); Schmp. 139—142 °C; $[\alpha]_D^{20}$: —11.6° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —13.9° ($c = 1$, in Methanol); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (24 h; 110 °C): Val 1.97 (2) Ser 1.01 (1).

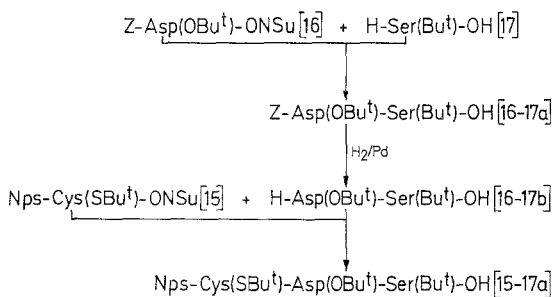
$C_{25}H_{39}N_3O_7$ (493.61). Ber. C 60.83 H 7.96 N 8.51.
Gef. C 60.72 H 8.09 N 8.58.

Fragment A-III, d.i. *Nps*-Cys(*SBu*^t)-Asp(*OBu*^t)-Ser(*Bu*^t)-OH [15—17 a], konnte in üblicher Weise aus *O*-*tert*-Butyl-serin durch Anknüpfung von *Z*-Asp(*OBu*^t)-ONSu und *Nps*-Cys(*SBu*^t)-ONSu in 90% Ausbeute erhalten werden (s. Schema 3):

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in Cyclohexan/Chloroform/Essigsäure (45 : 45 : 10) und Methanol/Essigester/Methylenchlorid (1 : 2 : 3); Schmp. 69—74 °C; $[\alpha]_D^{20}$: —31.4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —32.0° ($c = 1$, in Methanol); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (24 h; 110 °C unter Thioglykolsäurezusatz): Cys 1.06 (1) Asp 0.97 (1) Ser 0.92 (1):

$C_{28}H_{44}N_4O_9S_3$ (676.86). Ber. C 49.68 H 6.55 N 8.28 S 14.21.
Gef. C 49.50 H 6.46 N 8.20 S 14.12.

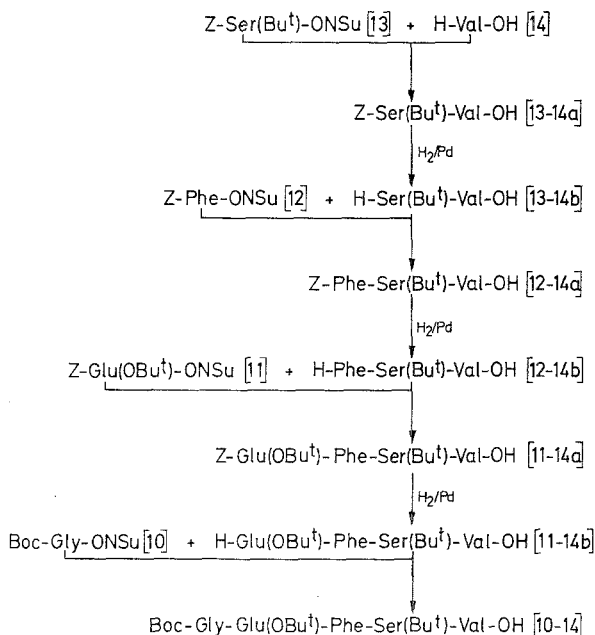
Schema 3. Teilsequenz 15—17 (Fragment A-III)



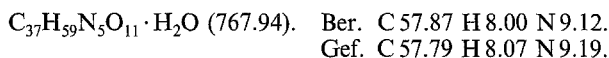
Fragment A-IV, d. i. *Boc-Gly-Glu(OBu^t)-Phe-Ser(Bu^t)-Val-OH* [10—14], wurde in gleicher Weise ausgehend von Valin durch stufenweisen Umsatz mit *Z-Ser(Bu^t)-ONSu*, *Z-Phe-ONSu*, *Z-Glu(OBu^t)-ONSu* und letztlich mit *Boc-Gly-ONSu* in 63% Ausbeute gewonnen (s. Schema 4):

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in Cyclohexan/Chloroform/Essigsäure (45:45:10) und *iso*-Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30); Schmp.

Schema 4. Teilsequenz 10—14 (Fragment A-IV)



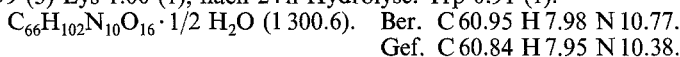
218—219 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —12.9° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —15.4° ($c = 1$, in Methanol); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (24 h; 110 °C): Ser 1.01 (1) Glu 1.04 (1) Gly 0.96 (1) Val 0.99 (1) Phe 1.00 (1); gaschromatographische Enantiomeren-Bestimmung: *D*-Val 0.2%; *D*-Ser 0.1%; *D*-Phe 0.8%; *D*-Glu 0.8%.



