

116. Thyrocalcitonin IV. Die Totalsynthese des α -Thyrocalcitonins¹⁾

von **B. Riniker, M. Brügger, B. Kamber, P. Sieber** und **W. Rittel**

Chemische Forschungslaboratorien des Departments Pharmazutika der
CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel

(2. IV. 69)

Summary. The total synthesis of the hypocalcaemic hormone α -thyrocalcitonin (I) isolated from porcine thyroid glands is reported in detail. By the fragment condensation approach, using coupling procedures known to avoid racemisation, the fully protected dotriacontapeptide sequence II was synthesised. In the build up of II the disulfide ring bridge connecting the cysteine residues 1 and 7 was preformed in the protected nonapeptide fragment 1-9. Simultaneous removal by acidolysis of the nine protecting groups present in II yielded synthetic α -thyrocalcitonin (I) in a state of high purity and possessing full biological activity; the disulfide bond remained intact during the de-protection step. On repeated biological assay the synthetic preparation I in the test system of KUMAR *et al.* [2] was found to possess an activity of 130.8 U/mg peptide.

Die Gruppe der Calcitonin-Hormone (vgl. z.B. [3]) ist in den letzten Jahren intensiv bearbeitet worden, nachdem COPP *et al.* [4] 1962 die Existenz eines Blut-Calcium-senkenden Faktors, der als Gegenregulator zu Parathormon wirkt, nachweisen konnten. Kurze Zeit darauf gelang es der Gruppe von MACINTYRE [5] sowie HIRSCH *et al.* [6] aus Schweineschilddrüsen hochaktive Präparate zu isolieren. In diesen Arbeiten wurde auch die Peptidnatur des als Thyrocalcitonin bezeichneten Hormons nachgewiesen.

Im Jahre 1968 beschrieben drei Arbeitsgruppen [7] fast gleichzeitig die Strukturauflösung des Schweine-Thyrocalcitonins. Danach besitzt das Hormon die aus 32 Aminosäuren aufgebaute Sequenz I, in der die beiden Cysteinreste 1 und 7 über eine Disulfidbrücke zu einem 23-gliedrigen Ring verbunden sind.

Um eine zusätzliche Bestätigung der Resultate der Strukturauflösung zu erbringen, besonders aber um das aus natürlichen Quellen nur schwer zugängliche Hormon für biologische und klinische Versuche verfügbar zu machen, haben wir eine Synthese von I unternommen. In einer vorläufigen Mitteilung [1] wurde bereits darüber berichtet²⁾.

Im Folgenden geben wir eine ausführliche Beschreibung des Synthesewegs, der inzwischen mehrmals wiederholt wurde, und der die Herstellung von α -Thyrocalcitonin im Gramm-Maßstab ohne grössere Schwierigkeiten möglich macht.

Die verwendete Methodik hat sich auch bei der vor kurzem [9] gelungenen Synthese des menschlichen Calcitonins M bestens bewährt.

Als Aufbauprinzip diente wie bei früheren [10] Synthesen von Peptidhormonen des Hypophysenvorderlappens die Fragmentkondensationsmethode. Zum Schutz der α -Aminogruppe und der Glutaminsäureseitenkette haben wir wieder die Boc- bzw. die OBu-Gruppe verwendet, währenddem die Arginin- und Histidin-Seitenketten unge-

¹⁾ Vorläufige Mitteilung siehe [1].

²⁾ Inzwischen haben auch GUTTMANN und Mitarbeiter [8] in einer Kurzmitteilung eine Synthese von I beschrieben.

schützt blieben. Zusätzlich wurden jetzt aber alle Seitenkettenhydroxylgruppen der Serin-, Threonin- und Tyrosinreste durch Verätherung mit *t*-Butanol geschützt. Durch diese, von BEYERMAN & BONTEKOE [11] eingeführte Methode, deren Vorteile WÜNSCH [12] bei der Synthese des Glucagons nachgewiesen hat, lassen sich Nebenreaktionen bei der Kondensation grösserer Peptidfragmente merklich einschränken. In Kombination mit diesen Schutzgruppen erwies sich die Verwendung der von SIEBER & ISELIN [13] beschriebenen Bpoc-Gruppe zum intermediären Schutz der α -Aminogruppen (Serin 10 und Methionin 25) als besonders vorteilhaft.

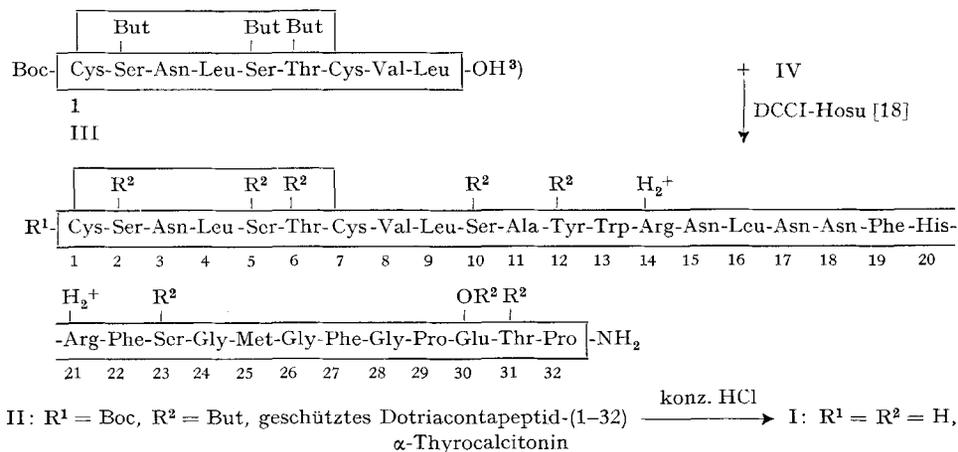


Fig. 1. Synthese von α -Thyrocalcitonin (I)⁴⁾

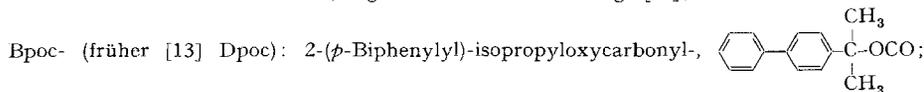
Bei allen bisherigen Synthesen (vgl. z. B. [17]) der ähnlich wie I gebauten Peptidhormone des Oxytocin- und des Vasopressin-Typs wurde der Disulfidring erst nach dem Aufbau der gesamten Peptidkette geschlossen. Im Gegensatz dazu wurde bei der hier beschriebenen Synthese der Ring bereits auf der Stufe des Nonapeptids 1–9 geschlossen und die dabei erhaltene Sequenz III zum weitem Aufbau verwendet. Die S–S-Bindung erwies sich sowohl unter den Kondensationsbedingungen als auch bei der acidolytischen Abspaltung der Schutzgruppe als beständig.

Über den Aufbau von III wird in einer separaten Arbeit berichtet [14]; eine besonders einfache Oxydationsmethode zur Herstellung von Cystinpeptiden des Typs III haben wir unlängst beschrieben [15].

Aufbau des geschützten Dotriacontapeptids 1–32 (II). – Zunächst stellte man die in den Fig. 3–6 angegebenen Aufbaufragmente V, VI, VII und X her; dazu dienten Methoden, die Racemisierung weitgehend ausschliessen (stufenweiser Aufbau, Azidkondensation, DCCI-Hosu [18]). Aus diesen 4 kleineren Fragmenten wurde sodann

³⁾ Herstellung der Sequenz 1–9 vgl. [14] [15].

⁴⁾ Zu der in dieser Arbeit benützten, abgekürzten Schreibweise vgl. [16]; insbesondere bedeuten:



Boc-: *t*-Butyloxycarbonyl-; But-: *t*-Butyl-; DCCI: Dicyclohexylcarbodiimid; Hosu: N-Hydroxysuccinimid; -ONp: *p*-Nitrophenoxy.

die Sequenz 10–32 nach dem in Fig. 2 dargestellten Plan aufgebaut. Da auch geringer Gehalt an Essigsäure in Peptidfragmenten den Erfolg von Carbodiimid-Kondensationen gefährdet, wurden die Fragmente vor der Kupplung jeweils gas-chromatographisch auf Abwesenheit von Essigsäure geprüft (vgl. exp. Teil).

Im letzten Syntheseschritt wurden dann, wie in Fig. 1 angegeben, die Fragmente 1–9 (III) und 10–32 (IV) nach der Methode von WEYGAND, HOFFMANN & WÜNSCH [18], verknüpft. Nach Gegenstromverteilung wurde II in einer Ausbeute von 61% erhalten. Dabei konnte zwar das im Rohprodukt enthaltene Methionin-sulfoxidderivat auf Grund seiner etwas grösseren Verteilungszahl abgetrennt werden, trotzdem enthielt das aus der Verteilung gewonnene II wieder Spuren dieses Nebenprodukts, das dünnschichtchromatographisch leicht nachzuweisen ist.

Aufbau der geschützten Sequenz 10–32 (IV)

Sequenz 10–13 (VII) (Fig. 3): in stufenweisem Aufbau vom Carboxylende her wurde zuerst der Tetrapeptid-methylester Bpoc-Ser(But)-Ala-Tyr(But)-Trp-OMe und daraus das Hydrazid VII dargestellt; beide Derivate sind kristallin.

