

CHEMISCHE BERICHTE

In Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

herausgegeben von der

GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

102. Jahrg. Nr. 11

S. 3617—3958

Henning Klostermeyer

Synthese der Teilsequenz 42—49 des Hüllproteins vom Phagen fd*)

Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen

(Eingegangen am 16. Mai 1969)

Die C-terminale Octapeptidsequenz 42—49 des Hüllproteins vom Phagen fd wurde als geschütztes Derivat Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Ser(tBu)-OtBu**) durch Azidkupplung aus Teilstücken mit der Sequenz 42—44 und 45—49 erhalten. Für den Aufbau der Teilstücke waren die 2.4.5-Trichlor-phenylester der Acylaminosäuren den analogen *N*-Hydroxy-succinimidestern durchweg überlegen. — Bei der Hydrierung von Z-Lys(Boc)-Phe-OCH₃ konnte die Dioxopiperazinbildung durch Zusatz einer äquimolaren Menge Pyridiniumchlorid vollständig unterdrückt werden.

Braunitzer und Mitarbb.^{1,2)} zeigten, daß das Hüllprotein des Phagen fd mit nur 49 Aminosäureresten im Verhältnis zu anderen Virusproteinen relativ klein ist. Auffällig ist die Unterteilung des Proteins in eine saure, eine hydrophobe und eine basische Region. Der Aufbau der Polypeptidkette sollte mit bekannten Synthesepinzipien möglich sein.

Mit zunehmender Kettenlänge jedoch sind die üblichen analytischen Methoden nicht mehr hinreichende Charakteristika von Polypeptiden. Ähnlich steht es mit dem Verhalten von Polypeptidwirkstoffen in biologischen Systemen. Der Beweis, daß eine mit einem synthetischen Polypeptid erzielte biologische Wirkung tatsächlich von der Substanz der vermuteten Struktur herrührt, ist praktisch oft nicht zu führen.

*) 72. Mitteil. über Peptide; 71. Mitteil.: s. *D. Brandenburg*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **350**, 741 (1969).

) Abkürzungen nach den Regeln der IUPAC-IUB-Commission on Biochem. Nomenclature, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348, 256 (1967). OTcp = 2.4.5-Trichlor-phenylester.

1) *G. Braunitzer, F. Asbeck, K. Beyreuther, H. Köhler* und *G. von Wettstein*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 725 (1967).

2) *G. Braunitzer, F. Asbeck, K. Beyreuther, H. Köhler* und *G. von Wettstein*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 1689 (1967).

Die Synthese des Phagen-Hüllproteins soll daher so gelenkt werden, daß mit den zur Verfügung stehenden Analysemethoden möglichst viele Informationen über den Syntheseverlauf zu erhalten sind. Damit scheidet der Aufbau durch schrittweise Kettenverlängerung, z. B. mit der experimentell sehr einfachen Methode von Merrifield³⁾ aus, da auch solche Peptidsynthesen uneinheitlich verlaufen⁴⁻⁹⁾ und Polypeptidgemische innerhalb der analytischen Fehlergrenze stets „richtige“ Aminosäureanalysen liefern. Beim Aufbau des Proteins durch Fragmentkondensationen jedoch ist der Syntheseverlauf sicher und einfach durch Aminosäureanalysen zu kontrollieren, wenn sich die zu verknüpfenden Fragmente in der Aminosäurezusammensetzung charakteristisch unterscheiden.

Das Teilstück der Sequenz 42–49 des Phagen-Hüllproteins wurde zunächst vom C-Ende her schrittweise unter Verwendung aktivierter Ester aufgebaut, wegen zunehmender Reinigungsschwierigkeiten jedoch nur bis zur Pentapeptid-Stufe. Die nachfolgenden drei Aminosäurereste wurden durch Azidsynthese mit einem entsprechenden Tripeptid-Derivat angefügt. Bei Verwendung der *N*-Hydroxy-succinimidester¹⁰⁾ der Benzyloxycarbonylamino-säuren als aktivierte Ester waren die Ausbeuten nicht immer befriedigend, die Reinigung der Rohprodukte oft aufwendig. Insbesondere erforderte die Kupplung mit *Z*-Ser(tBu)-OSu (im Eintopf-Verfahren mit *N*-Hydroxy-succinimid/Dicyclohexylcarbodiimid nach Schnabel¹¹⁾) stets eine nachfolgende Gegenstromverteilung. Wesentlich günstiger verliefen die Synthesen unter Verwendung der 2.4.5-Trichlor-phenylester¹²⁾ anstelle der *N*-Hydroxy-succinimidester.