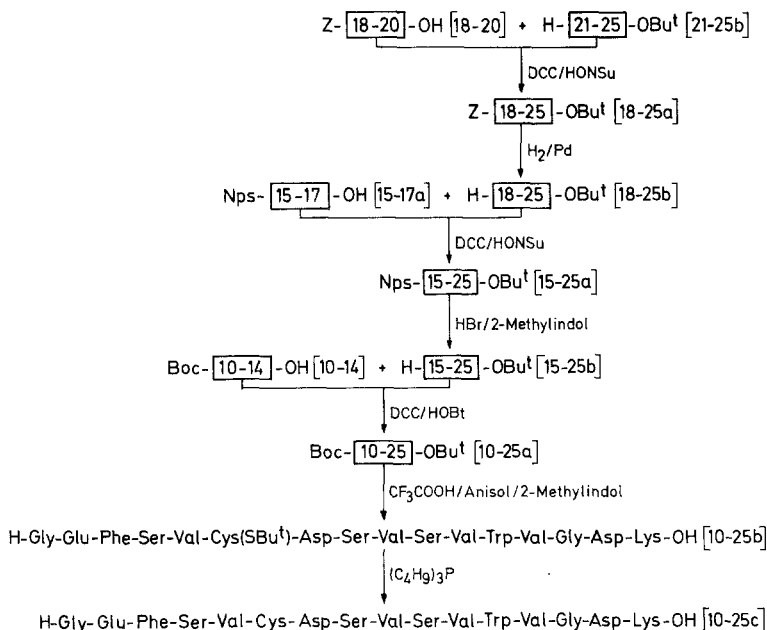
b) Verknüpfung der Fragmente

Die Fragmente A-I, A-II, A-III und A-IV wurden laut Schema 5 nach dem Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid-^{15,16} bzw. 1-Hydroxybenzotriazol¹⁷-Verfahren zur vollgeschützten A-Kette verknüpft. Als erstes führte die Kondensation der Fragmente A-I und A-II zu *Z*-Val-Ser(*Bu*^t)-Val-Trp-Val-Gly-Asp(*OBu*^t)-Lys(*Boc*)-*OBu*^t [18—25 a] in 77% Ausbeute:

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in Methanol/Essigester/Methylenchlorid (1 : 2 : 3) und *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure (3 : 2 : 1); Schmp. 228—232 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —21.4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —25.6° ($c = 1$, in Methanol); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (48 h; 110 °C): Asp 1.03 (1) Ser 0.97 (1) Gly 1.00 (1) Val 2.99 (3) Lys 1.00 (1); nach 24 h Hydrolyse: Trp 0.91 (1).



Schema 5. Teilsequenz 10—25 (A-Kette)



Folgende hydrogenolytische Entfernung der N^z -Schutzgruppe zum aminofreien Sequenzteilstück A-[I-II] und Anknüpfung des Fragments A-III an dieses lieferte das gewünschte *Nps*-Cys(*SBu*^t)-Asp(*OBu*^t)-Ser(*Bu*^t)-Val-Ser(*Bu*^t)-Val-Trp-Val-Gly-Asp(*OBu*^t)-Lys(*Boc*)-*OBu*^t [15—25a] in 82% Ausbeute:

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in Methanol/Essigester/Methylenchlorid (1 : 2 : 3) und Cyclohexan/Chloroform/Essigsäure (45 : 45 : 10); Schmp. 235—238 °C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: + 63.6° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: + 79.1° ($c = 0.3$, in *N*-Methylpyrrolidon); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (48 h; 110 °C unter Thioglykolsäure-Zusatz): Cys 0.98 (1) Asp 1.99 (2) Ser 1.91 (2) Gly 1.01 (1) Val 2.99 (3) Lys 1.01 (1) Trp 0.90 (1).

$C_{86}H_{138}N_{14}O_{22}S_3$ (1816.36). Ber. C 56.87 H 7.66 N 10.80 S 5.30.
Gef. C 56.88 H 7.63 N 10.89 S 5.18.

Abspaltung des 2-Nitrophenylsulfonyl-Restes vom Sequenzteilstück A-[I-III] mittels Bromwasserstoff unter Zusatz von 2-Methylindol und anschließender Anbau des Fragmentes A-IV an das aminofreie Undecapeptid-Derivat [15—25 b] führte zur vollgeschützten A-Kette, d. i. *Boc*-Gly-Glu(*OBu*^t)-Phe-Ser(*Bu*^t)-Val-Cys(*SBu*^t)-Asp(*OBu*^t)-Ser(*Bu*^t)-Val-Ser(*Bu*^t)-Val-Trp-Val-Gly-Asp(*OBu*^t)-Lys(*Boc*)-*OBu*^t [10—25 a] in 90% Ausbeute:

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3 : 1 : 1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20); $[\alpha]_D^{20}$: — 23.4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: — 26° ($c = 0.2$ in Trifluorethanol); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (24 h; 110 °C unter Thioglykolsäure-Zusatz): Asp 2.02 (2) Ser 2.88 (3) Glu 0.99 (1) Gly 1.84 (2) Cys 1.06 (1) Val 3.52 (4) Phe 0.99 (4) Lys 1.03 (1); nach 48 h-Hydrolyse: Val 3.93 (4) Gly 1.93 (2); Peptidgehalt: 96% ber. für $M_r = 2395.09$.

Die Aufhebung der säurelabilen Seitenkettenmaskierung mit Ausnahme der *S*-*tert*-Butylthio-Gruppierung am Cystein gelang ohne Schwierigkeiten mit Trifluoressigsäure unter Zusatz von 2-Methylindol und Anisol als Scavenger (der bekannte Einsatz von Thiolen als effiziente Kationenfänger ist wegen der anwesenden Disulfid-Gruppierung ausgeschlossen); der *S*-*tert*-Butylthio-Schutz des Cystein-Restes bleibt unter den eingehaltenen Bedingungen voll erhalten. Anschließende Gelfiltration an Sephadex LH 20 (Elution mit 0.15 *M* Ammoniumacetat-Puffer, *pH* 8.2/*n*-Butanol, 93 : 7) und Rechromatographie unter den gleichen Bedingungen ergab das *S*-*tert*-Butylthio-Derivat der A-Kette [10—25 b]:

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Pyridin/Wasser (50 : 10 : 50 : 40); einheitlich in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an μ -Bondapak C 18 (Elution mit Acetonitril/Natriumphosphat-Puffer, *pH* 5.0, 28 : 72 bei einer Fließgeschwindigkeit von 1.5 ml/min; Detektion: UV₂₁₀); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (48 h; 110 °C): Asp 2.11 (2) Ser 2.97

(3) Glu 1.00 (1) Gly 1.93 (2) Val 3.80 (4) Phe 0.93 (1) Lys 1.01 (1) (Peptidgehalt: 73% ber. für $M_r = 1802.97$) und des Aminopeptidase M-Abbaus: Asp 1.98 (2) Ser 2.85 (3) Glu 1.08 (1) Gly 2.00 (2) Cys(SBu^t) 1.06 (1) Val 3.84 (4) Phe 1.03 (1) Lys 1.05 (1) Trp 1.05 (1) (Spaltung: 71% ber. für $M_r = 1802.97$).