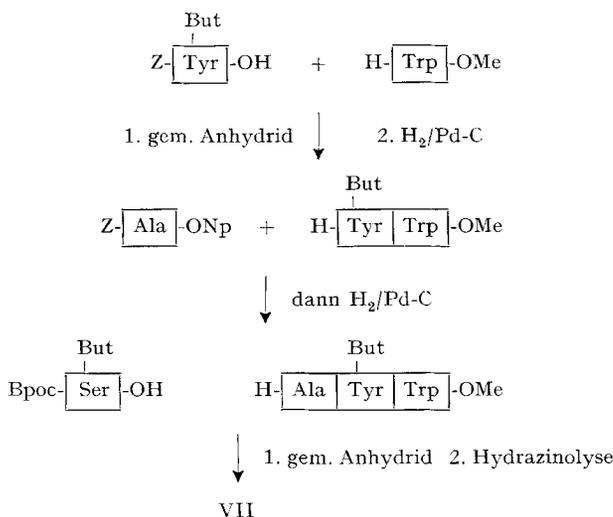


Fig. 3. Aufbau der geschützten Sequenz 10–13 (VII)

Sequenz 14–19 (V): wie in Fig. 4 dargestellt, baute man nach der Methode der geschützten Hydrazide [19], ausgehend von H-Phe-NHNH-Boc, die Kette stufenweise auf. Mit wachsender Zahl der eingebauten Asparaginreste sank die Löslichkeit der Derivate stark ab. Aus dem Hexapeptidderivat Z-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-NHNH-Boc erhielt man V durch Abspalten der Boc-Gruppe mit Trifluoressigsäure.

Sequenz 20–24 (VI) (Fig. 5): vom kristallinen Tripeptid Z-Phe-Ser(But)-Gly-OMe ausgehend, baute man stufenweise den Pentapeptid-methylester Z-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OMe auf, dessen Reinigung besonders schwierig war und multiplikative Verteilung erforderte. Zur Überführung in VI wurde vorerst die Benzyloxycarbonyl- und dann die Methylestergruppe abgespalten; wiederum musste das Produkt durch Gegenstromverteilung gereinigt werden. Das aus VI durch Trifluoressigsäure dargestellte freie Pentapeptid H-His-Arg-Phe-Ser-Gly-OH wurde durch Aminopeptidase M [20] vollständig hydrolysiert.

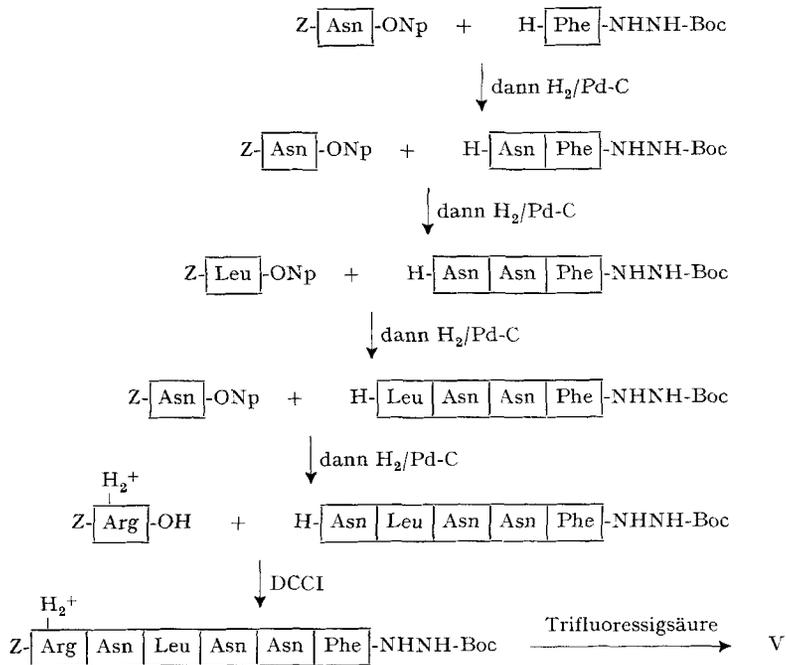


Fig. 4. Synthese der geschützten Sequenz 14-19 (V)

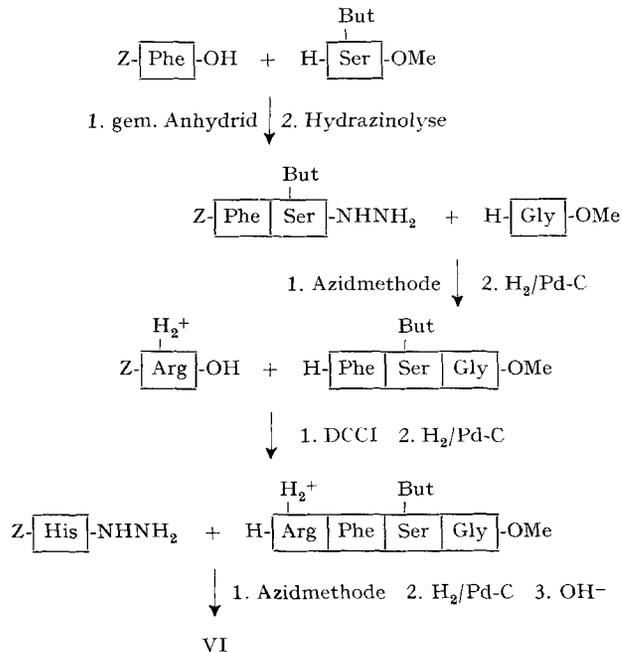


Fig. 5. Aufbau der Sequenz 20-24 (VI)

Sequenz 25–32 (X) (Fig. 6): Die Herstellung von X gelang ohne Schwierigkeiten; Kondensation von Z-Gly-Phe-Gly-Pro-OH mit dem stufenweise aufgebauten Tripeptid H-Glu(OBut)-Thr(But)-Pro-NH₂ gab das amorph, aber rein erhaltene Heptapeptid 26–32; Hydrierung und Umsatz mit Bpoc-Methionin führte zum kristallinen Bpoc-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(OBut)-Thr(But)-Pro-NH₂. Zur Überführung in X wurde die Bpoc-Gruppe nach [13] mit Monochloressigsäure abgespalten.

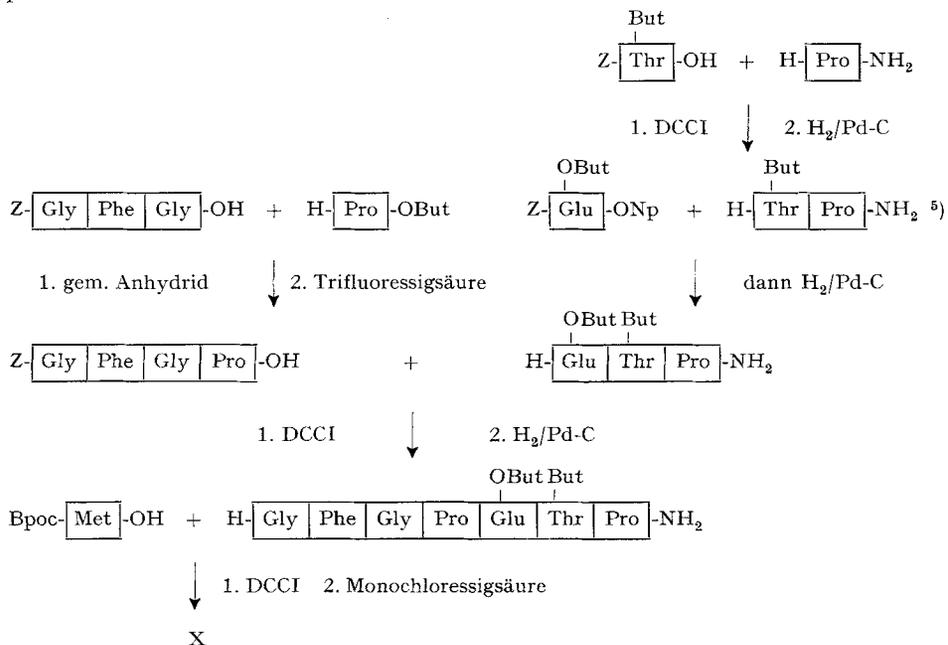


Fig. 6. Aufbau der Sequenz 25–32 (X)

Sequenz 10–32 (IV) (Fig. 2): Man führte V nach [21] in das Azid über und liess dieses mit 1,6 Äquivalenten VI reagieren, um vollständigen Umsatz dieses schwer herstellbaren Fragments zu erreichen. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen liess man nur 5 Std. reagieren. Gegenstromverteilung gab 69% des Z-Derivates von VIII; katalytische Hydrierung führte zum Undecapeptid VIII, das nach Totalhydrolyse das richtige Aminosäureverhältnis zeigte.

Dann liess man VIII mit einem fünffachen Überschuss des Tetrapeptid-azids 10–13 (aus VII nach [21] hergestellt) reagieren. Nach Gegenstromverteilung isolierte man aus dem Reaktionsgemisch die Sequenz 10–24 (IX) in 80% Ausbeute als essigsäures Salz.

Für die nachfolgende Kondensation wurde dieses in das Tosylat übergeführt, in welchem sich gas-chromatographisch keine Essigsäure mehr nachweisen liess.

Dann setzte man mittels DCCI-Hosu [18] das Tosylat von IX mit X um zum Bpoc-Derivat der Sequenz 10–32 (IV). Diese wurde durch Gegenstromverteilung gereinigt (Ausbeute 73%) und die Bpoc-Gruppe mit 80% Essigsäure entfernt. Vor weiterer Umsetzung wurde IV in das toluolsulfosaure Salz übergeführt.

Freie Sequenz 1–32 (I), α -Thyrocalcitonin. – In Vergleichsversuchen erwies sich die Abspaltung der Schutzgruppen aus II mittels konz. Salzsäure (5–10 Min. bei 0°) vorteilhafter als mittels Trifluoressigsäure. Das dabei erhaltene I war identisch mit dem bei Trifluoressigsäure-Spaltung gebildeten, zeigte aber einen höhern Reinheits-

⁵⁾ Das freie Dipeptidamid wurde wegen seiner starken Cyclisierungstendenz bei dieser Kondensation aus dem Hydrochlorid *in situ* dargestellt (vgl. exp. Teil).

grad. Ausser geringen Mengen des Methionin²⁵-Sulfoxidderivates waren dünn-schicht-chromatographisch keine Nebenprodukte nachweisbar.