Bei der katalytischen Hydrierung von *Z*-Lys(Boc)-Phe-OCH₃ in Methanol verwandelte sich der freigesetzte Dipeptidester durch intramolekulare Esteraminolyse momentan in das entsprechende Dioxopiperazin. Eine Zugabe von Eisessig konnte die Reaktion nicht verhindern. Die Unterdrückung der Cyclisierung durch vorsichtige Zugabe von Chlorwasserstoff in Methanol¹³⁾ verbot sich hier wegen der Säureempfindlichkeit der verwendeten tert.-Butylschutzgruppen. Erfolgreich war jedoch Zusatz von Pyridiniumchlorid¹⁴⁾ als Protonendonator: ein Äquivalent im Hydrieransatz verhinderte die Bildung von *cyclo*-(-Lys(Boc)-Phe-) vollständig. Pyridin ist darüber hinaus flüchtig und inert.

Diese Arbeitsweise hat sich inzwischen bei vielen Hydrierungen bewährt, auch so leicht cyclisierende Dipeptidester wie Phe-Tyr(tBu)-OCH₃ und Ser(tBu)-His-

- 3) Übersicht bei T. Okuda, *Naturwissenschaften* **55**, 209 (1968).
- 4) R. B. Merrifield, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2149 (1963).
- 5) W. Kessler und B. Iselin, *Helv. chim. Acta* **49**, 1330 (1966).
- 6) J. D. Young, E. Benjamini, J. M. Stewart und C. Y. Leung, *Biochemistry* **6**, 1455 (1967).
- 7) P. Jolles und J. Jolles, *Helv. chim. Acta* **51**, 980 (1968).
- 8) H. Klostermeyer, *Chem. Ber.* **101**, 2823 (1968); O. Grahl-Nielsen und G. L. Tritsch, *Biochemistry* **8**, 187 (1969).
- 9) B. Gutte und R. B. Merrifield, *J. Amer. chem. Soc.* **91**, 501 (1969).
- 10) G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 3039 (1963).
- 11) E. Schnabel, *Liebigs Ann. Chem.* **696**, 220 (1966).
- 12) J. Pless und R. A. Boissonnas, *Helv. chim. Acta* **46**, 1609 (1963); E. Sandrin und R. A. Boissonnas, ebenda **46**, 1637 (1963).
- 13) K. B. Mathur, H. Klostermeyer und H. Zahn, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **346**, 60 (1966).
- 14) Vgl. die ähnliche Verwendung bei Th. Wieland, J. Faesel und H. Faulstich, *Liebigs Ann. Chem.* **713**, 201 (1968).

OCH_3 ¹⁵⁾ sind als Salze starker Säuren gut zu handhaben. Je nach Kristallisierbarkeit der Dipeptidester-Salze können den Hydrierungen anstelle von Pyridiniumchlorid auch Pyridiniumbromid oder Pyridiniumperchlorat zugesetzt werden. Die Hydrierung des Pyridins zum — für unsere Zwecke unbrauchbaren — Piperidin wurde unter den bisher benutzten Reaktionsbedingungen nicht beobachtet.

Herrn Prof. Dr. H. Zahn danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit, Fräulein M. Z. von Zombatsfalva und Herrn G. Morrys für fleißige Mitarbeit. Die Arbeit erfolgte mit Unterstützung der *Deutschen Forschungsgemeinschaft*, Bad Godesberg, der ich dafür danke. Dem *Verband der Chemischen Industrie e. V.* danke ich für Chemikalien im Rahmen von Hochschullieferungen, dem *Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen* für die Übernahme der Allgemeinkosten.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Monoskop bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Aminosäureanalysen wurden im Einsäulen-Verfahren mit einem Biocal BC 200-Gerät durchgeführt und sind nicht korrigiert; alle Hydrolysen erfolgten in 6*n* HCl 24 Stdn. bei 105°. Zur dünnenschichtchromatographischen Kontrolle dienten die Laufmittel Butanol-(2)/Ameisensäure/Wasser (75 : 13.5 : 11.5), Chloroform/Methanol/Eisessig (95 : 5 : 3), Chloroform/Methanol/Eisessig/Essigsäure-methylester (75 : 4 : 3 : 3) und Heptan/tert.-Butylalkohol/Pyridin (5 : 1 : 1, alle v/v)¹⁶⁾.