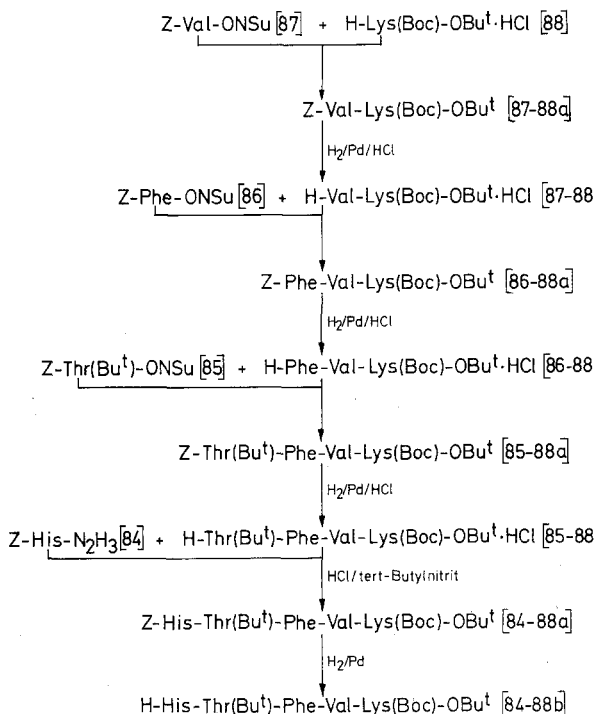
2. Darstellung der B-Kette

Gut zugänglich wurde das S-geschützte Tetradecapeptid der *NWF*-Teilsequenz 75-88, d. i. H-His-Trp-Asn-Ser-Tyr-Cys(SBu^t)-Thr-Thr-Thr-His-Thr-Phe-Val-Lys-OH, durch folgende Schritte:

a) Erstellung der Fragmente

Fragment B-I, d. i. H-His-Thr(Bu^t)-Phe-Val-Lys(Boc)-OBu^t [84—88 b], wurde ausgehend von H-Lys(Boc)-OBu^t im stufenweisen Aufbau-Verfahren mittels Z-Val-ONSu, Z-Phe-ONSu, Z-Thr(Bu^t)-ONSu und letztlich Z-His-N₃ in einer Ausbeute von 49% synthetisiert (s. Schema 6):

Schema 6. Teilsequenz 84—88 (*Fragment B-I*)



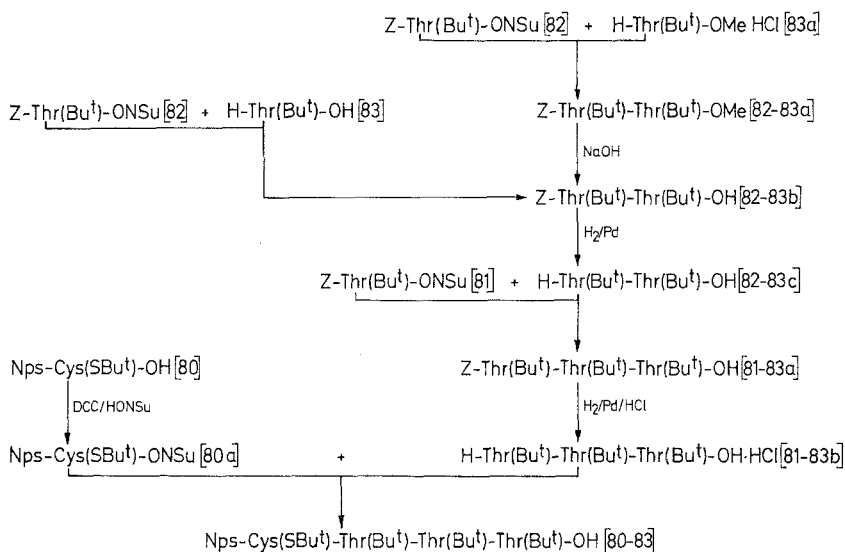
Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3 : 1 : 1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20); Schmp. 115—118 °C; $[\alpha]_D^{20}$: —24.1° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —28.9° ($c = 1$, in Methanol); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (48 h; 110 °C): His 1.01 (1) Thr 0.99 (1) Phe 1.01 (1) Val 1.03 (1) Lys 0.97 (1); gaschromatographische Enantiomeren-Bestimmung: *D*-Val < 0.5%; *D*-*allo*-Thr < 0.5%; *D*-Phe 1.0%; *D*-Lys 1.9%; *D*-His 2.9%.

$C_{43}H_{70}N_8O_9 \cdot 1.5 H_2O$ (870.12). Ber. C 59.36 H 8.46 N 12.88.

Gef. C 59.48 H 8.30 N 12.54.

Fragment B-II, d. i. *Nps*-Cys(*SBu*^t)-Thr(*Bu*^t)-Thr(*Bu*^t)-Thr(*Bu*^t)-OH [80—83], war nach oben genannten Aktivester-Verfahren unter Rückgriff auf *O*-*tert*-Butyl-threonine, *Z*-Thr(*Bu*^t)-ONSu (zweimal) und letztlich *Nps*-Cys(*SBu*^t)-ONSu in 65% Ausbeute zugänglich (s. Schema 7):

Schema 7. Teilsequenz 80—83 (*Fragment B-II*)