Beim Verfolgen des zeitlichen Verlaufs der Acidolyse von II mit 90-proz. Trifluoressigsäure hatte sich ergeben, dass zur vollständigen Abspaltung aller Schutzgruppen merklich mehr Zeit (2–3 Std. bei Raumtemperatur) benötigt wird, als normalerweise beobachtet. Zudem treten im Zeitpunkt vollständiger Freisetzung bereits Nebenprodukte auf, die durch erhöhte elektrophoretische Mobilität gegen die Kathode charakterisiert sind. Räumliche Modelle von II zeigen, dass die *t*-Butyläthergruppe des Serinrestes 2 in unmittelbarer Nähe der Aminogruppe des Cysteinrestes 1 liegt. Diese Aminogruppe wird, wie Modellversuche zeigten [22], bei der Behandlung mit Trifluoressigsäure in wenigen Minuten von ihrem Boc-Rest befreit und liegt dann protoniert vor. Es ist anzunehmen, dass durch die Nähe dieser positiven Ladung die zur Acidolyse des *t*-Butylrestes am Serin 2 notwendige Protonierung des Äthersauerstoffatoms erschwert und damit die Abspaltung verlangsamt wird. Diese Annahme wird bestätigt durch den Vergleich der Geschwindigkeit der Schutzgruppenabspaltung aus dem cyclischen Nonapeptid 1–9 (III) und dem geschützten Calcitonin M-(1–10)-decapeptid [9] (Boc-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser (But)-Thr (But)-Cys-Met-Leu-Gly-OH). Beide Peptide sind in bezug auf ihre Schutzgruppen im Bereich des Disulfidbrings 1–7 gleich bis auf die Ser²(But)-Gruppe, die im Calcitonin M-decapeptid durch einen Glycylrest ersetzt ist. Während aus dem Decapeptid mit 90-proz. Trifluoressigsäure innert ca. 40 Minuten alle drei Schutzgruppen entfernt werden, benötigt III (wie auch II) zur vollständigen Spaltung mehr als 2 Stunden. Bei der am langsamsten abgespaltenen Gruppe muss es sich deshalb um den *t*-Butylrest am Serin 2 handeln. Ähnliche Verlangsamung acidolytischer Schutzgruppenabspaltung ist schon mehrfach beobachtet worden [23].

Über die Identifizierung des Syntheseprodukts mit natürlichem α -Thyrocalcitonin haben wir bereits berichtet [1]. Obwohl das Präparat nach Freisetzen aus der Vorstufe II bereits die volle biologische Aktivität des natürlichen Hormons aufwies, hat man eine Probe zur zusätzlichen Reinheitskontrolle multiplikativ verteilt. Dabei wanderte das Material als einheitliches Maximum, und es wurden nur Spuren von Verunreinigungen abgetrennt. Die biologische Aktivität von I vor und nach der Verteilung war gleich. Sie betrug im Test nach [2] (Vergleich mit dem Standardpräparat MRC-B) 130,8 E/mg Peptid (Mittelwert von 9 Bestimmungen; 95% Vertrauensbereich 119,6–143,0⁶).

Nach der hier beschriebenen Methode, und weitgehend unter Verwendung gleicher Aufbaufragmente, wurden auch eine Anzahl α -Thyrocalcitoninsequenzen verschiedener Kettenlänge dargestellt. Über Synthese und biologische Aktivität dieser Stoffe werden wir in Kürze berichten.

Experimenteller Teil

Die Smp. sind auf einem Apparat nach Dr. TORROLI (der Firma BÜCHI, Flawil) bestimmt und unkorrigiert; Sinter- oder Umwandlungspunkte sind in Klammern nach «Smp.» angegeben.

Literaturangaben zu den als Ausgangsmaterialien verwendeten Aminosäurederivaten finden sich bei [25].

«Übliche Aufarbeitung» bedeutet: Aufnehmen im betreffenden Lösungsmittel, Waschen (bei 0°) mit verdünnter Zitronensäurelösung, Wasser, verdünnter NaHCO₃-Lösung und Wasser, Trocknen mit Natriumsulfat, Filtrieren und Eindampfen.

⁶) Wir danken Herrn Dr. R. MAIER für die Ausführung dieser Bestimmungen und Herrn Dr. K. MULLEN für deren statistische Auswertung. Der Peptidgehalt des Präparats wurde aus der Aminosäureanalyse berechnet. Der früher für das natürliche α -Thyrocalcitonin [24] angegebene Wert von 200 E/mg beruhte auf einer einmaligen Testierung.

Katalytische Hydrierungen zur Entfernung der Benzyloxycarbonylgruppen unter «üblichen Bedingungen» bedeutet: Schütteln der im betreffenden Lösungsmittel gelösten Substanz mit 10 bis 20 Gew.-% Pd-Kohle (10% Pd) in H₂-Atmosphäre (25°, 840 Torr) unter Auffangen des entstehenden CO₂ in einem zweiten, mit KOH gefüllten Hydriergefäss. Nach Beendigung der H₂-Aufnahme Filtrieren und Eindampfen.

Zu *Gegenstromverteilungen* dienen folgende Lösungsmittelsysteme (Angaben in Volumenteilen): 1-Butanol-Essigsäure-Wasser: I = 4 + 1 + 5; II = 6 + 1 + 4; III = 11 + 2 + 8; IV = 8 + 1 + 5; Methanol-Puffer-Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff (Puffer: 19,3 g Ammonacetat, 28,6 ml Eisessig, 1 l Wasser): V = 10 + 3 + 7 + 4; VI = 10 + 3 + 6 + 5.

Chromatographische Reinheitskontrollen: Alle angegebenen Rf-Werte beziehen sich auf *Dünnschichtchromatographien*. Es wurden die folgenden Träger verwendet:

- S: Kieselgel (Fertigplatten SL 254 der Firma ANTEC, Birsfelden),
 A: Aluminiumoxid (D-O der Firma CAMAG, Muttenz, mit Zusatz von 12% Gips),
 C: Cellulose (Avicel-Fertigplatten 1440 der Firma SCHLEICHER & SCHUELL).

Die Fliessmittel hatten folgende Zusammensetzung (Volumenteile):

System 43 C	tert.-Amylalkohol-2-Propanol-Wasser	51 + 21 + 28
System 45	2-Butanol-3-proz. wässr. NH ₃	70 + 30
System 52	1-Butanol-Essigsäure-Wasser	71 + 7 + 22
System 52 A	1-Butanol-Essigsäure-Wasser	67 + 10 + 23
System 96	2-Butanol-Essigsäure-Wasser	67 + 10 + 23
System 100	Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser	62 + 21 + 6 + 11
System 101 A	1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	42 + 24 + 4 + 30
System 101 B	1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser	40 + 24 + 6 + 30
System 104	Chloroform-Methanol-17-proz. wässr. NH ₃	20 + 20 + 9
System 107	Essigester-Pyridin-Wasser	20 + 10 + 11
System 121	2-Propanol-konz. wässr. NH ₃ -Wasser	70 + 10 + 20

Die Anfärbung der Platten erfolgte mit REINDEL-HOPPE-Reagens oder spezifischen Farbreaktionen in der Ausführung nach [26].

1. Bpoc-Ser(But)-Ala-Tyr(But)-Trp-NHNH₂ (VII). – 1.1. *Z-Tyr(But)-Trp-OMe*: 24,0 g (55 mMol) *Z-Tyr(But)-OH* wurden in 200 ml Tetrahydrofuran und 7,8 ml Triäthylamin gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei –13° die Lösung von 7,2 ml (55 mMol) Chlorameisensäure-isobutylester in 100 ml Tetrahydrofuran im Verlauf von 15 Min. getropft. Man rührte die Suspension noch 15 Min. bei –10°, versetzte sie dann mit einer auf 0° gekühlten Lösung von 10,9 g *H-Trp-OMe* (50 mMol) in 200 ml Tetrahydrofuran, rührte noch eine Std. bei 0° und über Nacht bei 25°, filtrierte und dampfte das Filtrat ein. Die Lösung des Rückstands in 500 ml Essigester wurde wie üblich neutral gewaschen und eingedampft. Der Rückstand wurde an der siebenfachen Menge Kieselgel chromatographiert, wobei das Dipeptidderivat sich mit Toluol/Chloroform 1:1 eluieren liess. Das Produkt ist amorph, aber dünn-schichtchromatographisch einheitlich; Smp. 92–94°; $[\alpha]_D^{20} = +3,7^\circ$ ($c = 2,2$ in Alkohol); UV. (Alkohol): $\lambda_{max} = 274$ (6300); 281 (6400); 290 (5450) nm (ϵ); Rf(S) = 0,61 (Chloroform-Methanol 19:1).

C₃₃H₃₇N₃O₆ (571,6) Ber. C 69,33 H 6,52 N 7,35% Gef. C 69,49 H 6,69 N 7,22%

1.2. *Z-Ala-Tyr(But)-Trp-OMe*: 28,6 g *Z-Tyr(But)-Trp-OMe* wurden in 500 ml Methanol gelöst, unmittelbar vor Beginn der Hydrierung mit 50 ml 1N HCl versetzt und dann wie üblich hydriert. Im DC. war kein Ausgangsmaterial mehr nachweisbar; Rf(S) = 0,45 (Chloroform-Aceton 1:1). Das quantitativ erhaltene Produkt wurde mit 19 g *Z-Ala-ONp* und 50 ml Dimethylformamid, dann unter Rühren und leichtem Kühlen mit 6,9 ml Triäthylamin versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen mit 500 ml Essigester wurde erst bei 0° mit Kaliumcarbonatlösung das *p*-Nitrophenol ausgewaschen und dann wie üblich neutral gewaschen. Den Rückstand kristallisierte man aus Essigester-Hexan: 24,5 g (76% d. Th.); Smp. 110° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); UV. (Alkohol): $\lambda_{max} = 275$ (6100); 283 (6200); 291 (5300) nm (ϵ); Rf(S) = 0,5 (Chloroform-Aceton 1:1).

