

232. «Push-Pull»-Acetylene als Hilfsmittel zur Synthese von Peptiden¹⁾

von Markus Neuschwander²⁾, Hans-Peter Fahrni³⁾ und Ulrich Lienhard⁴⁾

Institut für Organische Chemie der Universität Bern, 3012 Bern, Freiestrasse 3

(5. VII. 78)

Peptide Synthesis by Means of 'Push-Pull'-Acetylenes

Summary

'Push-pull'-acetylenes **1** are excellent reagents for peptide synthesis: Addition of 'push-pull'-acetylenes to solutions of *N*-protected amino acids (or *vice versa*) gives enol esters **5**, which react selectively with the amino function of a second amino acid. In this way serine, tyrosine, 4-hydroxyproline, cysteine as well as histidine are linked to form dipeptide esters without protection of the second functional group (OH, SH or NH). The amount of racemization is very low. Similarly tri- as well as tetrapeptides are available. The versatility of the reaction is discussed.

1. Einleitung. - «Push-Pull»-Acetylene **1** [5] [6] setzen sich mit Carbonsäuren unter schonenden Bedingungen annähernd quantitativ zu 3-Acyloxy-acrylamiden (**2**) um [1] [5] [7] (*Schema 1*). Da die Addition der Carboxylgruppe sehr selektiv verläuft [1], sind auch Carbonsäuren, die weitere funktionelle Gruppen tragen [2] [8], zur Reaktion **1** → **2** befähigt. Die anfallenden Enolester **2** lassen sich mit primären und sekundären Aminen in schonendem Eintopfverfahren zu Amidinen **4** umsetzen [1]. Das ausgeprägt selektive Verhalten der Enolester **2** geht aus Versuchen zur Synthese von Estern und Anhydriden hervor, indem selbst bei erhöhter Temperatur und bei Katalyse mit Säuren oder Lewis-Säuren keine Reaktion erzwungen werden kann [1].

Die bisherigen Arbeiten zeigen, dass «Push-Pull»-Acetylene vielen Anforderungen genügen, die an gute Peptid-Reagentien gestellt werden müssen. Wir berichten im folgenden über erfolgreiche Versuche zum Einsatz der Acetylene **1** in der Peptid-Synthese.

2. Orientierende Versuche zur Synthese von Peptiden. - 2.1. *Präparative Optimierung der Reaktionsbedingungen.* Erste Vorversuche zeigten, dass sich die Acetylene **1a-1d** mit *Z*-geschützten⁵⁾ Aminosäuren⁶⁾ leicht umsetzen: So wird bei der Reaktion

¹⁾ 16. Mitt. über substituierte Aminoacrylderivate. 15. Mitt.: [1]; Kurzmitt.: [2].

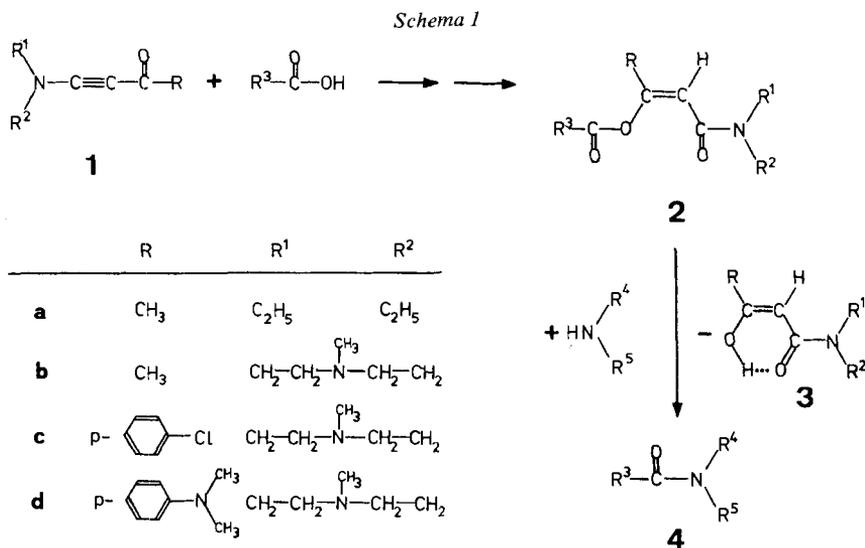
²⁾ Anfragen sind an diesen Autor zu richten.