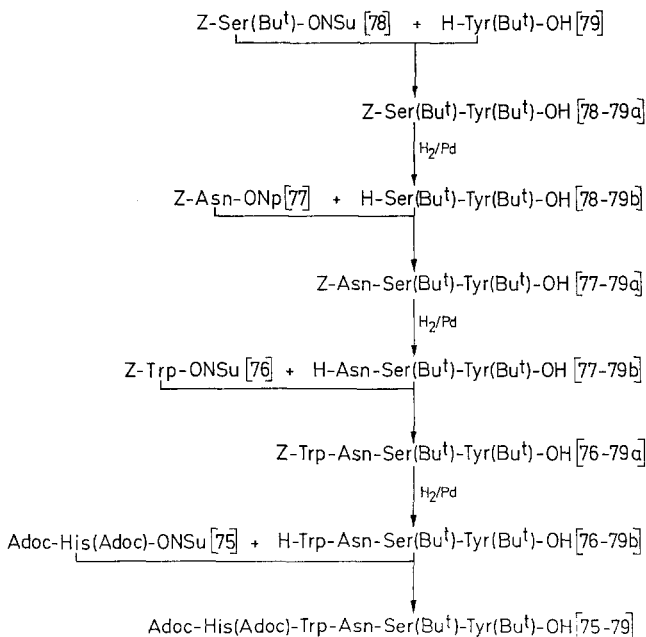
Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3 : 1 : 1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20); Schmp. 95—99 °C; $[\alpha]_D^{20}$: —11.0° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —7.0° ($c = 1$ in Methanol); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (24 h; 110 °C unter Thioglykolsäure-Zusatz): Cys 0.96 (1) Thr 3.09 (3); gaschromatographische Enantiomeren-Bestimmung: *D*-*allo*-Thr < 0.5%; *D*-Cys nicht bestimmt.

$C_{37}H_{63}N_5O_{10}S_3$ (834.15). Ber. C 53.28 H 7.62 N 8.40 S 11.33.

Gef. C 52.99 H 7.42 N 8.33 S 11.45.

Fragment B-III, d. i. *Adoc*-His(*Adoc*)-Trp-Asn-Ser(*Bu*^t)-Tyr(*Bu*^t)-OH [75—79], wurde wiederum nach dem bewährten stufenweisen Anbauverfahren mit Hilfe der Aktivester *Z*-Ser(*Bu*^t)-ON*Su*, *Z*-Asn-ON*p*, *Z*-Trp-ON*Su* und letztlich *Adoc*-His(*Adoc*)-ON*Su* unter Verwendung von *O*-*tert*-Butyl-tyrosin als Startmaterial in 49% Ausbeute erhalten (s. Schema 8):

Schema 8. Teilsequenz 75—79 (Fragment B-III)



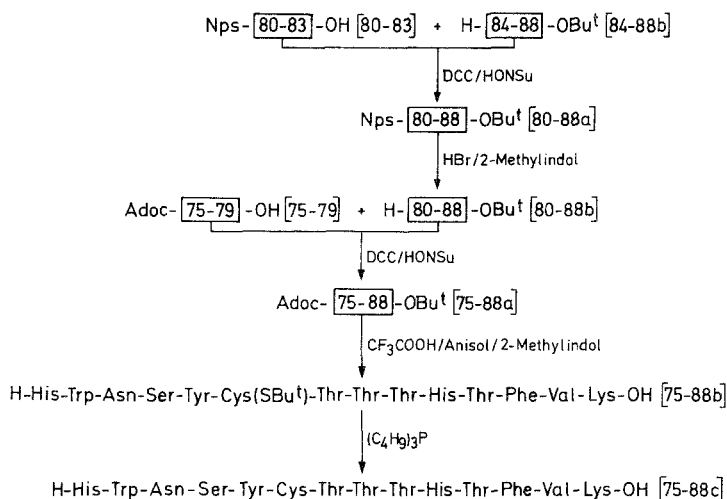
Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure (3:2:1); Schmp. 179—180 °C; $[\alpha]_D^{20}$: +2.4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: +2.7° (*c* = 1, in Methanol); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (24 h; 110 °C unter Thioglykolsäure-Zusatz): Asp 1.03 (1) Ser 0.99 (1) Tyr 0.98 (1) His 0.99 (1) Trp 0.90 (1); gaschromatographische Enantiomeren-Bestimmung: *D*-Ser < 0.5%; *D*-Asp 1.3%; *D*-Tyr 1.3%; *D*-Trp < 1%; *D*-His 0.9%.

$\text{C}_{63}\text{H}_{83}\text{N}_9\text{O}_{13} \cdot 1.5 \text{H}_2\text{O}$ (1201.43). Ber. C 62.98 H 7.22 N 10.49.
Gef. C 62.75 H 7.05 N 10.36.

b) Verknüpfung der Fragmente (s. Schema 9)

In Sequenzfolge wurden zuerst die Fragmente B-I und B-II nach dem Dicyclohexylcarbodiimid/Hydroxysuccinimid-Verfahren zu *Nps*-

Schema 9. Teilsequenz 75—88 (B-Kette)



Cys(SBu^t)-Thr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-His-Thr(Bu^t)-Phe-Val-Lys(Boc)-OBu^t [80—88 a] in 60% Ausbeute verknüpft:

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in Methanol/Essigester/Methylenchlorid (1 : 2 : 3) und *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure (3 : 2 : 1); Schmp. 151—154 °C; $[\alpha]_D^{20}$: —21.4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —22.8° ($c = 1$ in Methanol); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (24 h; 110 °C unter Thioglykolsäure-Zusatz): Thr 3.74 (4) Cys 1.00 (1) Val 1.00 (1) Phe 1.02 (1) His 1.00 (1) Lys 1.01 (1); gaschromatographische Enantiomeren-Bestimmung: *D*-Val 1.2%; *D-allo*-Thr < 0.5%; *D*-Phe 1.2%; *D*-Lys 2.2%; *D*-His 4.3%.

$\text{C}_{80}\text{H}_{131}\text{N}_{13}\text{O}_{18}\text{S}_3$ (1 659.23). Ber. C 57.91 H 7.96 N 10.97 S 5.80.
Gef. C 57.86 H 7.93 N 11.01 S 5.60.