Z-Ala-Ser(tBu)-OtBu (1): *Z-Ser*¹⁷⁾ wurde in Methylenchlorid oder zweckmäßiger in 3-Methylbutanon-(2) mit *Isobutyl*en und einigen Tropfen konz. *Schwefelsäure* zum öligen *Z-Ser(tBu)-OtBu*¹⁸⁾ umgesetzt. Dieses wurde in Methanol mit *Palladiummohr* als Katalysator hydriert, das resultierende flüssige *Ser(tBu)-OtBu*¹⁸⁾ durch Destillation bei vermindertem Druck (Sdp.₁₄ 94°, Sdp.₁ 67°) gereinigt.

56.0 g *Z-Ala-OSu*¹⁹⁾ wurden in 200 ccm Tetrahydrofuran suspendiert und 37.5 g *Ser(tBu)-OtBu* hinzugefügt, dabei erfolgte sofort Reaktion. Nach 2 Stdn. wurde i. Vak. eingengt, das Öl in 300 ccm Äther und 300 ccm Essigester gelöst, jeweils dreimal mit 1*m* Essigsäure, 1*n* NaOH und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Das farblose Öl kristallisierte aus Cyclohexan/*n*-Heptan bei 0°; Ausb. 62.9 g (86%), Schmp. 77–79°, $[\alpha]_D^{20}$: –10.4° (*c* = 1, in Methanol).

C₂₂H₃₄N₂O₆ (422.5) Ber. C 62.5 H 8.11 N 6.63 Gef. C 63.0 H 8.30 N 6.95

Z-Lys(Boc)-Ala-Ser(tBu)-OtBu (2)

a) 32.0 g 1 wurden in 200 ccm Methanol an *Palladiummohr* (aus 2 g PdCl₂) hydriert, das Filtrat dieser Lösung i. Vak. eingengt, der Rückstand in 100 ccm Pyridin aufgenommen und mit 42.0 g *Z-Lys(Boc)-OTcp*²⁰⁾ umgesetzt. Nach 2 Tagen wurde i. Vak. eingengt, der Rückstand mit Äther verrieben und ein gleiches Volumen Cyclohexan zugefügt. Nach Abfil-

¹⁵⁾ R. Lange, Diplomarbeit, Techn. Hochschule Aachen 1969; J. Dahlmans, Dissertation, Techn. Hochschule Aachen 1968.

¹⁶⁾ E. Wünsch und J. Jentsch, Chem. Ber. **97**, 2490 (1964).

¹⁷⁾ J. S. Fruton, J. biol. Chemistry **146**, 463 (1942).

¹⁸⁾ H. C. Beyermann und J. S. Bontekoe, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **81**, 691 (1962); F. M. Callahan, G. W. Anderson, R. Paul und J. E. Zimmerman, J. Amer. chem. Soc. **85**, 201 (1963).

¹⁹⁾ G. W. Anderson, J. E. Zimmerman und F. M. Callahan, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1839 (1964).

²⁰⁾ W. Broadbent, J. S. Morley und B. E. Stone, J. chem. Soc. [London] C **1967**, 2632.

trieren wurde mit Äther und Cyclohexan gewaschen, durch Eindunsten der Mutterlauge eine zweite Fraktion gewonnen. Ausb. 46.3 g (95%), Schmp. 134–136°, $[\alpha]_D^{20}$: -21.0° ($c = 1$, in Methanol).

$C_{33}H_{54}N_3O_9$ (650.8) Ber. C 60.9 H 8.36 N 8.61 Gef. C 60.4 H 8.36 N 8.21

b) Im Parallelversuch wurde mit *Z*-Lys(Boc)-OSu²¹⁾ anstelle von *Z*-Lys(Boc)-OTcp gearbeitet, Aufarbeiten des Reaktionsansatzes wie bei 1; Ausb. 81%, Schmp. 135–139°, $[\alpha]_D^{20}$: -19.2° ($c = 1$, in Methanol).