³⁾ Teil der Dissertation [3].

⁴⁾ Teil der Dissertation [4].

⁵⁾ Z = C₆H₅CH₂OCO- (Benzyloxycarbonyl-Gruppe).

⁶⁾ Es sei hervorgehoben, dass auch beim Einsatz freier Aminosäuren selektiv die Carboxylgruppe reagiert.



von Z-Glycin mit **1c** in Dichlormethan nach 2 Stunden bei 20° der kristalline Enolester **5c** (R⁶=H) in einer Ausbeute von 98% isoliert (Schema 2). Die Verbindung ist bei Raumtemperatur über Tage stabil und kann bei -20° monatelang gelagert werden.

Wird dem Reaktionsgemisch aus Z-Glycin und **1b** nach 1 Stunde 1 Äquiv. Benzylamin zugefügt, so lässt sich nach weiteren 2 Stunden kristallines N'-Benzyl-2-N-Z-glycinamid in 86% Ausbeute isolieren. Bei Verwendung von 5-10% Überschuss an «Push-Pull»-Acetylen steigt die Ausbeute auf 97%.

Bei der Synthese von Peptiden üben das verwendete Lösungsmittel, die Reaktionstemperatur und -dauer einen wesentlichen Einfluss auf den Racemisierungsgrad, die Ausbeute und die Reinheit der Produkte aus. Am Beispiel der Synthese des Dipeptids Z-Ala-Phe-OMe⁷⁾ wurde vorerst gezeigt, dass die Bildung des Enolesters **5b** (R⁶=CH₃) im üblichen Konzentrationsbereich (0,1-0,2 M-Lösungen) bei 20° nach 2 Stunden (= t₁⁸⁾) praktisch abgeschlossen ist, während die Umsetzung des Enolesters **5b** (R⁶=CH₃) mit Phenylalanin-methylester⁷⁾ erst nach 10-12 Stunden (= t₂⁸⁾) beendet ist. Der Einfluss des Lösungsmittels ist weniger ausgeprägt, doch sinken die Ausbeuten mit zunehmender Lösungsmittelpolarität um einige Prozent ab.

2.2. Kinetische Optimierung der Reaktion. Die Umsetzung von chiralen Aminosäuren mit «Push-Pull»-Acetylenen **1** bzw. mit den Enolestern **5** kann sehr einfach in einer thermostatisierten Polarimeterzelle verfolgt werden: Figur 1 zeigt, dass die Reaktion von je 0,2 M Lösungen von Z-Alanin und **1c** in Dichlormethan nach 2-3 Stunden beendet ist.

⁷⁾ Bei chiralen Aminosäuren mit fehlenden Angaben über die Konfiguration handelt es sich stets um L-Aminosäuren.

⁸⁾ Mit t₁ wird die Reaktionsdauer der Umsetzung **1** + Z-Aminosäure → **5**, mit t₂ die Reaktionsdauer der Umsetzung **5** + Aminosäureester → **6** bezeichnet (vgl. Schema 2).

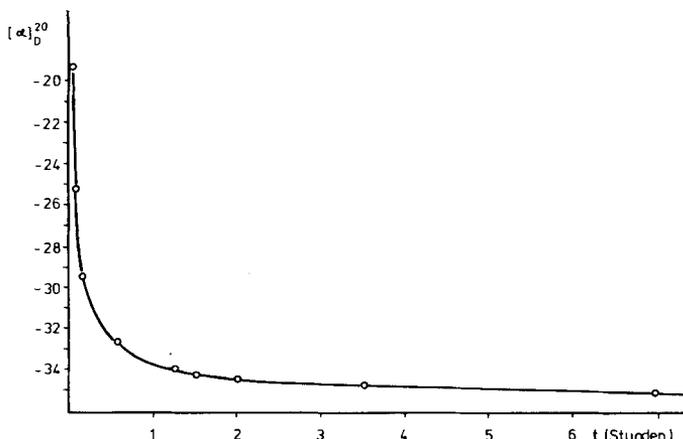


Fig. 1. Zeitliche Änderung des Drehwerts bei der Reaktion von Z-Alanin mit **1c** (CH₂Cl₂, 20°, je 0,2M Lösungen): Bestimmung von t₁⁸