C₃₆H₄₂N₄O₇ (642,7) Ber. C 67,27 H 6,59 N 8,72% Gef. C 67,19 H 6,71 N 8,47%

1.3. *Bpoc-Ser(But)-Ala-Tyr(But)-Trp-OMe*: 16,7 g *Z-Ala-Tyr(But)-Trp-OMe* wurden in Methanol wie üblich hydriert, Ausbeute quantitativ; $Rf(S) = 0,3$ (Chloroform-Methanol 9:1). Der schaumige Rückstand wurde in 30 ml Dimethylformamid gelöst, auf 0° gekühlt und zu der wie folgt bereiteten Lösung des gemischten Anhydrids gegeben: Eine Lösung von 16,9 g *Bpoc-Ser(But)-OH-Cyclohexylaminsalz* [13] in 200 ml Essigester wurde bei 0° mit 1M Zitronensäure ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum auf ca. 40 ml eingengt. Nach Abkühlen auf –13° wurden 4,7 ml Triäthylamin und 4,45 ml Chlorameisensäure-isobutylester zugepft und 5 Min. bei –10° reagieren gelassen. Darauf wurde die obige Lösung von *H-Ala-Tyr(But)-Trp-OMe* zugegeben und die Mischung noch 2 Std. bei 0° und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Essigester wurde wie üblich aufgearbeitet: Aus Essigester-Hexan 19,1 g (83%). Zur Analyse wurde nochmals gleich kristallisiert, Smp. 148–149° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); UV-Spektrum (Feinsprit) $\lambda_{max} = 255$ nm ($\epsilon = 21000$); $Rf(S) = 0,65$ (Chloroform-Methanol 9:1).

$C_{51}H_{63}N_5O_9$ (890,1) Ber. C 68,82 H 7,13 N 7,87% Gef. C 68,89 H 7,03 N 7,90%

1.4. *Bpoc-Ser(But)-Ala-Tyr(But)-Trp-NHNH₂ (VII)*: Eine Lösung von 29,4 g *Bpoc-Ser(But)-Ala-Tyr(But)-Trp-OMe* in 160 ml Methanol wurde mit 16 ml Hydrazinhydrat versetzt und 24 Std. bei Raumtemperatur belassen. Nach Verdünnen mit 160 ml Methanol wurde langsam mit 320 ml Wasser versetzt, wobei das Produkt auskristallisierte. Nach Abnutschen, Waschen mit Methanol-Wasser 1:1 und Trocknen erhielt man 28,0 g (95%) VII. Zur Analyse wurde nochmals aus Methanol-Wasser kristallisiert, Smp: 136° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -2^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); $Rf(S) = 0,35$ (Chloroform-Methanol 9:1).

$C_{50}H_{63}N_7O_8$ (890,1) Ber. C 67,47 H 7,13 N 11,02% Gef. C 67,09 H 7,11 N 11,11%

2. *Z-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-NHNH₂ (V)*. – 2.1. *Z-Asn-Phe-NHNH-Boc*: 15,4 g *H-Phe-NHNH-Boc* [27], 21,4 g *Z-Asn-ONp* und 34 ml Dimethylformamid wurden bei Raumtemperatur gerührt. Nach kurzer Zeit bildete sich eine klare Lösung, aus der nach 30 Min. das Produkt auszufallen begann. Nach 18 Std. wurde mit viel Äther zerrieben und die Fällung abgenutscht. Durch Umfällen aus Dimethylformamid-Äther wurde das Dipeptidderivat rein erhalten, Ausbeute: 22,7 g (78%). Doppel-Smp.: 209–210° (Zers.), 235–236°. Zur Analyse wurde aus Äthanol umkristallisiert; $[\alpha]_D^{20} = -44^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); $Rf(S) = 0,55$ (Chloroform-Methanol 8:2).

$C_{26}H_{33}N_5O_7$ (527,6) Ber. C 59,19 H 6,31 N 13,28% Gef. C 58,93 H 6,38 N 13,14%

2.2. *Z-Asn-Asn-Phe-NHNH-Boc*: 29 g *Z-Asn-Phe-NHNH-Boc* wurden in Methanol wie üblich hydriert. Das Produkt ($Rf(S) = 0,15$ (Chloroform-Methanol 8:2)) wurde bei 70° in 45 ml Dimethylformamid gelöst, auf Raumtemperatur gekühlt und unter Rühren mit 23,5 g *Z-Asn-ONp* versetzt. Während kurzer Zeit bildete sich eine Lösung, nach wenigen Minuten erstarrte die Mischung. Nach 18 Std. wurde durch Zusatz von 200 ml Dimethylformamid bei 70° gelöst, und die Lösung unter Rühren in 1200 ml Äther eingetropft. Man filtrierte die entstandene, gallertige Masse ab und befreite sie von *p*-Nitrophenol durch Waschen mit Äther und Aceton. Das erhaltene Produkt (31,6 g; 90%) enthielt nach DC. noch Spuren von Verunreinigungen. Zur Analyse wurde aus Dimethylformamid-Aceton umgefällt, Smp. 243° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ ($c = 1$ in Dimethylformamid); $Rf(S) = 0,24$ (Chloroform-Methanol 8:2).

$C_{30}H_{39}N_7O_9 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ (650,7) Ber. C 55,38 H 6,20 N 15,07% Gef. C 55,28 H 6,27 N 15,39%

2.3. *Z-Leu-Asn-Asn-Phe-NHNH-Boc*: 35,8 g *Z-Asn-Asn-Phe-NHNH-Boc* wurden in Dimethylformamid wie üblich hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde eine durch kolloidal gelöstes Pd braun gefärbte Lösung erhalten. Sie wurde auf ca. 100 ml eingengt, in 1 l Äther gegossen und das ausgefallene Produkt abfiltriert: 26,5 g (94%); $Rf(S) = 0,35$ (100).

Das graue Pulver wurde bei 70° in 80 ml Dimethylformamid gelöst, bei Raumtemperatur mit 24,2 g *Z-Leu-ONp* versetzt und über Nacht stehengelassen. Die gallertig erstarrte Mischung wurde mit Äther zerrieben und abgenutscht. Umfällen aus Dimethylformamid-Äther gab 36,0 g (91%) Tetrapeptid. Zur Analyse wurde aus Dimethylformamid-Aceton umgefällt, Smp. ca. 260° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -55^\circ$ ($c = 0,6$ in Methanol); $Rf(S) = 0,45$ (Chloroform-Methanol 7:3).

$C_{36}H_{50}N_8O_{10}$ (754,8) Ber. C 57,28 H 6,68 N 14,84% Gef. C 56,60 H 6,65 N 15,09%

2.4. *Z-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-NHNH-Boc*: 36 g *Z-Leu-Asn-Asn-Phe-NHNH-Boc* wurden bei 80–90° in 800 ml Dimethylformamid gelöst und dann bei Raumtemperatur wie üblich hydriert.

Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde die braune Lösung im Hochvakuum auf ca. 170 ml eingengt, durch Eintropfen in 2,5 l Äther gefällt und die Fällung isoliert: 27,9 g (94%), Rf(S) = 0,35 (100). Das Produkt wurde bei 80° in 165 ml Dimethylformamid gelöst, bei Raumtemperatur mit 21,6 g Z-Asn-ONp versetzt und über Nacht belassen. Nach etwa 30 Min. war die Lösung gallertig erstarrt. Durch Zerreiben mit Äther wurde das Produkt nutschbar; es wurde mit Äther und Aceton gewaschen, und nochmals analog umgefällt und gewaschen: 34,2 g (88%) graues Pulver, welches nach DC. noch Spuren von Verunreinigungen enthielt; Smp. 272–273° (Zers.); Rf(S) = 0,5 (100).

2.5. *Z-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-NHNH-Boc·HCl*: 34,2 g Z-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-NHNH-Boc wurden bei 90° in 850 ml Dimethylformamid gelöst und bei Raumtemperatur wie üblich hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde das braune Filtrat im HV. auf etwa 500 ml eingengt und mit 23,6 g Z-Arg-OH sowie 21,4 ml 3,6N HCl in Dioxan versetzt. Dann gab man 17,4 g DCCI zu und belies 24 Std. bei Raumtemperatur. Zur Abtrennung von kolloidal gelöstem Pd gab man 10 g Kohle zu, nutschte ab und dampfte das Filtrat im HV. auf ca. 250 ml ein. Nach Eintropfen in 2 l Äther wurde die Fällung abfiltriert und mit Äther gewaschen. Das Rohprodukt wurde in 270 ml warmem Dimethylformamid gelöst und bei Raumtemperatur mit 2,5 l 10-proz. Kochsalzlösung gefällt. Die flockige Fällung nutschte man ab. Nach Waschen mit 10-proz. Kochsalzlösung löste man das noch feuchte Material in 1 l Dimethylformamid und entwässerte durch Einengen auf das halbe Volumen. Man nutschte das ausgefallene NaCl ab und gab zum Filtrat 2,4 l Acetonitril. Die flockige Fällung wurde abgenutscht und mit Acetonitril gewaschen: 33,6 g (82%). Zur Analyse fällt man zweimal aus Dimethylformamid-Acetonitril um, Smp. 239–241° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -34^\circ$ ($c = 0,5$ in Dimethylformamid); Rf(S) = 0,25 (100).