Z-Ser(*t*Bu)-Lys(Boc)-Ala-Ser(*t*Bu)-OtBu (3)

a) 16.9 g *Z*-Ser(*t*Bu)²²⁾ und 15.0 g 2,4,5-Trichlor-phenol wurden in 200 ccm Tetrahydrofuran bei -10° mit 11.8 g Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt. Die Lösung wurde nach einem Tage eingengt, der Rückstand mit 50 ccm Aceton verrieben und mit 250 ccm Cyclohexan aufgeschlämmt, abfiltriert und gut mit Cyclohexan gewaschen (Auswaage 12.5 g \pm 98% Dicyclohexylharnstoff). Das Filtrat wurde i. Vak. eingengt und in 300 ccm Äther aufgenommen. Die Lösung von *Z*-Ser(*t*Bu)-OTcp wurde dann mit der Aminkomponente, welche durch katalytische Hydrierung von 37.2 g 2 in 250 ccm Methanol und nachfolgendes Einengen erhalten worden war, vereinigt. Es kam rasch zur Reaktion und Kristallisation des Reaktionsproduktes, dieses wurde mit Aceton/Cyclohexan (1:4) gewaschen; Ausb. 42 g (93%), Schmp. 171–173°, aus Aceton/Äther 37.4 g (82%) vom Schmp. 172–174°, $[\alpha]_D^{20}$: -20.4° ($c = 0.5$, in Methanol).

b) Aus 4.75 g *Z*-Ser(*t*Bu) wurde nach Schnabel¹¹⁾ intermediär *Z*-Ser(*t*Bu)-OSu dargestellt und mit Lys(Boc)-Ala-Ser(*t*Bu)-OtBu (aus 10.0 g 2) umgesetzt. Nach 2 Tagen wurde i. Vak. zur Trockne eingengt, der Rückstand mit 500 ccm Aceton aufgekocht, von Dicyclohexylharnstoff abfiltriert (87% Ausb.) und auf 200 ccm eingengt, dann mit 400 ccm Wasser gefällt. Ausb. 11.4 g (90%) vom Schmp. 157–173°, chromatographisch sehr uneinheitlich. Zur Reinigung wurde im System $CHCl_3/CCl_4/CH_3OH/HOH$ (5:5:8:2, v/v) über 250 Stufen gegenstromverteilt, dabei wanderte die Substanz mit $K = 0.25$. Ausb. 7.4 g (58%), Schmp. 173–175.5°, $[\alpha]_D^{20}$: -20.6° ($c = 0.5$ in Methanol) bzw. $+6.0^\circ$ ($c = 0.5$, in Chloroform).

$C_{40}H_{67}N_5O_{11}$ (794.0) Ber. C 60.5 H 8.51 N 8.82 Gef. C 60.5 H 8.45 N 8.50

Aminosäureanalyse: 1.98 Ser, 1.00 Ala, 1.02 Lys

*Ser(t*Bu)-Lys(Boc)-Ala-Ser(*t*Bu)-OtBu (4): 36.8 g 3 wurden in 500 ccm Methanol suspendiert und in Gegenwart von Palladiummohr (aus 2.5 g $PdCl_2$) bei Raumtemp. hydriert, dabei ging das Peptid-Derivat in Lösung. Der Katalysator wurde über Supercel abfiltriert, das Filtrat i. Vak. eingengt, der Rückstand aus Cyclohexan/n-Hexan kristallisiert. Ausb. 29.0 g (95%), Schmp. 115–116°, $[\alpha]_D^{20}$: -24.8° ($c = 1$, in Methanol).

