

Modelluntersuchungen zur papainkatalysierten Peptidsynthese im wäßrig-organischen Zweiphasensystem

Günter Döring, Peter Kuhl und Hans-Dieter Jakubke*

Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität, Bereich Biochemie,
DDR-7010 Leipzig, Deutsche Demokratische Republik

(Eingegangen 6. November 1980. Angenommen 16. Januar 1981)

Model Studies on Papain-Catalyzed Peptide Synthesis in a Biphasic Aqueous-Organic System

Several model peptides have been synthesized enzymatically using papain as a catalyst in biphasic aqueous-organic systems. The effect of different cosolvents, *pH*, buffer concentration, and reaction time on the papain-catalyzed synthesis was examined. A comparison of the results obtained indicates that water-immiscible organic solvents provide higher yields than methanol in papain mediated peptide synthesis with carboxyl components in the carboxyl free form. Furthermore, it could be established that papain-catalyzed peptide synthesis can be considerably speeded up by employing acyl peptide esters instead of acyl peptides. The former should promote the rapid formation of the acyl-enzyme intermediate.

(Keywords: Enzymic synthesis in biphasic systems; Papain-catalyzed peptide bond formation; Peptide synthesis)

Einleitung

Die erste überschaubare enzymkatalysierte Knüpfung einer Peptidbindung beschrieben 1937 *Bergmann* und *Fraenkel-Conrat*¹ unter Verwendung der pflanzlichen Thiolprotease Papain. Bis zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Proteinbiosynthese hatte die Reversibilität proteasekatalysierter Reaktionen² starke Beachtung gefunden. Obgleich in der Folgezeit weitere Studien zur enzymatischen Synthese durchgeführt wurden³, zeichnet sich seit etwa vier Jahren ein zunehmendes Interesse an der Nutzung von Proteasen als Katalysatoren für die Synthese definierter Peptide^{3–20} ab. Bei allen bisher beschriebenen proteasekatalysierten Peptidsynthesen wurden in den überwiegenden Fällen zur Löslichkeitsverbesserung der Reaktanden bzw. zur Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Synthese der

proteasespezifischen Pufferlösung wechselnde Anteile eines mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels zugesetzt. Zur Umgehung einiger damit verbundener Nachteile haben wir eine enzymkatalysierte Peptidsynthese in einem wäßrig-organischen Zweiphasensystem beschrieben²¹, die sich sowohl für die Peptidsynthese mit löslichem Chymotrypsin²² als auch für Peptidknüpfungen mit immobilisiertem Chymotrypsin²³ bewährte. Im folgenden soll über die an einfachen Modellbeispielen erzielten Ergebnisse papainkatalysierter Kupplungsreaktionen im Zweiphasensystem berichtet werden.

Synthesen und Ergebnisse*

Die papainkatalysierten Peptidsynthesen wurden in einer 0,2 *M* *McIlwaine*-Pufferlösung (*pH* 5,5) bei 30 °C durchgeführt. Wie die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen, konnten in Abwesenheit organischer Lösungsmittelzusätze bei den Synthesen der Verbindungen **1**, **2** und **3** nur Ausbeuten zwischen 20 und 25% erzielt werden. Die Zugabe organischer Lösungsmittel, insbesondere von mit Wasser nicht mischbaren Cosolventien, führte zu einer deutlichen Ausbeutesteigerung, die sich aber in Abhängigkeit von der Art des zugesetzten Lösungsmittels und der Sequenz des Modellpeptids unterschiedlich auswirkte. Zur Aktivierung des Papains wurden stets 5% (*v/v*) 2-Mercaptoethanol den Syntheseansätzen zugefügt. Der Verzicht auf die Thiolkomponente äußerte sich, an zwei Beispielen in Tabelle 1 demonstriert, in einer signifikanten Ausbeutereduzierung. Völlig ungeeignet als Enzymaktivator für papainkatalysierte Synthesen ist Cystein-hydrochlorid.