$C_{46}H_{68}N_{14}O_{13} \cdot HCl \cdot 1/2 H_2O$	Ber. C 50,75	H 6,67	N 18,02	Cl 3,26%
(1088,6)	Gef. ,, 50,73	,, 6,57	,, 18,38	,, 3,08%

2.6. *Z-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-NHNH₂·(HCl, CF₃COOH) (V)*: 31,8 g Z-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-NHNH-Boc·HCl wurden unter Rühren bei 0° in 150 ml 90-proz. Trifluoressigsäure eingetragen. Die Lösung wurde 20 Min. auf 20° erwärmt. Dann goss man in 1,5 l eiskalten Äther, nutschte die Fällung ab und wusch mit Äther nach. Das Rohprodukt rührte man 30 Min. mit 300 ml Dimethylformamid, wobei der grösste Teil in Lösung ging, und fällte wieder mit Äther aus. Die abgenutschte Fällung wurde 1 Std. bei 25° mit 1,5 l Isopropanol gerührt, dann wurde das unlösliche Produkt abgenutscht und mit Isopropanol und Äther gewaschen: 26,7 g (93%). Smp. 234–235° (Zers.); Rf(S) = 0,38 (96). Die Substanz liegt als nicht eindeutig definiertes Gemisch des Chlorid- und Trifluoracetatsalzes vor. Aus seinem N-Gehalt (gef. 19,1%; ber. für das freie Peptidderivat $C_{41}H_{60}N_{14}O_{11}$: 21,21%) berechnet sich ein Peptidgehalt von 90%; titrimetrische Bestimmungen der Säuren ergaben einen relativen Gehalt von 96 Mol.-% Cl⁻ und 7 Mol.-% CF₃COO⁻.

3. **H-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OH (VI)**. – 3.1. *Z-Phe-Ser(But)-OMe*: 27,0 g (90 mMol) Z-Phe-OH und 12,5 ml (90 mMol) Triäthylamin wurden in 250 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, bei –18° mit 14,7 ml Chlorameisensäure-isobutylester (112,5 mMol, 1,25 Äq.) und nach 30 Min. bei –18° mit der auf –10° vorgekühlten Suspension von 18,1 g H-Ser(But)-OMe·HCl (85,5 mMol, 0,95 Äq.) in 360 ml Tetrahydrofuran versetzt. Unmittelbar darauf wurde eine Lösung von 15,0 ml (108 mMol) Triäthylamin in 100 ml Tetrahydrofuran zugetropft. Man liess drei Std. bei –10° und über Nacht bei Raumtemperatur rühren, engte dann im Vakuum ein und arbeitete in Essigester in üblicher Weise auf. Das Rohprodukt kristallisierte man bei 0° aus 200 ml Essigester-Hexan 1:1 um: 26,8 g kugelige Drusen vom Smp. 92,5–94,0°; $[\alpha]_D^{20} = +3^\circ$ ($c = 2,2$ in Äthanol); Rf(S) = 0,70 (Chloroform-Methanol 95:5).

$C_{26}H_{32}N_2O_6$ (456,5)	Ber. C 65,77	H 7,07	N 6,14%	Gef. C 65,85	H 7,10	N 6,27%
------------------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

3.2. *Z-Phe-Ser(But)-NHNH₂*: Man löste 15,3 g (33,6 mMol) Z-Phe-Ser(But)-OMe in 150 ml Methanol und gab bei 2° 16,4 ml (336 mMol) Hydrazinhydrat zu. Nach 95 Std. bei 2° hatte sich ein dicker Kristallkuchen gebildet. Nach Abnutschen, Einengen des Filtrates und Abnutschen einer zweiten Fraktion erhielt man 13,5 g (88%) vom Smp. 158–160°; $[\alpha]_D^{20} = +16^\circ$ ($c = 2,3$ in Essigsäure); Rf(S) = 0,27 (Chloroform-Methanol 19:1).

$C_{24}H_{32}N_4O_5$ (456,5)	Ber. C 63,14	H 7,07	N 12,27%	Gef. C 63,02	H 6,86	N 12,37%
------------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

3.3. *Z-Phe-Ser(But)-Gly-OMe*: 18,4 g (40,4 mMol) Z-Phe-Ser(But)-NHNH₂ wurden in 100 ml Dimethylformamid gelöst und bei –20° mit 41,6 ml (101 mMol) 2,43N HCl in Äther versetzt. Man

gab 7,15 ml *t*-Butylnitrit in 60 ml Dimethylformamid zu und belies 10 Min. bei -10° . Dann wurde eine Lösung von 14,0 ml (101 mMol) Triäthylamin in 60 ml Dimethylformamid zutropft und danach 8,85 g (70 mMol) H-Gly-OMe-hydrochlorid eingetragen. Innert 10 Min. gab man weitere 16,8 ml (121 mMol) Triäthylamin zu, liess drei Std. bei 0° und 18 Std. bei 25° stehen, engte sodann ein und arbeitete in Essigester wie üblich auf. Das Produkt kristallisierte aus Essigester-Äther (bei 0°). Ausbeute 14,7 g, Smp. $140-141^{\circ}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +13^{\circ}$ ($c = 2,3$ in Essigsäure); Rf(S) = 0,72 (43C).

$\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7$ (513,5) Ber. C 63,14 H 6,87 N 8,18% Gef. C 63,43 H 6,89 N 8,34%

3.4. *H-Phe-Ser(But)-Gly-OMe*: 7,4 g (14,4 mMol) *Z-Phe-Ser(But)-Gly-OMe* wurden in 300 ml Methanol wie üblich hydriert. Man erhielt 5,4 g (99%) farbloses Öl; Rf(S) = 0,26 (Chloroform-Methanol 95:5). Das *Tosylat* wurde aus Essigester kristallin erhalten, Smp. $161-163^{\circ}$ (Zers.); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +18^{\circ}$ ($c = 2,0$ in Äthanol).

$\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ (551,6) Ber. C 56,61 H 6,76 N 7,62% Gef. C 56,54 H 6,90 N 7,68%

3.5. *Z-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OMe-HBr*: 5,3 g (17,3 mMol) *Z-Arg-OH* wurden in 40 ml Dimethylformamid bei -19° unter Zugabe von 5,9 ml 3,0N HBr (18 mMol) in Methanol gelöst, dann wurden 5,6 g (14,4 mMol) *H-Phe-Ser(But)-Gly-OMe* zugegeben. Nach Zusatz einer Lösung von 3,85 g (18,7 mMol) DCCI in 5 ml Methylenchlorid rührte man 3 Std. bei 0° und 18 Std. bei 25° . Nach Wiederabkühlen auf 0° nutschte man den Dicyclohexylharnstoff ab, dampfte das Filtrat zur Hälfte ein und goss es in 600 ml Äther. Die erhaltene Fällung wurde abgenutscht und nochmals aus Methanol-Äther umgefällt. Das Produkt war aber nach Dünnschichtchromatographie noch nicht ganz rein; Rf(S) = 0,48 (52), 0,54 (100), 0,42 (43C); Rf(C) = 0,81 (45).

3.6. *H-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OMe·(HCl, HBr)*: 6,3 g (8,5 mMol) *Z-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OMe-HBr* wurden in 350 ml Methanol unter Zusatz von 2,9 ml 3,1N HCl (8,9 mMol) in Dioxan in üblicher Weise hydriert. Das erhaltene Produkt wurde zweimal aus Methanol-Äther umgefällt: 5,4 g (98%) farbloses Pulver; Rf(S) = 0,38 (96), 0,13 (100); Rf(C) = 0,58 (45).

3.7. *Z-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OMe·CH₃COOH*: Zu einer Lösung von 10,0 g (33,0 mMol) *Z-His-NHNH₂* in 80 ml Dimethylformamid und 33,0 ml 3,0N HCl (99,0 mMol) in Dioxan tropfte man bei -10° 4,56 ml (39,6 mMol) *t*-Butylnitrit in 14 ml Dimethylformamid und rührte 10 Min. bei -10° . Dann wurden 13,8 ml (99,0 mMol) Triäthylamin in 40 ml Dimethylformamid so zutropft, dass die Temperatur nicht über -10° stieg. Die Mischung wurde nun in eine vorgekühlte Lösung von 10,1 g (15,5 mMol) *H-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OMe·(HBr, HCl)* in 110 ml Dimethylformamid gegossen. Dann gab man 3,45 ml (24,8 mMol) Triäthylamin zu und rührte 3 Std. bei 0° und 13 Std. bei 24° . Nach Abfiltrieren von ungelöstem Material dampfte man im Vakuum auf etwa 100 ml ein und goss die Lösung in 1 l Essigester. Von der entstandenen Fällung dekantierte man ab. Das Rohprodukt unterwarf man einer Gegenstromverteilung im System II (Phasenvolumen 25 ml). Nach 430 Schritten befand sich das Produkt in den Gefässen 170–210 ($r_{\text{max}} = 190$, $K = 0,79$). Diese Fraktionen wurden vereinigt und aus Methanol-Äther gefällt. Man erhielt ein Pulver vom Smp. $(76) 115-120^{\circ}$ (Zers.), Ausbeute: 9,1 g; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9^{\circ}$ ($c = 2$ in Dimethylformamid). Die hygroskopische Substanz war dünnschichtchromatographisch einheitlich, Rf(S) = 0,37 (43C), 0,23 (52A), 0,45 (96).

3.8. *H-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OMe·2 CH₃COOH*: 2,51 g (2,9 mMol) *Z-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OMe·CH₃COOH* wurden in 300 ml Methanol-Essigsäure (9:1) wie üblich hydriert. Man fällte das Produkt mehrmals aus Methanol-Äther um. Zur Reindarstellung chromatographierte man eine Probe an einer Säule (2×30 cm) von Sephadex CM-25, wobei man mit einem linearen Gradienten von 0,05 bis 0,5M Ammoniumacetatlösung (pH = 6,0) eluierte. Die mit einer Konzentration von etwa 0,3M eluierten Fraktionen enthielten reine Substanz; nach Absublimation des Ammoniumacetats bei $40^{\circ}/0,01$ Torr, Smp. (80) $138-145^{\circ}$ (Zers.); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +16^{\circ}$ ($c = 2$ in Eisessig); Rf(S) = 0,10 (96), 0,43 (101A), 0,31 (104).