Anschließende Abspaltung der 2-Nitrophenylsulfonyl-Schutzgruppe mittels Bromwasserstoff/2 Methylindol und Verknüpfung des resultierenden aminofreien Nonapeptid-Derivats [80—88 b] mit Fragment B-III wiederum nach der Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid-Methode lieferte die vollgeschützte B-Kette, d. i. Adoc-His(Adoc)-Trp-Asn-Ser(Bu^t)-Tyr(Bu^t)-Cys(SBu^t)-Thr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-Thr(Bu^t)-His-Thr(Bu^t)-Phe-Val-Lys(Boc)-OBu^t [75—88 a] in 78% Ausbeute:

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in Chloroform/80% Essigsäure/Trifluorethanol (2:0.5:0.5) und Chloroform/80% Essigsäure/Methanol (2:0.5:0.5); Schmp. 180—185 °C; $[\alpha]_D^{20}$: —11.2° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —13.7° ($c = 1$, in Dimethylformamid); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (48 h; 110 °C

unter Thioglykolsäure-Zusatz): Asp 1.06 (1) Thr 3.61 (4) Ser 0.89 (1) Cys 0.95 (1) Val 1.02 (1) Tyr 1.03 (1) Phe 1.03 (1) His 1.88 (2) Lys 1.01 (1) Trp 0.96 (1); bei 24 h-Hydrolyse: Thr 3.90 (4) Ser 0.97 (1); Peptidgehalt: 94% ber. für $M_r = 2\ 662.45$.

Die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen unter Erhalt der *S*-*tert*-Butylthio-Gruppe des Cystein-Restes erfolgte wiederum mittels Trifluoressigsäure unter Zusatz von 2-Methylindol und Anisol als Scavenger (s. o.); Gel-Filtration des Rohproduktes an Biogel P 6 (Elution mit 0.1 *M* Ammoniumacetat-Puffer, *pH* 4.0) und nachfolgende Verteilungschromatographie an Sephadex G-25 (Elution mit der Oberphase des Lösungsmittelsystems *n*-Butanol / 0.25 *M* Ammoniumacetat-Puffer, *pH* 4.5/Ethanol, 1:1:0.04) lieferte die *S*-geschützte B-Kette, d. i. H-His-Trp-Asn-Ser-Tyr-Cys(*SBu'*)-Thr-Thr-Thr-His-Thr-Phe-Val-Lys-OH [75—88 b]:

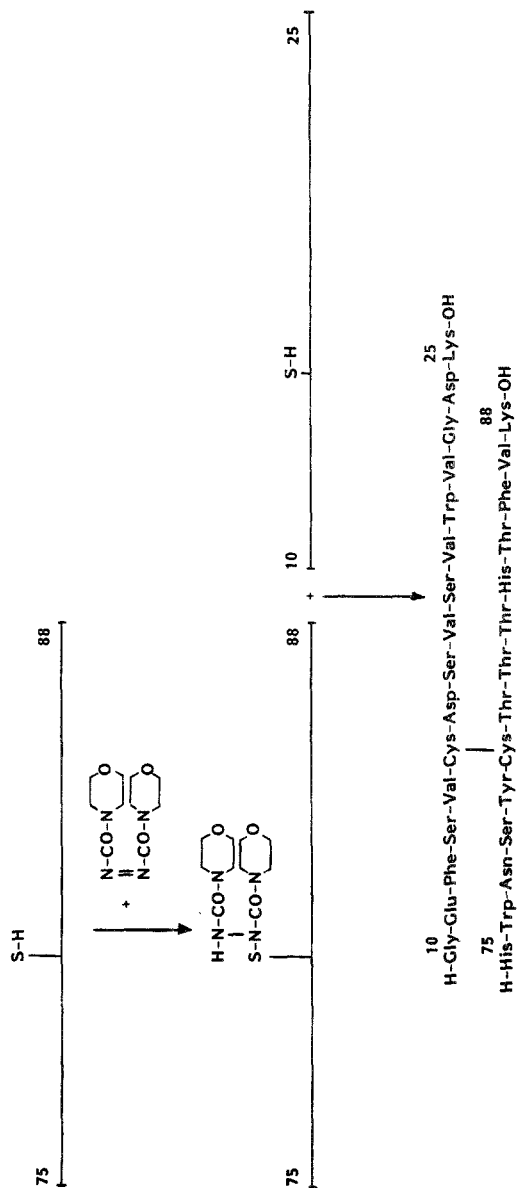
Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Pyridin/Wasser (45:10:15:20 und 50:10:50:40); einheitlich in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an Rad Pak C 18 (10 × 0.8 cm) mit Acetonitril/1% Trifluoressigsäure Dibutylammonium-Salz, 26:76, als Eluens (Fließgeschwindigkeit 1.4 ml/min; Detektion: UV₂₈₀); Aminosäureanalysen des 6 *M* HCl-Hydrolysats (24 h, 110 °C unter Thioglykolsäure-Zusatz): Asp 1.01 (1) Thr 3.63 (4) Ser 0.91 (1) Cys 0.89 (1) Val 0.81 (1) Tyr 1.00 (1) Phe 0.87 (1) His 2.02 (2) Lys 0.79 (1) Trp 0.95 (1); bei 48 h-Hydrolyse: Phe 1.01 (1) Val 0.97 (1) Lys 1.02 (1) (Peptidgehalt: 87% ber. für $M_r = 1\ 813.13$) und des Aminopeptidase *M*-Abbaus: Ser 0.97 (1) Cys (*SBu'*) 1.02 (1) Val 1.01 (1) Tyr 0.99 (1) Phe 1.01 (1) His 1.89 (2) Lys 0.99 (1) Trp 0.99 (1); Asn und Thr nicht bestimmt.

3. *Synthese des unsymmetrischen Cystinpeptids nach Weg A* (s. Schema 10)

Durch Reduktion mit Tributylphosphin¹⁸ wurde sowohl die *S*-geschützte A-Kette [10—25 b] als auch die *S*-geschützte B-Kette [75—88 b] unter ähnlichen Bedingungen [A-Kette: in 0.5 *M* Ammoniumacetat-Puffer, *pH* 7.7 (6 *M* in Harnstoff); B-Kette: in 80% Essigsäure (6 *M* in Harnstoff und in Gegenwart eines hohen Überschusses an Ammoniumacetat)] in die entsprechenden Cystinpeptide [10—25 c] und [75—88 c] übergeführt.