Unsere Untersuchungen bestätigen die literaturbekannten Befunde, daß die Ausbeuten enzymkatalysierter Peptidsynthesen entscheidend von den gewählten Reaktionsbedingungen abhängen, die für jedes Syntheseobjekt einer Optimierung bedürfen, wie wir es für die beschriebenen Kupplungen weitgehend praktiziert haben. So muß in Übereinstimmung mit dem für die papainkatalysierte Hydrolyse bekannten *pH*-Optimum²⁴ von 5—7 auch für die Synthese der *pH*-Bereich von 5 bis 6,6 strikt eingehalten werden. Ferner treten beim Überschreiten bestimmter Grenzkonzentrationen für die Reaktanden ($< 0,1$ *M*) und das Enzym ($< 0,25$ *mM*; 50 *nkat*/mg) sowie beim Nichteinhalten experimentell ermittelter, definierter Lösungsmittel/Puffer-Verhältnisse deutliche Ausbeuteabfälle auf. Keinen Einfluß hatte

* Abkürzungen für Aminosäure- und Peptidderivate vgl. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *J. Biol. Chem.* **247**, 977 (1972); *Ac* = Acetyl-, *Boc* = *tert*-Butyloxycarbonyl-, *Z* = Benzyloxycarbonyl-, —*OMe* = Methylester.

dagegen die Pufferkonzentration auf den Reaktionsablauf, wie Untersuchungen bei der Synthese der Verbindung **1** mit 0,2 *M*, 0,1 *M*, 0,05 *M* und 0,005 *M* *McIlvaine*-Puffer bestätigten.

Aus ökonomischen Erwägungen wurden bei den beschriebenen Synthesen Carboxy- und Aminokomponente in äquimolaren Mengen eingesetzt. Überschüsse des nucleophilen Reaktionspartners erhöhen selbstverständlich die Umsatzraten. So konnten bei den Synthesen der

Tabelle 1. *Einfluß organischer Lösungsmittel auf die papainkatalysierte Synthese von Boc-Leu-Phe-Leu-NH₂ 1, Ac-Leu-Phe-Leu-NH₂ 2, Boc-Ile-Phe-Leu-NH₂ 3 und Boc-Phe-Phe-Leu-NH₂ 4 aus den entsprechenden N-geschützten Dipeptidsäuren und Leu-NH₂*

Lösungsmittel	°/o (v/v)	Ausbeute (°/o) bei der Synthese der Peptide:			
		1	2	3	4
<i>ohne</i>	—	25	25	20	—
Methanol	15	33	25	24	56
Chloroform	25	37	32	36	80
Nitrobenzen	25	38	35	37	78
Nitromethan	25	42	39	34	78
Essigester	15	61	49	61	74
Tetrachlor-methan	25	78 (53)*	60	43	71 (54)*

* Ausbeute ohne Zusatz von 2-Mercaptoethanol.

Verbindungen **1** und **2** in Gegenwart von 15% (v/v) Methanol durch einen zehnfachen Überschuß an Leu-NH₂ die Ausbeuten von 33 auf 83% bzw. von 25 auf 84% gesteigert werden. Der Vorteil der papainkatalysierten Synthese im wäßrig-organischen Zweiphasensystem wird dadurch besonders offenkundig, daß auch bei einem Reaktandenverhältnis von 1:1 im Vergleich zu den Umsetzungen mit 15% (v/v) Methanol deutliche Ausbeutesteigerungen (vgl. Tab. 1) resultieren.

In Übereinstimmung mit Literaturbefunden^{4,5,15,17-20} verlaufen papainkatalysierte Peptidsynthesen ausgehend von N-geschützten Aminosäuren bzw. Peptidsäuren relativ langsam. Am Beispiel der Synthese der Verbindung **1** in Gegenwart von 25% (v/v) Tetrachlormethan haben wir die Syntheserate in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt. Der in Tab. 2 bestätigte hohe Zeitbedarf veranlaßte uns, die Carboxykomponente als Alkylester einzusetzen. Für papainkatalysierte Peptidsynthesen wurden bisher — sieht man von der papainkatalysierten Oligomerisierung von Aminosäureestern²⁵ ab — stets

Tabelle 2. *Abhängigkeit der Ausbeute von der Reaktionszeit bei der papain-katalysierten Synthese von 1 in Gegenwart von 25% (v/v) Tetrachlormethan aus Boc-Leu-Phe-OH und Leu-NH₂*

Zeit (h)	1	2	3,5	5	8	20
Ausb. (%)	5	13	23	29	43	78

Tabelle 3. *Einfluß organischer Lösungsmittel und verschiedener N-Acylreste auf die papainkatalysierte Synthese von N-geschützten Tripeptidamiden aus den entsprechenden Dipeptidmethylestern Y-A-B-OMe und Leu-NH₂*

Ver- bindung	Y-A-B-	Lösungsmittel	% (v/v)	Zeit (h)	Ausbeute (%)
2	Ac-Leu-Phe-	Tetrachlormethan	25	4,5	41
1	Boc-Leu-Phe-	Tetrachlormethan	25	5	59 (29) ^a
5	Z-Leu-Phe-	Tetrachlormethan	40	4	67
		Methanol	15	4	77
6	Ac-Phe-Leu-	Tetrachlormethan	25	2,5	60 ^b
7	Z-Phe-Leu-	Tetrachlormethan	40	2	53
		Methanol	15	2	92
4	Boc-Phe-Leu-	Tetrachlormethan	40	2	94
		n-Butanol	15	2	80
		Methanol	15	2	68
		ohne	—	2	43

^a Produktausbeute bei Verwendung der N-geschützten Peptidsäure anstelle des Dipeptidmethylesters.