3.9. *H-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OH (VI)*: 2,84 g (3,3 mMol) *H-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OMe·2CH₃COOH* wurden in 40 ml Wasser gelöst und 15 ml 2N wässriger Piperidinlösung zugegeben. Nach 15 Min. versetzte man mit 15 ml 2N Essigsäure und lyophilisierte die Lösung. Aus dem Lyophilisat wurde im Hochvakuum bei 60° das Piperidinacetat teilweise abgetrieben. Dann fällte man aus Methanol-Essigester zweimal um: 2,0 g (91%) Pulver vom Smp. $194-200^{\circ}$ (Zers.). Nach

DS. sind noch Nebenprodukte anwesend. Das Produkt wurde durch multiplikative Verteilung über 400 Schritte im System III gereinigt ($K = 0,17$); $Rf(S) = 0,45$ (101 B), $0,47$ (121), $0,53$ (104); $Rf(C) = 0,48$ (45), $0,36$ (96), $0,80$ (121).

3.10. *H-His-Arg-Phe-Ser-Gly-OH*: 17 mg VI wurden in 0,5 ml 90-proz. Trifluoressigsäure 1 Std. bei 25° belassen. Dann fällte man mit Äther, nutschte ab, löste in 5-proz. Essigsäure, eluierte über eine Säule Amberlite CG-45 (Acetatform) und lyophilisierte das Eluat; $Rf(S) = 0,26$ (101 B), $0,27$ (121), $0,28$ (104); $Rf(C) = 0,25$ (45). – Aminosäureanalyse des Hydrolysats mit Aminopeptidase M [20] (Werte der Totalhydrolyse mit 6 N HCl (24 Std. 110°) in Klammern): Arg 1,07 (0,97), His 1,05 (0,97), Ser 1,03 (0,82), Phe 1,00 (1,04), Gly (Bezugswert) 1,00 (1,00).

4. H-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(OBut)-Thr(But)-Pro-NH₂ (X). – 4.1. *Z-Thr(But)-Pro-NH₂*: 3,1 g *Z-Thr(But)-OH* und 1,14 g *H-Pro-NH₂* wurden bei 0° in 45 ml Acetonitril gelöst, mit 2,27 g DCCl versetzt und eine Std. bei 0° und 18 Std. bei 25° gerührt. Dann kühlte man wieder auf 0° ab, nutschte den Dicyclohexylharnstoff ab und dampfte das Filtrat ein. Der Rückstand wurde in Essigester gelöst und wie üblich neutral gewaschen. Man fällte das Rohprodukt aus Benzol-Hexan um: 3,15 g amorphes Pulver, das noch ca. 3% Dicyclohexylharnstoff enthält; $[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$ ($c = 1,6$ in Methanol); $Rf(S) = 0,29$ (Toluol-Aceton 1:1), $0,67$ (45), $0,64$ (52).

4.2. *H-Thr(But)-Pro-NH₂·HCl*: 2,03 g (5 mMol) *Z-Thr(But)-Pro-NH₂* wurden in 70 ml Methanol unter Zugabe von 5 ml 1 N HCl wie üblich hydriert. Man kristallisierte aus Äthanol-Äther: 1,24 g Dipeptidhydrochlorid (kristallwasserhaltig), Smp. 168° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -39^\circ$ ($c = 1,8$ in Methanol); $Rf(S) = 0,22$ (43 C), $0,43$ (45), $0,20$ (52).

$C_{13}H_{25}N_3O_3 \cdot HCl \cdot \frac{1}{2}H_2O$	Ber. C 49,28	H 8,59	N 13,26	Cl 11,19%
(316,8)	Gef. „ 49,21	„ 8,73	„ 13,29	„ 11,57%

Wurde die obige Hydrierung ohne Zusatz von Salzsäure vorgenommen, so erhielt man nach Aufarbeitung ein Gemisch von *H-Thr(But)-Pro-NH₂* und dessen Diketopiperazin *cyclo-(Thr(But)-Pro-)*; $Rf(S) = 0,64$ (45), $0,32$ (52).

4.3. *Z-Glu(OBut)-Thr(But)-Pro-NH₂*: Zu einer Suspension von 7,1 g *Z-Glu(OBut)-ONp* und 4,3 g fein gepulvertem *H-Thr(But)-Pro-NH₂·HCl· $\frac{1}{2}H_2O$* in 10 ml Dimethylformamid wurden während 1 Std. bei 20° 1,94 ml Triäthylamin getropft. Nach Rühren über Nacht gab man Essigester und Wasser bis zur vollständigen Lösung zu, extrahierte die Essigesterlösung zuerst bei 0° mit 0,2 N NaOH und wusch sie dann wie üblich neutral. Der kristalline Rückstand wurde aus Essigester-Hexan umkristallisiert: 6,5 g Tripeptidderivat vom Smp. 164–165°; $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ ($c = 0,94$ in Methanol); $Rf(S) = 0,70$ (43 C), $0,77$ (52).

$C_{30}H_{46}N_4O_8$ (590,7)	Ber. C 61,00	H 7,85	N 9,49%	Gef. C 60,59	H 7,90	N 9,57%
------------------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

4.4. *H-Glu(OBut)-Thr(But)-Pro-NH₂*: 4,4 g *Z-Glu(OBut)-Thr(But)-Pro-NH₂* wurden in 120 ml Methanol wie üblich hydriert. Der kristalline Rückstand wurde aus Essigester-Hexan umkristallisiert: 3,1 g, Smp. 165–167°; $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ ($c = 1,1$ in Chloroform); $Rf(S) = 0,50$ (Chloroform-Methanol 9:1).

$C_{22}H_{40}N_4O_6$ (456,6)	Ber. C 57,87	H 8,83	N 12,27%	Gef. C 57,69	H 8,79	N 12,14%
------------------------------	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

4.5. *Z-Gly-Phe-Gly-Pro-OBut*: 18,0 g *Z-Gly-Phe-Gly-OH* [28] und 5,8 ml Triäthylamin wurden in 120 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, auf –20° gekühlt und durch Zutropfen von 5,4 ml Chlorameisensäure-isobutylester zum gemischten Anhydrid umgesetzt. Man rührte 10 Min. bei –10° und gab dann eine eiskalte Lösung von 8,55 g *H-Pro-OBut* in 30 ml Dimethylformamid zu. Die Mischung wurde eine Std. bei 0° und 18 Std. bei 20° gerührt, hierauf vom ausgeschiedenen Triäthylammoniumchlorid befreit und im Vakuum eingengt. Den öligen Rückstand löste man in Essigester und wusch wie üblich neutral. Das Rohprodukt kristallisierte man zweimal aus Essigester-Hexan: 16,0 g, Smp. ca. 75–80°; $Rf(S) = 0,68$ (43 C), $0,70$ (52), $0,47$ (Chloroform-Methanol 9:1).

$C_{30}H_{38}N_4O_7$ (566,6)	Ber. C 63,59	H 6,76	N 9,89%	Gef. C 63,74	H 7,03	N 10,01%
------------------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	----------

4.6. *Z-Gly-Phe-Gly-Pro-OH*: 15 g *Z-Gly-Phe-Gly-Pro-OBut* wurden in 150 ml 90-proz. Trifluoressigsäure gelöst und 20 Min. bei 22° belassen. Dann dampfte man bei 25° im Vakuum bis zur öligen Konsistenz ein, zerrieb den Rückstand mit Eiswasser, dekantierte und trocknete im Hochvakuum bei 30°. Nach Zerreiben mit Äther-Hexan 1:1, Abfiltrieren und Trocknen über KOH er-

hielt man 12,5 g amorphes Pulver vom Smp. ca. 90–100°; $[\alpha]_D^{20} = -68^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); Rf(S) = 0,22 (43C), 0,30 (45), 0,39 (52).

$C_{26}H_{30}N_4O_7$ (510,5) Ber. N 10,98 O 21,94% Gef. N 10,80 O 22,21%

4.7. *Z-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(O But)-Thr(But)-Pro-NH₂*: 4,47 g *Z-Gly-Phe-Gly-Pro-OH* und 3,0 g *H-Glu(O But)-Thr(But)-Pro-NH₂* wurden in 40 ml Acetonitril gelöst und bei 20° mit 1,76 g DCCI versetzt. Es fiel sofort Dicyclohexylharnstoff aus, der nach 15 Std. abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde zur Trockene eingengt und der Rückstand in Essigester wie üblich neutral gewaschen. Zur Reinigung fällte man mehrmals aus Essigester-Petroläther: 4,9 g amorphes Pulver; Rf(S) = 0,58 (43C), 0,56 (52), 0,65 (100), 0,55 (Chloroform-Methanol 8:2).

4.8. *H-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(O But)-Thr(But)-Pro-NH₂*: 3,26 g *Z-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(O But)-Thr(But)-Pro-NH₂* wurden in 60 ml Methanol wie üblich hydriert. Man fällte den Rückstand aus Benzol-Petroläther: 2,65 g amorphes Pulver; Rf(S) = 0,27 (43C), 0,24 (52), 0,19 (100), 0,11 (Chloroform-Methanol 8:2).

4.9. *Bpoc-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(O But)-Thr(But)-Pro-NH₂*: 3,72 g *Bpoc-Met-OH*⁷⁾, 5,21 g *H-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(O But)-Thr(But)-Pro-NH₂* und 1,98 g DCCI wurden in 30 ml Acetonitril unter Stickstoff über Nacht bei 30° gerührt. Zum Lösen des teilweise auskristallisierten Octapeptides wurden 45 ml Methanol zugefügt, die Mischung auf 40° erwärmt und vom unlöslichen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand in Essigester gelöst und bei 0° wie üblich neutral gewaschen. Das amorphe Rohprodukt wurde zweimal aus Essigester-Petroläther umgefällt und anschliessend aus Essigester-Hexan kristallisiert: 6,3 g vom Smp. 178–180° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -59^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); Rf(S) = 0,60 (43C), 0,62 (52), 0,30 (Chloroform-Methanol 9:1).