Für die *S*-Aktivierung, d. i. die Umsetzung der Cystein-Komponente mit Azodicarbonsäuredimorpholid¹⁰, war wegen der günstigeren Löslichkeitseigenschaften — die aber trotzdem ein Arbeiten in 6 *M* Harnstoff erforderten — die erstellte B-Kette besser geeignet als die relativ schwerlösliche A-Kette. Trotz der wohl bislang einmaligen Synthese „doppelsträngiger“ unsymmetrischer Cystinpeptide aus zwei verschiedenen völlig „freien“, d. h. in allen Funktionen ungeschützten Cystinpeptiden konnte, wenn auch nur in bescheidenem Maße, das gewünschte *NWF*-Sequenzteilstück 10-25/75-88 durch Chromatographie des Reaktionsgemisches erhalten werden.

Schema 10. *Synthese des unsymmetrischen Cystinpeptids 10-25/75-88 nach Weg A*



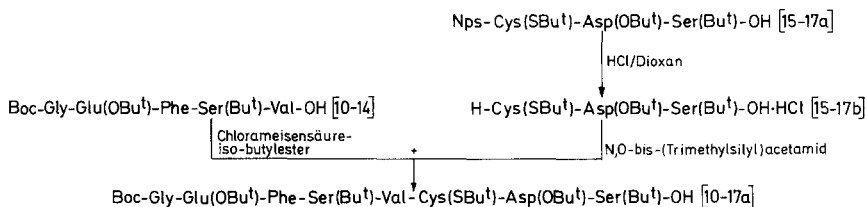
Weg B

Wegen der unbefriedigenden Ergebnisse des Synthesewegs A — vor allen Dingen die letzte Stufe betreffend — wurde der Schwerpunkt der synthetischen Arbeiten auf einen alternativen Weg gesetzt; unter Einbeziehung der unter Weg A erstellten Fragmente für die A-Kette und der aufgebauten vollgeschützten B-Kette wurde das *NWF*-Sequenzteilstück 10-25/75-88 wie folgt zugänglich:

1. Verknüpfung der A-Ketten-Fragmente zu „höheren“ Teilstücken

Teilstück A-[III-IV] d. i. *Boc*-Gly-Glu(*OBu*^t)-Phe-Ser(*Bu*^t)-Val-Cys(*SBu*^t)-Asp(*OBu*^t)-Ser(*Bu*^t)-OH [10—17 a], wurde durch Kondensation von Fragment A-IV, [10—14], mit dem durch *Nps*-Abspaltung gewonnenen Tripeptid-Derivat H-Cys(*SBu*^t)-Asp(*OBu*^t)-Ser(*Bu*^t)-OH [15—17 b] — im silylierten Derivatisierungszustand — nach dem Mischanhydridverfahren in 68% Ausbeute erhalten (s. Schema 11):

Schema 11. Teilsequenz 10—17 (A-Kettenteilstück) A-[III-VI]



Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20); Schmp. 262—265 °C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: —48.7° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —58.3° (*c* = 0.3, in Dimethylformamid); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (24 h; 110 °C unter Thioglykolsäurezusatz): Asp 1.00 (1) Ser 1.98 (2) Glu 1.03 (1) Gly 1.00 (1) Cys 0.94 (1) Val 0.94 (1) Phe 1.04 (1); gaschromatographische Enantiomeren-Bestimmung: *D*-Val 2.8%; *D*-Ser < 0.5%; *D*-Asp 1.82%; *D*-Phe 0.68%; *D*-Glu 0.83%.

$C_{59}H_{98}N_8O_{17}S_2$ (1 255.61). Ber. C 56.44 H 7.87 N 8.92 S 5.17.
Gef. C 55.97 H 7.75 N 8.99 S 5.11.

Teilstück A-[I-II], d. i. H-Val-Ser(*Bu*^t)-Val-Trp-Val-Gly-Asp(*OBu*^t)-Lys(*Boc*)-*OBu*^t [18—25 b] war leicht durch hydrogenolytische Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe aus dem entsprechenden Octapeptid-Derivat [18—25 a] des Wegs A (s. o.) in 92% Ausbeute zugänglich:

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3 : 1 : 1) und *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (60 : 6 : 24 : 20); $[\alpha]_D^{20}$: —17.0 bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —21.7 (*c* = 0.5, in Dimethylformamid).

$C_{58}H_{97}N_{10}O_{14}Cl$ (1 193.92). Ber. C 60.19 H 8.36 N 12.10.
Gef. C 59.97 H 8.19 N 11.89.

2. Synthese des unsymmetrischen Cystinpeptids nach Weg B

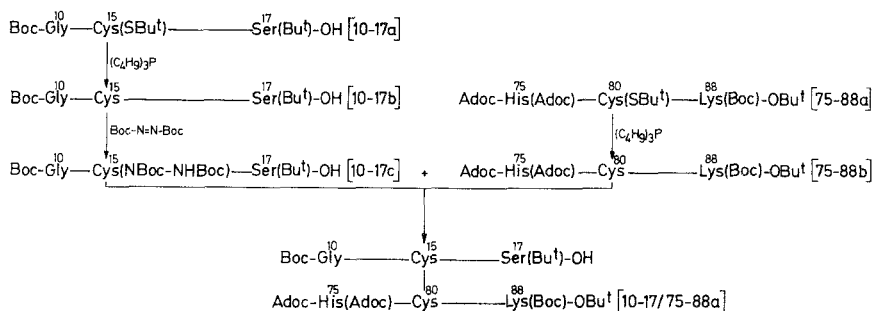
Tributylphosphin-Abspaltung der S-*tert*-Butylthio-Schutzgruppe von der allseits geschützten B-Kette (s. Schema 12) erbrachte das thioolfreie Tetradecapeptid *Adoc*-His(*Adoc*)-Trp-Asn-Ser(*Bu*^t)-Tyr(*Bu*^t)-Cys-Thr(*Bu*^t)-Thr(*Bu*^t)-Thr(*Bu*^t)-His-Thr(*Bu*^t)-Phe-Val-Lys(*Boc*)-O*Bu*^t, [75—88 d]; das dünnsschichtchromatographisch einheitliche Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung als Thiol-Komponente der Disulfid-Verknüpfung zugeführt. Teilstück A-[III-IV] wurde durch analoge Tributylphosphin-Reduktion in das thioolfreie Octapeptid-Derivat *Boc*-Gly-Glu(O*Bu*^t)-Phe-Ser(*Bu*^t)-Val-Cys-Asp(O*Bu*^t)-Ser(*Bu*^t)-OH [10—17 b] in fast quantitativer Ausbeute übergeführt; seine Umsetzung mit Azodicarbonsäure-di-*tert*-butylester in Dimethylformamid in das S-aktivierte Sulfenohydrazid-Derivat [10—17 c] war mit 82% Ausbeute erfolgreich:

Dünnschichtchromatographisch rein in *iso*-Amylalkohol/Pyridin/Wasser (35:35:30) und *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure (3:2:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —21.5° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —24.7° ($c = 0.5$, in Dimethylformamid).

C₆₅H₁₀₈N₁₀O₂₁S (1 397.72). Ber. C 55.86 H 7.79 N 10.02 S 2.29.
Gef. C 55.86 H 7.69 N 9.65 S 2.26.

Das gewonnene S-aktivierte Octapeptid-Derivat [10—17 c] wurde mit dem thioolfreien Tetradecapeptid [75—88 d] im Verhältnis 1.5:1 in Dimethylformamid verknüpft (unter dünnsschichtchromatographischer Verfolgung der Umsetzungsrate der Thiolverbindung: quantitativ) (s. Schema 12). Die Abtrennung der überschüssigen S-Aktivkomponente [10—17 c] gelang durch einfache Gelfiltration an Sephadex LH 20 (Elution mit Dimethylformamid bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min). Die übliche Aufarbeitung des Eluats durch Einengung und Fällung mit Ether erbrachte das unsymmetrische Peptid-Derivat [10—17/75-88 a] in 72% Ausbeute:

Schema 12. Teilsequenz 10-17/75-88 (gezielte Disulfidbrückenbildung nach Weg B)



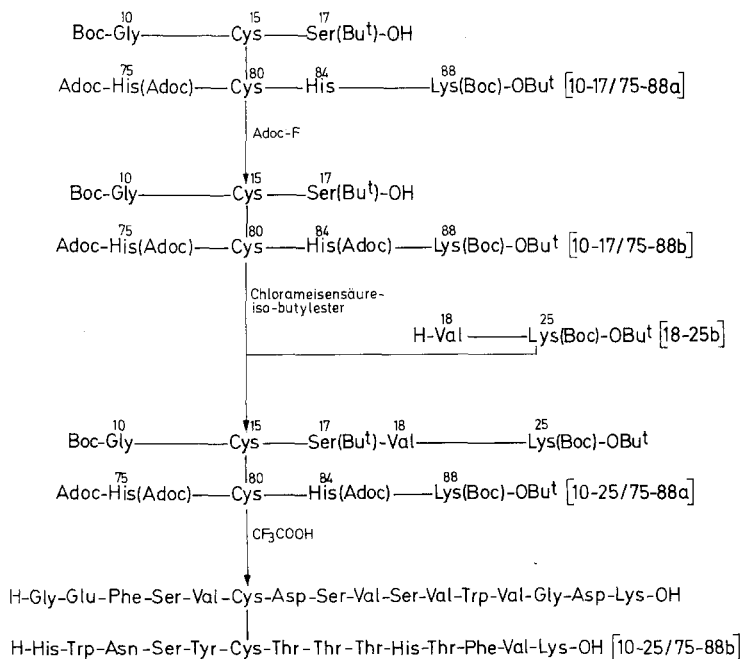
Dünnschichtchromatographisch einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (3:1:1) und Chloroform/80% Essigsäure/Methanol (2:0.5:1); Schmp. 202—206 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —3.4° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —4.6° ($c = 0.2$, in Dimethylformamid); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (24 h; 110 °C unter Thioglykolsäure-Zusatz): Asp 1.93 (2) Thr 4.00, Ser 3.06 (3) Glu 1.02 (1) Gly 1.01 (1) Cys 1.83 (2) Tyr 0.97 (1) Phe 1.84 (2); nach 48 h — Hydrolyse: Val 1.92 (2) Phe 2.00 (2) His 1.71 (2) Lys 0.98 (1); Peptidgehalt: 99% ber. für $M_r = 3\,739.71$.

Der Anbau der A-Ketten-Restsequenz [18—25 b] an das vorgehend erstellte unsymmetrische Cystinpeptid-Derivat [10-17/75-88 a] erfolgte — als Resultat unserer Versuchsansätze — nach einer vorausgehenden Blockierung der Imidazolfunktion des Histinrestes-84 der B-Kette als N^{rim} -Adamantylloxycarbonyl-Derivat (Acylierung nach bekanntem Verfahren mittels *Adoc-F*¹⁹) (s. Schema 13). Das entsprechende Peptid-Derivat [10-17/75-88 b] wurde durch einfache Ausfällung aus dem Acylierungsansatz in fast quantitativer Ausbeute erhalten:

Dünnschichtchromatographisch rein in *n*-Heptan/*tert*-Butanol/Essigsäure (3:2:1) und Chloroform/80% Essigsäure/Methanol (2:0.5:1); Schmp. 211—215 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: —1.6° bzw. $[\alpha]_{546}^{20}$: —1.1° ($c = 0.2$, in Dimethylformamid); Ausb.: 95% d. Th.).

$\text{C}_{199}\text{H}_{303}\text{N}_{29}\text{O}_{47}\text{S}_2$ (3917.89). Ber. C 61.01 H 7.80 N 10.37 S 1.64.
Gef. C 60.80 H 7.70 N 10.07 S 1.66.