^b Produkt war nicht einheitlich.

carboxylunsubstituierte C-Komponenten verwendet. Da bei papain-katalysierten Hydrolysen unterhalb *pH* 6 die Bildung des Acylenzyms den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt^{26,27}, sollten im Sinne der mikroskopischen Reversibilität unserer Meinung nach Alkyl-ester durch Begünstigung der Formierung des Acyl-Enzymintermediats auch den Syntheseprozess beschleunigen. Die in Tab. 3 aufgeführten Ergebnisse unterstreichen sehr eindrucksvoll den reaktionsbeschleunigenden Effekt von N-geschützten Peptidmethylestern. Während beispielsweise die Ausbeute bei der Synthese der Verbindung **1** ausgehend von Boc-Leu-Phe-OH nach 5 h nur 29% betrug, verdoppelte sich die Umsatzrate beim Einsatz des entsprechenden Methylesters. Der Vorteil der Verwendung von Alkylestern anstelle der freien Säuren wird auch durch die Synthesen der Verbindungen **10** (vgl. Tab. 5) und **12** belegt.

Gleichzeitig werden in Tabelle 3 deutliche Ausbeuteunterschiede in Abhängigkeit vom N-Acylrest der Carboxykomponente transparent. So hat der N-Acetylrest in der P₃-Position (Notation nach *Schechter* und *Berger*²⁸) in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Tab. 1 einen negativen Einfluß auf die Umsatzrate, während die reversibel abspaltbaren Z- und Boc-Schutzgruppen den Syntheseverlauf günstiger beeinflussen. Bei den Synthesen der Verbindungen **4**, **5** und **7** (Tabelle 3) wurden in Gegenwart von 15% (v/v) Methanol bzw. *n*-Butanol teilweise höhere Ausbeuten erzielt als im Zweiphasensystem mit Tetrachlor-

Tabelle 4. *Einfluß des Lösungsmittelanteils (Tetrachlormethan) auf die Produktausbeute bei der papainkatalysierten Synthese von 4 aus Boc-Phe-Leu-OMe und Leu-NH₂ (Reaktionszeit: 2 h)*

CCl ₄ % (v/v)	0	10	25	40	50	65	75	80	90	100
Ausb. (%)	43	66	85	94	86	82	13	11	10	0

methan, obgleich dieser Effekt bei den papainkatalysierten Synthesen ausgehend von N-geschützten Peptidsäuren (vgl. Tab. 1) nicht zu beobachten war. Möglicherweise könnte man diesen Befund auf die drastisch verkürzte Reaktionszeit zurückführen, wodurch die Enzymschädigung in Puffer/Alkohol-Gemischen vermindert wird. So ist bekannt²⁴, daß die Aktivität des Papains auch durch relativ hohe Alkoholzusätze innerhalb der für Hydrolysen charakteristischen Inkubationszeit nur wenig beeinflußt wird. *Anderson* und *Luisi*²⁵ beobachteten dagegen bei der papaininduzierten Oligomerisierung von Aminosäuremethylestern einen ausbeuteerniedrigenden Effekt mit steigender Ethanolkonzentration.

Von praktischer Bedeutung für papainkatalysierte Peptidsynthesen im wäßrig-organischen Zweiphasensystem ist der ermittelte Einfluß des Anteils der organischen Komponente im Reaktionsansatz auf die Produktausbeute. Im Gegensatz zu chymotrypsinkatalysierten Peptidsynthesen im Zweiphasensystem, bei denen organische Lösungsmittelanteile bis zu etwa 90% (v/v) keinen negativen Einfluß auf die Ausbeute ausüben²⁹, wird, wie die Resultate in Tab. 4 zeigen, bei einem Anteil um 40% (v/v) Tetrachlormethan ein Ausbeutemaximum erreicht.