$C_{32}H_{60}N_5O_9$ (659.9) Ber. C 58.3 H 9.32 N 10.6 Gef. C 58.2 H 8.95 N 10.1

Z-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Lys(Boc)-Ala-Ser(*t*Bu)-OtBu (5): 25.0 g 4 wurden in 100 ccm Dimethylformamid mit einer Lösung von 15.5 g frisch präpariertem *Z*-Thr(*t*Bu)-OSu¹³⁾ in 100 ccm Dimethylformamid vereinigt. Anderntags wurde der erstarrte Kolbeninhalt durch Erhitzen im Wasserbad gelöst, die Lösung mit 200 ccm Methanol verdünnt und in der Siedehitze mit 1 l Wasser versetzt. Der feinkristalline Niederschlag wurde noch zweimal mit jeweils 500 ccm Wasser aufgekocht und heiß abfiltriert. Ausb. 35.7 g (99%), Schmp. 198–200°, $[\alpha]_D^{20}$: -12.6° ($c = 0.5$, in Methanol).

$C_{48}H_{82}N_6O_{13}$ (951.2) Ber. C 60.6 H 8.69 N 8.84 Gef. C 59.9 H 8.49 N 8.60

Aminosäureanalyse: 0.97 Thr, 1.85 Ser, 1.00 Lys, 1.00 Ala

²¹⁾ M. Löw und L. Kisfaludy, Acta chim. Acad. Sci. hung. **44**, 61 (1965).

²²⁾ E. Schröder, Liebigs Ann. Chem. **670**, 127 (1963).

Wenn für die Kupplung ältere Präparate von *Z*-Thr(*t*Bu)-OSu (Schmp. $<91^\circ$) benutzt wurden, kam es zur Bildung zahlreicher Nebenprodukte, die nur durch Gegenstromverteilung (System wie bei **3**, $K = 0.28$) abgetrennt werden konnten. Die Ausbeuten betragen dann maximal 88%, für das gereinigte Material wurden Schmp. 199–201° und $[\alpha]_D^{20}$: -12.6° ($c = 0.5$, in Methanol) gefunden.

Thr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Ser(tBu)-OtBu (**6**): 30.0 g **5** wurden in 400 ccm Methanol wie bei **4** hydriert. Das Reaktionsprodukt kristallisierte nicht aus organischen Lösungsmitteln und wurde daher aus der warmen Lösung in 100 ccm Dioxan und 10 ccm Wasser mit 300 ccm Wasser als rasch erstarrendes Öl gefällt. Ausb. quantitativ, Schmp. 164–166°, $[\alpha]_D^{20}$: -25.3° ($c = 1$, in Methanol).

$C_{40}H_{76}N_6O_{11}$ (817.1) Ber. C 58.8 H 9.38 N 10.3 Gef. C 60.0 H 9.32 N 10.2

Z-Lys(Boc)-Phe-OCH₃ (**7**): 23.8 g *Z-Lys(Boc)-OSu*²¹⁾ und 10.8 g *HCl·Phe-OCH₃*²³⁾ wurden in 50 ccm Dimethylformamid durch Zugabe von 7.0 ccm *Triäthylamin* zur Reaktion gebracht. Anderntags wurde in 500 ccm angesäuertes Wasser (pH 3, Citronensäure) gegossen, die Flüssigkeit dekantiert, der feste Rückstand in Essigester gelöst und jeweils dreimal mit Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde auf 100 ccm eingengt und durch Zugabe von Hexan kristallisiert. Ausb. 24.3 g (90%), Schmp. 98–100° (in Gegenwart von Wasser wird eine tieferschmelzende Modifikation, Schmp. 87–89°, erhalten), $[\alpha]_D^{20}$: -12.0° ($c = 1$, in Methanol).

$C_{26}H_{39}N_3O_7$ (541.7) Ber. C 64.3 H 7.26 N 7.76 Gef. C 64.4 H 7.02 N 7.94

Bei Verwendung von *Z-Lys(Boc)-OTcp*²⁰⁾ anstelle von *Z-Lys(Boc)-OSu* und Kupplung in Pyridin werden ebenfalls Ausbeuten von 85–95% erhalten.

Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-OCH₃ (**8**): 20.0 g **7** wurden in Gegenwart von 4.5 g *Pyridiniumchlorid* in 250 ccm Methanol an *Palladiummohr* hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde i. Vak. eingengt, der ölige Rückstand durch Verreiben mit absol. Äther kristallisiert, abfiltriert und sofort in 200 ccm Dimethylformamid gelöst. (*HCl·Lys(Boc)-Phe-OCH₃* erwies sich als sehr hygroskopisch und wurde daher nicht näher charakterisiert.) Diese Lösung wurde mit 17.6 g *Z-Lys(Boc)-OSu*²¹⁾ und 5.4 ccm *Triäthylamin* versetzt und nach 24 Stdn. in 1.5 l schwach angesäuertes Wasser gegossen, die kristalline Fällung abgesaugt und gut mit Wasser gewaschen. Ausb. 27.3 g (96%) vom Schmp. 163–165°. Aus Essigester/n-Hexan Schmp. 165–166°, $[\alpha]_D^{20}$: -15.1° ($c = 1$, in Methanol).