$C_{61}H_{85}N_9O_{13}S$ Ber. C 61,86 H 7,23 N 10,64 S 2,71%
(1184,5) Gef. „ 61,58 „ 7,20 „ 10,61 „ 2,83%

4.10. *H-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(O But)-Thr(But)-Pro-NH₂ (X)*: 3 g *Bpoc-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(O But)-Thr(But)-Pro-NH₂* wurden in 35 ml Methylenchlorid gelöst und mit 28 ml 75-proz. Monochloressigsäure versetzt. Nach 10 Min. wurden 170 ml eiskalte 2N Sodalösung zugegeben, das ausgeschiedene Peptid mit 1-Butanol-Essigester (1:1) extrahiert und die organische Phase mit Wasser neutral gewaschen. Das beim Einengen zur Trockne erhaltene Rohprodukt wurde zweimal aus Essigester-Hexan umgefällt und ergab 1,93 g amorphes Pulver. Rf(S) = 0,45 (43C), 0,26 (52), 0,27 (100).

5. H - Arg - Asn - Leu - Asn - Asn - Phe - His - Arg - Phe - Ser (But) - Gly - OH · CH₃COOH (VIII). – 5.1. *Z-Derivat*: 6,7 g *Z-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-NHNH₂* wurden bei 80° in 100 ml 90-proz. Dimethylformamid suspendiert, bei 0° mit 4,5 ml 3,6N HCl in Dioxan versetzt und dann bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Lösung gerührt. Bei –15° wurden sodann 0,95 ml *t*-Butylnitrit zugetropft und 20 Min. bei –10° gerührt. Das Azid fällte man durch Eingiessen in 900 ml Äther von –20° als Öl. Durch zweimaliges Zerreiben mit Äther bei –20° erhielt man ein Pulver, das man nach Abdampfen des Äthers im Vakuum bei –20° kurze Zeit trocknete. Das Azid wurde darauf in 64 ml Dimethylformamid bei –10° gelöst, mit 2,56 g *H-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OH* (VI) und 1,8 ml Triäthylamin versetzt und die Mischung 5 Std. bei 0° gerührt. Während dieser Zeit wurde durch portionenweise Zugabe von wenig Triäthylamin ein pH-Wert von 7–8 eingestellt. Nach Abfiltrieren des Triäthylammoniumchlorids fällte man durch Eintropfen in 800 ml Äther und löste nach Abgiessen der Ätherlösung den Rückstand in 100 ml Methanol. Dann fällte man erneut mit Äther. Das Rohprodukt (8,3 g) wurde durch multiplikative Verteilung (25 ml Phasenvolumen) im System I gereinigt. Nach 770 Verteilungsschritten wurde das reine Produkt aus den Verteilungselementen 192–230 ($K = 0,48$) erhalten. Diese Fraktionen wurden vereinigt, im Vakuum bei 40° auf ein kleines Volumen eingengt und nach Zugabe von *t*-Butanol lyophilisiert: 3,97 g (69%); Rf(S) = 0,56 (101B), 0,07 (104); Rf(C) = 0,37 (45), 0,85 (104); Rf(A) = 0,45 (121).

5.2. *VIII*: 3,97 g des unter 5.1. erhaltenen *Z-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OH·CH₃COOH* wurden in 900 ml 80-proz. Dimethylformamid wie üblich hydriert. Die

⁷⁾ Aus dem kristallinen Dicyclohexylaminsalz [13] hergestellt durch Aufnehmen in Essigester und Extrahieren mit 5-proz. Zitronensäurelösung.

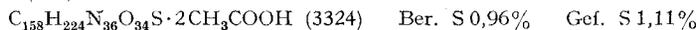
nach Abnutzen des Katalysators erhaltene, braune Lösung wurde im Hochvakuum bei 40° auf 50 ml eingengt und direkt für die nächste Stufe verwendet.

Eine Probe wurde zur Trockene verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst, das ausgefallene Pd abzentrifugiert und die farblose Lösung lyophilisiert. Rf(S) = 0,42 (101 B), 0,34 (101 A); Rf(C) = 0,27 (45); Rf(A) = 0,51 (52 A), 0,27 (121). Aminosäure-Analyse (Hydrolyse 20 Std., 110°, 6 N HCl) (ber. Werte in Klammern): Arg 2,05 (2), Asp 3,14 (3), Gly (Bezugswert) 1,00 (1), His 0,91 (1), Leu 0,96 (1), Phe 1,97 (2), Ser 0,91 (1), NH₃ 4,11 (3).

6. Bpoc-Ser(But)-Ala-Tyr(But)-Trp-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-OH·2 TosOH (IX). – 10,6 g Bpoc-Ser(But)-Ala-Tyr(But)-Trp-NHNH₂ wurden in 210 ml Dimethylformamid gelöst. Bei –30° gab man 8,4 ml 3,6 N HCl in Dioxan und anschliessend 1,74 ml *t*-Butylnitrit zu und liess 15 Min. bei –15° stehen. Dann wurden unter guter Kühlung 25 ml 2 N Natriumcarbonatlösung zugegossen bis das pH 6–7 betrug. Das Azid wurde mit 300 ml Eiswasser gefällt und abgenutscht. Das feuchte Azid⁸⁾ wurde unter Rühren in die oben erhaltene, auf 0° gekühlte Lösung von VIII eingetragen, mit 60 ml Dimethylformamid und 27 ml Essigester nachgewaschen und das pH durch Zugabe von etwas Triäthylamin auf ca. 7–8 eingestellt. Man rührte 4 Std. bei 0° und fällte mit 600 ml Äther aus. Das zuerst ölig anfallende Produkt wurde nach zweimaligem Ausrühren mit je 600 ml Äther fest. Man löste in 80 ml Methanol-Dimethylformamid = 4:1 und fällte wieder mit Äther aus, wobei man ein pulvriges Produkt erhielt. Dieses wurde durch Gegenstrom-Verteilung über 250 Stufen im System V gereinigt. Die Elemente 120–200 enthielten das reine Produkt, *K* = 1,5. Diese Phasen wurden vereinigt, im Vakuum bei 40° auf ein kleines Volumen eingengt und dann nach Zusatz von viel *t*-Butanol lyophilisiert⁹⁾. Das Produkt war chromatographisch einheitlich, Ausbeute 4,6 g (80% ber. als Monoacetat). Rf(S) = 0,25 (45), 0,55 (101 A), 0,45 (107).

Zur Überführung in das Ditosylat wurden 3,0 g des obigen Produkts in 45 ml Pyridin bei 40° grösstenteils gelöst, bei 0° mit einer Lösung von 475 mg *p*-Toluolsulfonsäurehydrat in Pyridin versetzt und im Vakuum eingedampft. Nach nochmaligem Eindampfen mit Pyridin wurde der Rückstand in Wasser und *t*-Butanol gelöst und lyophilisiert. Nach Zerreiben mit Äther wurden 3,18 g (95%) des Ditosylats von IX erhalten, welches sich nach Dünnschichtchromatographie als unverändert erwies; gas-chromatographisch¹⁰⁾ war keine Essigsäure nachweisbar.

7. H-Ser(But)-Ala-Tyr(But)-Trp-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(OBut)-Thr(But)-Pro-NH₂-tritosylat (IV). – 7.1. *Bpoc-Derivat*: 3,13 g IX-Ditosylat, 1,8 g X und 275 mg Hosu wurden unter N₂ bei 45° in 16 ml Dimethylformamid gelöst, mit 370 mg DCCI versetzt und das Ganze 12 Std. bei 45° gerührt. Das durch Ausfällen mit Äther erhaltene Rohprodukt wurde durch Gegenstromverteilung über 270 Stufen im System VI gereinigt. Die in den Elementen 116–178 enthaltene reine Substanz (*K* = 1,25) wurde, wie bei IX beschrieben, gewonnen; 2,9 g (73%). UV.-Spektrum (Feinsprit): λ_{max} = 259 nm; aus der Extinktion (ε_{ber.} = 21 000) berechnet sich der Peptidgehalt zu 91%. Rf(S) = 0,25 (52 A); 0,42 (96), 0,52 (107).



7.2. *Tritosylat von IV*: 2,84¹⁾g des unter 7.1. erhaltenen Bpoc-Derivates wurden unter N₂ in 200 ml 50-proz. Essigsäure gelöst und 5^{1/2} Std. bei 25° belassen. Nach Eindampfen im HV. bei 30° wurde der Rückstand in 160 ml 90-proz. Pyridin gelöst und mit 470 mg Toluolsulfonsäurehydrat versetzt. Dann dampfte man im HV. bei 30° zur Trockene ein. Nach nochmaligem Lösen in 90-proz. Pyridin und Eindampfen wurde der Rückstand in 20 ml Wasser und 30 ml *t*-Butanol gelöst und lyophilisiert. Das Lyophilisat fällte man aus Dimethylformamid-Äther um. Die flockige Fäl-

⁸⁾ Eine 0,1 M Lösung des Azids in Dimethylformamid zeigte erst nach 4 Tagen bei –5° eine geringe Bande des Isocyanates (2235 cm⁻¹) im IR.-Spektrum; zur Hauptsache lag noch das Azid vor (starke Bande bei 2140 cm⁻¹).

⁹⁾ Trotz der Anwesenheit von Essigsäure beobachtete man keine Abspaltung der Bpoc-Gruppe; in Gegenwart von Lösungsmitteln wie Methanol oder *t*-Butanol ist die Abspaltungsgeschwindigkeit verschwindend klein.