Um weitere Hinweise über die Rolle des Nucleophils zu erhalten, haben wir anstelle von Leu-NH₂ verschiedene Dipeptidamide einge-

setzt. Die in Tab. 5 zusammengestellten Ergebnisse lassen bei den Tetrapeptidderivaten **8** und **9**, die sowohl in Gegenwart von 15% (v/v) Methanol als auch 25% (v/v) Tetrachlormethan synthetisiert wurden, nicht mehr so deutliche Ausbeuteunterschiede erkennen, während die Verbindung **10** ausgehend vom *Boc*-Phe-Gly-OMe im Zweiphasensystem nach nur zweistündiger Reaktionszeit in 50% höherer Ausbeute erhalten werden konnte. Die Synthese des Tetrapeptids **11** mit N-terminalem Prolin in der Aminokomponente gelang nicht und bestätigt

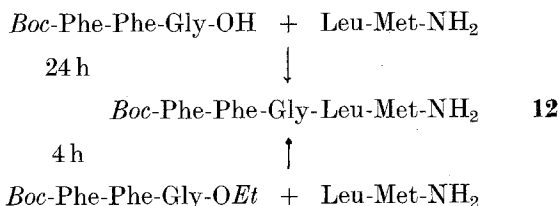
Tabelle 5. Papainkatalysierte Synthese von *Boc-Tetrapeptidamiden* aus den entsprechenden *Boc-Dipeptiden* und *Dipeptidamiden* in Gegenwart von Methanol (15%; v/v) bzw. Tetrachlormethan (25%; v/v)

	Verbindung	Zeit (h)	Ausbeute (%)	
			CH ₃ OH	CCl ₄
8	<i>Boc</i> -Phe-Leu-Leu-Phe-NH ₂	20	51	51
9	<i>Boc</i> -Phe-Leu-Leu-Met-NH ₂	20	30	40
10	<i>Boc</i> -Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂ *	2	31	63
11	<i>Boc</i> -Leu-Phe-Pro-Gly-NH ₂	20	0	0

* Anstelle von *Boc*-Phe-Gly-OH wurde der entsprechende Methylester eingesetzt.

alle literaturbekannten Versuche, nach denen eine -X-Pro-Bindung mit den bisher für die enzymatische Peptidsynthese eingesetzten Proteasen nicht geknüpft werden kann.

Die Überlegenheit von Esterderivaten als Carboxykomponenten wird abschließend am Beispiel der Synthese des Substanz P-(7-11)-pentapeptids demonstriert:



Während bei Verwendung der *Boc*-geschützten Tripeptidsäure nach 24 h die Produktausbeute kleiner als 4% war und daneben dünn-schicht-chromatographisch verschiedene Nebenprodukte nachgewiesen werden konnten, gelang die Synthese von **12** nach vierstündiger Reaktionszeit beim Einsatz des entsprechenden Ethylesters in einer Ausbeute von

78,5%. Der unbefriedigende Verlauf der zuerst geschilderten Synthesvariante könnte auf die vergleichsweise langsame Acylenzymbildung durch das *Boc*-Tripeptid zurückzuführen sein. Die somit über einen längeren Zeitraum im Reaktionsansatz gelöste Carboxykomponente kann aufgrund der Primärspezifität des Papains leicht zwischen P_2 und P_1 (-Phe-Gly-) gespalten werden, da der Phe-Rest in P_3 diesen hydrolytischen Schritt begünstigt. Weitere unkontrollierte hydrolytische und synthetische Prozesse führen schließlich zum nachgewiesenen breiten Spektrum der unerwünschten Produkte.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheiztisch nach *Boetius* bestimmt, die optischen Drehungen am Polamat A des VEB Carl-Zeiss Jena. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Silufol-Fertigplatten (Kavalier, CSSR) benutzt. Als Laufmittelsysteme dienten Chloroform/Methanol (9:1), *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) und *n*-Butanol/Eisessig/Essigester/Wasser (1:1:1:1). Papain (50 nkat/mg) wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die enzymatisch synthetisierten Verbindungen waren in mehreren Systemen dünn-schichtchromatographisch einheitlich und zeigten zutreffende Elementaranalysen.