$C_{40}H_{59}N_5O_{10}$ (770.0) Ber. C 62.4 H 7.72 N 9.10 Gef. C 62.6 H 8.04 N 9.15

Aminosäureanalyse: 1.97 Lys, 1.00 Phe

Cyclo-(Lys(-Boc)-Phe) (**9**): Die Verbindung entsteht beim Hydrieren von **7** in Methanol ohne Zusatz eines starken Protonendonators, Ausb. quantitativ. Schmp. 244–246°, $[\alpha]_D^{20}$: -24.7° ($c = 0.5$, in Dimethylformamid).

$C_{20}H_{29}N_3O_4$ (375.5) Ber. C 64.0 H 7.79 N 11.2 Gef. C 63.2 H 7.51 N 10.9

Aminosäureanalyse: 0.99 Lys, 1.00 Phe

Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-NHNH₂ (**10**): 15.0 g **8** wurden in 400 ccm absol. Methanol mit 15 ccm *Hydrazinhydrat* umgesetzt. Anderntags wurden 10.3 g, nach Einengen der Mutterlauge auf 150 ccm weitere 0.8 g **10** abfiltriert und mit Methanol/Äther gewaschen. Ausb. 74%, Schmp. 192–194°, $[\alpha]_D^{20}$: -11.5° ($c = 1$, in Eisessig).

$C_{39}H_{59}N_7O_9$ (770.0) Ber. C 60.8 H 7.72 N 12.7 Gef. C 61.0 H 7.83 N 13.0

²³⁾ R. A. Boissonnas, S. Guttmann, P. A. Jaquenoud und J. P. Waller, *Helv. chim. Acta* **39**, 1421 (1956).

Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ala-Ser(tBu)-OtBu (**11**) (geschützte Sequenz 42–49): 850 mg (1.12 mMol) feingepulvertes **10** wurden unter Erwärmen in 10 ccm Dimethylformamid gelöst, auf -30° abgekühlt und unter Rühren mit 1.68 ccm 2.00 *n HCl* (3.36 mMol) in Tetrahydrofuran und 0.18 ccm (1.35 mMol) *Isoamylnitrit* umgesetzt. Die Lösung wurde noch 40 Min. bei -25° gerührt, dann mit 0.46 ccm (3.36 mMol) *Triäthylamin* neutralisiert und 850 mg (1.05 mMol) **6** in 10 ccm Dimethylformamid zugefügt. Der Ansatz wurde innerhalb von 24 Stdn. auf Raumtemperatur gebracht, dann das Tetrahydrofuran i. Vak. abgedampft, der Rückstand mit 100 ccm Methanol und 100 ccm Wasser erhitzt, das flockige Reaktionsprodukt abfiltriert und getrocknet (1.45 g), dann in Methanol/Chloroform (1 : 1) gelöst. Der Niederschlag, der sich beim Eindunsten auf 60 ccm gebildet hatte, wurde abfiltriert und mit Methanol/Äther (1 : 1) gewaschen. Ausb. 1.16 g (71 %); die Substanz sintert ab 230° und zersetzt sich bei etwa 275° , $[\alpha]_D^{20}$: -12.7° ($c = 0.5$, in Methanol/Chloroform (1 : 1)).

$C_{79}H_{131}N_{11}O_{20}$ (1555.0) Ber. C 61.0 H 8.49 N 9.91 Gef. C 61.4 H 8.40 N 9.91

Aminosäureanalyse: 3.15 Lys, 1.02 Phe, 0.98 Thr, 1.91 Ser, 1.00 Ala

Das korrekte Verhältnis Phe/Ala und der Stickstoffgehalt zeigen, daß die Kupplung ohne Curtius-Umlagerung des Azids verlief.

[192/69]