¹⁰⁾ Man injizierte 1–2 μl einer 10-proz. Lösung in Dimethylformamid-Wasser (9:1, enthaltend 0,1% Dioxan als interner Standard) auf eine Porapak-Q-Säule (2 × 1900 mm) (Gas-Chromatograph Typ 1520 FID der Fa. AEROGRAPH). Nachweisgrenze: 0,05 γ Essigsäure.

lung wurde abgenutzt und mit Äther ausgewaschen: 2,79 g (94%). Das Produkt war nach Gas-Chromatographie¹⁰ frei von Essigsäure. Rf(S) = 0,27 (96), 0,15 (52 A), 0,58 (101 A). Die Abspaltung der Bpoc-Gruppe gelang auch mit Essigsäure-83-proz. Ameisensäure-Wasser 7:1:2 in 1 Std. bei 30°.

8. Boc-Cys-Ser(But)-Asn-Leu-Ser(But)-Thr(But)-Cys-Val-Leu-Ser(But)-Ala-Tyr(But)-Trp-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-His-Arg-Phe-Ser(But)-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(OBut)-Thr(But)-Pro-NH₂ · 2 CH₃COOH (II). – 2,46 g IV-Tritosylat, 1,28 g III [14], 325 mg Hosu und 0,118 ml N-Methylmorpholin wurden unter N₂ bei 60° in 16 ml Dimethylformamid gelöst. Nach Abkühlen auf 10° wurden 360 mg DCCI zugegeben und die Mischung 18 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Dann nutschte man den Dicyclohexylarnstoff ab und fällte durch Eintropfen des Filtrats in Äther. Das Rohprodukt wurde durch multiplikative Verteilung über 430 Stufen im System VI gereinigt. Nach Dünnschichtchromatographie enthielten die Elemente 143 bis 177 reines Produkt ($K = 0,63$), die Elemente 178–184 enthielten II im Gemisch mit seinem Sulfoxidderivat. Die Substanz wurde wie bei IX beschrieben, isoliert: 1,85 g (61%). Rf(S) = 0,2 (52), 0,44 (96), 0,25 (100); Rf(A) = 0,67 (45).

9. H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Ser-Ala-Tyr-Trp-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH₂ · 3 CH₃COOH (I). – Man übergoss 1,05 g II unter Stickstoff mit 21 ml eiskalter, konz. Salzsäure und rührte 10 Min. bei 0°. Dann evakuierte man zur Entfernung des gasförmig gelösten HCl bei 0° 5 Min. auf 0,01 Torr, verdünnte dann mit 300 ml *t*-Butanol und lyophilisierte. Der Rückstand (Trihydrochlorid von I) wurde in 0,1N Essigsäure gelöst und über eine Säule (2 × 15 cm) MERCK-Ionenaustauscher Nr. II (Acetatform) filtriert. Das Eluat wurde lyophilisiert und der Rückstand bis zur Gewichtskonstanz an der Luft stehengelassen: 890 mg (96%) farbloses, nicht hygroskopisches Pulver; Rf(A) = 0,33 (45), 0,59 (52), 0,56 (104); Rf(C) = 0,63 (101 A); Elektrophorese bei pH 1,9 (Puffer: 95,2 ml Eisessig, 26,5 ml Ameisensäure, 1 l Wasser), 90 Min. 16 V/cm: auf «Avicel-Fertigplatten 1440» Laufstrecke – 4,9 cm; auf Celluloseacetat («Cellogel-Folie» d. Fa. CHEMETRON, Mailand) – 3,6 cm. Peptidgehalt: 81% (aus Aminosäureanalyse [1] berechnet); UV.-Spektrum [29] (0,1N NaOH): Verhältnis Tyr/Trp = 0,97; Essigsäuregehalt (gas-chromatographisch¹⁰) ber. (Triacetat) 4,75, gef. 5,5%.

Zur Kontrolle der Reinheit wurden 100 mg I einer Gegenstromverteilung über 140 Stufen im System IV unterworfen (Phasenvolumen je 3 ml). Die Elemente 50–80 gaben nach Eindampfen und Lyophilisation 90 mg I zurück ($K \sim 0,8$). Die biologische Aktivität war gleich wie die des unverteilten I.

Die Abspaltung der Schutzgruppen aus II kann auch mit 90-proz. Trifluoressigsäure vorgenommen werden. Nach 2 Std. bei 25° ist dabei noch wenig eines erst teilweise hydrolysierten Zwischenproduktes nachweisbar; gleichzeitig bilden sich Umwandlungsprodukte, die bei Dünnschichtchromatographie langsamer, bei Dünnschichtelektrophorese schneller zur Kathode, wandern.

Für sorgfältige technische Mitarbeit danken wir den Herren R. BAUMANN, H. BRÜCKNER, H. R. KELLER, B. KREIS, A. STAUFFER und B. WETLI.

Chromatographische Analysen wurden in unserem Chromatographielabor (Leiter: Herr E. VON ARX) in verdankenswerter Weise durch Frau K. REIST, Frau M. RIST und die Herren D. FAUPEL, H. MÜLLER und R. STEINER ausgeführt.

Mikroanalysen und Spektren verdanken wir unseren Speziallaboratorien unter der Leitung der Herren Dres. W. PADOWETZ und H. HÜRZELER.

Den Herren Dr. B. ISELIN und Dr. W. KESSLER danken wir für die Überlassung von Zwischenprodukten bestens.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. RITTEL, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINIKER & P. SIEBER, *Helv.* 51, 924 (1968).
- [2] M. A. KUMAR, E. SLACK, A. EDWARDS, H. A. SOLIMAN, A. BAGHDANTZ, G. V. FOSTER & I. MACINTYRE, *J. Endocrinol.* 33, 469 (1965).
- [3] R. NEHER, B. RINIKER, R. MAIER, P. G. H. BYFIELD, T. V. GUDMUNDSSON & I. MACINTYRE, *Nature* 220, 984 (1968).

- [4] D. H. COPP, E. C. CAMERON, B. A. CHENEY, A. G. F. DAVIDSON & K. G. HENZE, *Endocrinology* **70**, 638 (1962).
- [5] A. BAGHDIAZT, G. V. FOSTER, A. EDWARDS, M. A. KUMAR, E. SLACK, H. A. SOLIMAN & I. MACINTYRE, *Nature* **203**, 1027 (1964).
- [6] P. F. HIRSCH, E. F. VOELKEL & P. L. MUNSON, *Science* **146**, 412 (1964).
- [7] R. NEHER, B. RINIKER, H. ZUBER, W. RITTEL & F. W. KAHNT, *Helv.* **51**, 917 (1968); J. T. POTTS, JR., H. D. NIALL, H. T. KEUTMANN, H. B. BREWER, JR., & L. J. DEFTOS, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **59**, 1321 (1968); P. H. BELL, W. F. BARG, JR., D. F. COLUCCI, M. C. DAVIES, C. DZIORKOWSKI, M. E. ENGLERT, E. HEYDER, R. PAUL & E. H. SNEDEKER, *J. Amer. chem. Soc.* **90**, 2704 (1968).
- [8] ST. GUTTMANN, J. PLESS, E. SANDRIN, P.-A. JAQUENOUD, H. BOSSERT & H. WILLEMS, *Helv.* **51**, 1155 (1968).
- [9] P. SIEBER, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINIKER & W. RITTEL, *Helv.* **51**, 2057 (1968).
- [10] W. RITTEL, in: «Pharmacology of Hormonal Polypeptides and Proteins», N. BACK, L. MARTINI & R. PAOLETTI, Eds., p. 35, Plenum Press, New York 1968.
- [11] H. C. BEYERMAN & J. S. BONTEKOE, *Proc. chem. Soc.* **1967**, 249.
- [12] E. WÜNSCH, *Z. Naturforsch.* **22b**, 1269 (1967).
- [13] P. SIEBER & B. ISELIN, *Helv.* **51**, 622 (1968).
- [14] B. KAMBER & W. RITTEL, *Helv.* **52**, 1074 (1969).
- [15] B. KAMBER & W. RITTEL, *Helv.* **51**, 2061 (1968).
- [16] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochim. biophysica Acta* **121**, 1 (1966).
- [17] D. YAMASHIRO, H. L. AANNING, L. A. BRANDA, W. D. CASH, V. V. S. MURTI & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **90**, 4141 (1968).
- [18] F. WEYGAND, D. HOFFMANN & E. WÜNSCH, *Z. Naturforsch.* **21b**, 426 (1966).
- [19] K. HOFMANN, A. LINDENMANN, M. Z. MAGEE & NOORUL HAQ KHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 470 (1952).
- [20] G. PFLEIDERER & P. G. CELLIERS, *Biochem.* **339**, 186 (1963).
- [21] J. HONZL & J. RUDINGER, *Coll. czech. chem. Commun.* **26**, 2333 (1961).
- [22] W. KESSLER & B. ISELIN, unveröffentlichte Versuche.
- [23] F. WEYGAND & W. STEGLICH, *Z. Naturforsch.* **14b**, 472 (1959); D. F. ELLIOTT & D. MORRIS, *Chimia* **14**, 373 (1960); K. BLÁHA & J. RUDINGER, *Coll. czech. chem. Commun.* **30**, 585 (1965).
- [24] F. W. KAHNT, B. RINIKER, I. MACINTYRE & R. NEHER, *Helv.* **51**, 214 (1968).
- [25] E. SCHRÖDER & K. LÜBKE, «The Peptides», p. 246 ff., Academic Press, New York 1965.
- [26] E. VON ARX & R. NEHER, *J. Chromatog.* **12**, 329 (1963).
- [27] E. WÜNSCH & G. WENDLBERGER, *Chem. Ber.* **97**, 2504 (1964).
- [28] G. W. KENNER & R. J. STEDMAN, *J. chem. Soc.* **1952**, 2069.
- [29] G. H. BEAVEN & E. R. HOLIDAY, *Adv. Protein Chemistry* **7**, 319 (1952).
-