Allgemeine Vorschrift für die papainkatalysierte Peptidsynthese

0,2 mmol Carboxykomponente (N-geschütztes Dipeptid bzw. N-geschützter Dipeptidalkylester) und 0,2 mmol Aminokomponente (Leu-NH₂ bzw. Dipeptidamid) werden in einer Mischung aus dem in den Tabellen 1, 3 bzw. 5 genannten Lösungsmittel, 0,1 ml 2-Mercaptoethanol und *McIlwaine*-Puffer (0,2 *M*; *pH* 5,5) mit einem Gesamtvolumen von 2 ml gelöst bzw. suspendiert, mit 30 mg Papain versetzt und bei 30 °C entsprechend den Angaben in den Tabellen 1, 3 bzw. 5 gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 ml 1 *N* HCl gestoppt und das ausgefallene Produkt auf eine Glasfritte gebracht. Man wäscht nacheinander mit Wasser, 0,5 *N* HCl, Wasser, 7-proz. Ammoniaklösung sowie Wasser und trocknet das erhaltene Produkt im Vak.-Exsikkator (P₂O₅). Nach dünn-schichtchromatographischer Reinheitskontrolle wird das Produkt zur Ermittlung der physikalischen Daten umkristallisiert (vgl. Tabelle 6). Diese allgemeine Arbeitsvorschrift wird nachfolgend an drei Beispielen präzisiert.

Ac-Leu-Phe-Leu-NH₂ 2

64,1 mg (0,2 mmol) *Ac-Leu-Phe-OH* und 26,0 mg (0,2 mmol) Leu-NH₂ werden in 0,5 ml Tetrachlormethan und 0,1 ml 2-Mercaptoethanol gelöst und mit einer Lösung von 30 mg Papain in 1,4 ml *McIlwaine*-Puffer (0,2 *M*; *pH* 5,5) versetzt. Nach 20 h Rühren bei 30 °C wird die Reaktion mit 2 ml 1 *N* HCl gestoppt und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Man erhält 52 mg (60%, d. Th.) 2 vom Schmp. 284—285 °C.

$C_{23}H_{36}N_4O_4$ (432,6). Ber. C 63,86, H 8,39, N 12,95.
Gef. C 63,81, H 8,74, N 12,68.

Tabelle 6. *Physikalische Daten der enzymatischen Syntheseprodukte*

Ver- bindung	umkristallisiert aus	Schmp. (°C)	$[\alpha]_D^{25}$	<i>c</i>	Lösungs- mittel
1	Essigester/ Petrolether	205—207	—48,8°	1	Ethanol
2	Ethanol/Wasser	284—285	—54,0°	1	Eisessig
3	Essigester/ Petrolether	191—193	—48,6°	0,5	Ethanol
4	Essigester/ Petrolether	220—224	—39,6°	0,5	Ethanol
5	Ethanol/ Wasser	224—226	—52,8°	0,5	Methanol
7	Ethanol/ Wasser	187—192	—37,5°	1	Ethanol
8	Ethanol/ Wasser	197—200	—35,4°	0,5	Ethanol
9	Ethanol/ Wasser	280—285 (Z)	—39,2°	0,5	Ethanol
10	Essigester/ Petrolether	194—196	—34,0°	0,5	DMF
12	DMF/Wasser	223—225	—32,7°	0,5	DMF

Boc-Phe-Leu-Leu-NH₂ **4**

78,4 mg (0,2 mmol) *Boc-Phe-Leu-OMe* und 26 mg (0,2 mmol) *Leu-NH₂* werden in 0,8 ml Tetrachlormethan und 0,1 ml 2-Mercaptoethanol gelöst und mit einer Lösung von 30 mg Papain in 1,1 ml *McIlvaine*-Puffer (0,2 *M*; *pH* 5,5) versetzt. Nach 2 h Rühren bei 30 °C wird die Reaktion durch Zugabe von 2 ml 0,5 *N* HCl gestoppt und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Zur Abtrennung nicht vollständig umgesetzten Esters wird das Rohprodukt (98 mg) mit 5 ml Tetrachlormethan gewaschen und aus Essigester/Petrolether umkristallisiert. Man erhält 92 mg (94% d. Th.) **4** vom Schmp. 220—224 °C.

$C_{26}H_{42}N_4O_5$ (490,6). Ber. C 63,64, H 8,63, N 11,42.
Gef. C 63,60, H 8,96, N 11,06.