Schema 13. *NWF*-Teilsequenz 10-25/75-88 (Weg B)



Die Verknüpfung der beiden Teilstücke [10-17/75-88 b] und [18-25 b] nach dem Dicyclohexylcarbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid- oder auch Mischanhydrid-Verfahren verlief erfolgreich. Das gewünschte vollgeschützte unsymmetrische Cystinpeptid-Derivat [10-25/75-88 a] konnte nach Gelfiltration an Sephadex LH-20 (Elution mit Dimethylformamid) in 88% Ausbeute gewonnen werden:

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in Methanol/Essigester/Methylenchlorid (1 : 2 : 3) und Chloroform/80% Essigsäure/Methanol (2 : 0.5 : 1); $[\alpha]_D^{20} + 18.2^\circ$ bzw. $[\alpha]_{246}^{20} + 21.8^\circ$ ($c = 0.2$, in Dimethylformamid); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (48 h; 110 °C unter Thioglykolsäure-Zusatz): Asp 3.06 (3) Thr 4.09 (4) Ser 3.77 (4) Glu 1.05 (1) Gly 2.00 (2) Cys 2.10 (2) Val 4.74 (5) Tyr 0.96 (1) Phe 2.06 (2) His 1.89 (2) Lys 1.95 (2); Peptidgehalt: 98% ber. für $M_r = 5057.35$; gaschromatographische Enantiomeren-Bestimmung: *D*-Val 1.8%; *D*-allo-Thr 0.2%; *D*-Ser 0.2%; *D*-Asp 1.7%; *D*-Phe 0.6%; *D*-Glu 1.0%; *D*-Lys 1.0%; *D*-Trp 2.2%; *D*-His 1.3%; *D*-Tyr 5.4% (hydrolyse-bedingt für die Tyr-Cys-Sequenz).

Die Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen gelang durch Behandeln von [10-25/75-88 a] mit Trifluoressigsäure unter Zusatz von 2-Methylindol und Anisol als Scavenger. Das nach üblicher Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt wurde einer zweifachen Sephadex-LH-20-Chromatographie mit 1 *M* Ammoniumacetat-Puffer (*pH* 3.7)/2-Butanol, 10 : 2, als Eluens unterworfen und das unsymmetrische Cystin-Peptid [10-25/75-88 b] in lyophilisiertem Zustand isoliert:

Dünnschichtchromatographisch weitgehend einheitlich in *n*-Butanol/Essigsäure/Pyridin/Wasser (45 : 10 : 15 : 20 und 50 : 10 : 50 : 40); Aminosäureanalyse des 6 *M* HCl-Hydrolysats (48 h; 110 °C): Asp 2.95 (3) Thr 4.07 (4) Ser 3.91 (3) Glu 1.12 (1) Gly 2.04 (2) Val 4.68 (5) Tyr 0.92 (1) Phe 2.06 (2) His 1.76 (2) Lys 2.00 (2); Cys und Trp nicht bestimmt; Peptidgehalt: 50% ber. für $M_r = 3436.88$.

Die nach Weg B synthetisierte *NWF*-Teilsequenz 10-25/75-88, d. i. das sogenannte *Revoltella*-Spaltstück, erwies sich in umfangreichen biologischen Untersuchungstests als nicht aktiv.

Dank

Meinen wissenschaftlichen Mitarbeitern Prof. Dr. L. Moroder, Frau Dr. S. Romani, Dr. W. Göhring und meiner Cheflaborantin Frau R. Scharf gebührt mein Dank für das vorzügliche Gelingen der experimentellen Arbeiten. Ich danke ferner Herrn Prof. H. Thoenen, Direktor am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abteilung Neurochemie, und seinen Mitarbeitern für die wertvolle Unterstützung bei der biologischen Austestung der synthetischen Materialien.

Das Forschungsvorhaben wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft durch Gewährung von Sachbeihilfen (Wu 20/12-1, Mo 377/2-2) unterstützt.

Literatur

- ¹ Moroder L., Romani S., Wünsch E., Harper G., Thoenen H., in: Peptides: Structure and Function (Hruby V. J., Rich D. H., Hrsg.), S. 175. Rockford, Ill.: Pierce Chemical Company. 1983.
- ² Wünsch E., in: Peptides 1984 (Ragnarsson U., Hrsg.). Stockholm: Almqvist and Wiksell International. Im Druck.
- ³ Levi-Montalcini R., Ann. N. Y. Acad. Sci. **55**, 330 (1952).
- ⁴ Angeletti R. H., Bradshaw R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **68**, 2417 (1971).
- ⁵ Mercanti D., Butler R., Revoltella R., Biochim. Biophys. Acta **494**, 412 (1977).
- ⁶ Hiskey R. G., Ward B. F., J. Org. Chem. **35**, 1118 (1970).
- ⁷ Harpp D. N., Back T. G., J. Org. Chem. **36**, 3828 (1971).
- ⁸ Kamber B., Helv. Chim. Acta **56**, 1370 (1973).
- ⁹ Wünsch E., Romani S., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **363**, 449 (1982).
- ¹⁰ Wünsch E., Moroder L., Romani S., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **363**, 1461 (1982).
- ¹¹ Wünsch E., Angew. Chem. **83**, 773 (1971).
- ¹² Wünsch E., Spangenberg R., in: Peptides 1969 (Scoffone E., Hrsg.), S. 30. Amsterdam: North-Holland. 1971.
- ¹³ Frank H., Nicholson G. J., Bayer E., J. Chromatogr. Sci. **15**, 174 (1977).
- ¹⁴ Wünsch E., in: Houben-Weyl „Methoden der organischen Chemie“, Bd. XV, Synthese von Peptiden, Teil 1 und 2. Stuttgart: G. Thieme. 1974.
- ¹⁵ Wünsch E., Drees F., Chem. Ber. **99**, 110 (1966).
- ¹⁶ Weygand F., Hoffmann D., Wünsch E., Z. Naturforsch. **21 b**, 426 (1966).
- ¹⁷ König W., Geiger R., Chem. Ber. **103**, 788 (1970).
- ¹⁸ Moroder L., Gemeiner M., Göhring W., Jaeger E., Thamm P., Wünsch E., Biopolymers **20**, 17 (1981).
- ¹⁹ Moroder L., Wackerle L., Wünsch E., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **357**, 1647 (1976).