Boc-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ **12**

99,5 mg (0,2 mmol) *Boc-Phe-Phe-Gly-OEt* und 59 mg (0,2 mmol) *HCl·Leu-Met-NH₂* werden in 0,6 ml Tetrachlormethan, 0,2 ml Essigester und 0,1 ml 2-Mercaptoethanol suspendiert und mit einer Lösung von 30 mg Papain in 1,1 ml *McIlvaine*-Puffer (0,2 *M*; *pH* 5,5) versetzt. Dem Ansatz werden 20 mg *EDTA* zugesetzt und 4 h bei 30 °C gerührt. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von 2 ml 1 *N* HCl gestoppt und der Ansatz wie oben beschrieben aufgearbeitet. Das Rohprodukt wird mit wenig Ethanol gewaschen und aus Dimethylformamid umgefällt. Man erhält 111,5 mg (78,5% d. Th.) **12** vom Schmp. 223—225 °C. Lit.³⁰ Schmp. 223—227 °C.

Literatur

- ¹ Bergmann, M., Fraenkel-Conrat, H., J. Biol. Chem. **119**, 707 (1937).
- ² Borsook, H., Advan. Protein Chem. **8**, 127 (1953).
- ³ Isowa, Y., Yuki Gosei Kagaku Kyokaishi **36**, 195 (1978); Übersicht.
- ⁴ Isowa, Y., Ohmori, M., Ichikawa, T., Kurita, H., Sato, M., Mori, K., Bull. Chem. Soc. Jap. **50**, 2762 (1977).
- ⁵ Isowa, Y., Ohmori, M., Sato, M., Mori, K., ibid. **50**, 2766 (1977).
- ⁶ Isowa, Y., Ichikawa, T., Ohmori, M., ibid. **51**, 271 (1978).
- ⁷ Isowa, Y., Ichikawa, T., ibid. **52**, 796 (1979).
- ⁸ Isowa, Y., Ohmori, M., Ichikawa, T., Mori, K., Nonaka, Y., Kihara, K., Oyama, K., Satoh, H., Nishimura, S., Tetrahedron Letters **1979**, 2611.
- ⁹ Luisi, P. L., Saltman, R., Vlach, D., Guarnaccia, R., J. Mol. Catalysis **2**, 133 (1977).
- ¹⁰ Saltman, R., Vlach, D., Luisi, P. L., Biopolymers **16**, 631 (1977).
- ¹¹ Pellegrini, A., Luisi, P. L., ibid. **17**, 2573 (1978).
- ¹² Morihara, K., Oka, T., Biochem. J. **163**, 531 (1977).
- ¹³ Oka, T., Morihara, K., J. Biochem. **82**, 1055 (1977).
- ¹⁴ Oka, T., Morihara, K., ibid. **84**, 1277 (1978).
- ¹⁵ Kullmann, W., Biochem. Biophys. Res. Commun. **91**, 693 (1979).
- ¹⁶ Widmer, F., Johansen, J. T., Carlsberg Res. Commun. **44**, 37 (1979).
- ¹⁷ Wong, C., Chen, S., Wang, K., Biochim. Biophys. Acta **576**, 247 (1979).
- ¹⁸ Chou, G., Chen, S., Wong, C., Wang, K., J. Chin. Chem. Soc. (Taipei) **25**, 215 (1978).
- ¹⁹ Tseng, M., Chen, S., Wong, C., Wang, K., Proc. Natl. Sci. Council. Repub. China **3**, 42 (1979).
- ²⁰ Chou, S., Wong, C., Chen, S., Wang, K., J. Chin. Chem. Soc. (Taipei) **26**, 11 (1979).
- ²¹ Kuhl, P., Könnecke, A., Döring, G., Däumer, H., Jakubke, H.-D., Tetrahedron Lett. **1980**, 893.
- ²² Kuhl, P., Posselt, S., Jakubke, H.-D., Pharmazie, im Druck.
- ²³ Könnecke, A., Bullerjahn, R., Jakubke, H.-D., Mh. Chem. **112**, 469 (1981).
- ²⁴ Kimmel, J. R., Smith, E. L., Enzymol. **19**, 267 (1957).
- ²⁵ Anderson, G., Luisi, P. L., Helv. Chim. Acta **62**, 488 (1979).
- ²⁶ Angelides, K. J., Fink, A. L., Biochem. **17**, 2659 (1978).
- ²⁷ Allen, G. D., Stewart, J. A., Johnson, P. E., Wettlaufer, D. G., Eur. J. Biochem. **87**, 575 (1978).
- ²⁸ Schechter, I., Berger, A., Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**, 157 (1967).
- ²⁹ Walpuski, J., Diplomarbeit, Karl-Marx-Universität Leipzig, 1980.
- ³⁰ Bienert, M., Köller, G., Wohlfeil, R., Mehlis, B., Bergmann, J., Niedrich, H., J. prakt. Chem. **321**, 721 (1980).