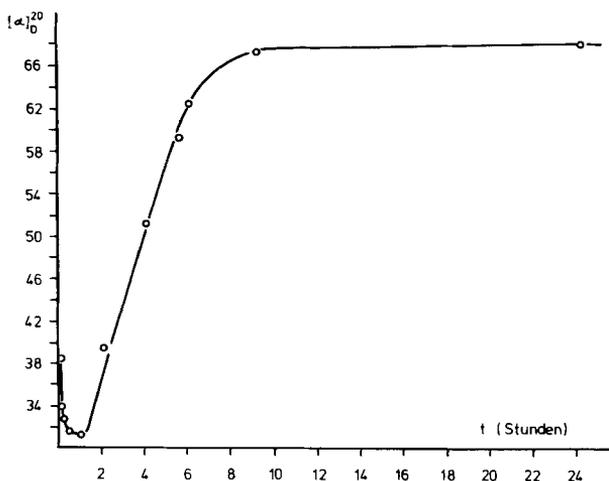


Fig. 2. Zeitliche Änderung des Drehwerts bei der Reaktion des Enolesters **5b** (R⁶=H) mit Leucin-methylester (CH₂Cl₂, 20°, je 0,2M Lösungen): Bestimmung von t₂⁸

Wie die Umsetzung des aus Glycin und **1b** bereiteten Enolesters **5b** (R⁶=H) mit Leucin-methylester lehrt (Fig. 2), erfordert die Aminolyse des Enolesters **5** einen etwas höheren Zeitaufwand und ist in 0,1M Dichlormethanolösung nach rund 10–12 Stunden abgeschlossen⁹⁾.

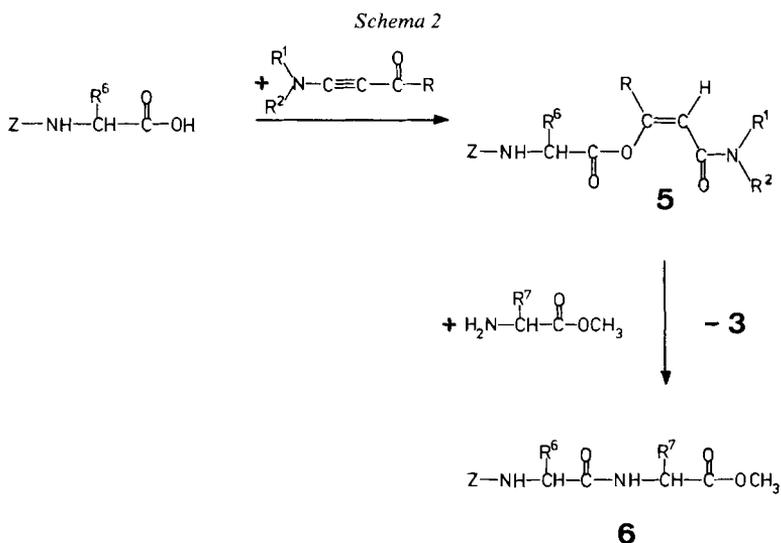
Zusammenfassend ergeben die kinetischen Optimierungsversuche für Routineansätze eine Reaktionsdauer t₁ von 2–3 Stunden und t₂ von 10–12 Stunden⁸⁾. Es sei betont, dass die optimale Reaktionsdauer mit dem zur Aminolyse eingesetzten Nucleophil variiert. Bei sterisch gehinderten Aminosäureestern empfiehlt sich eine polarimetrische Kontrolle des Umsatzes.

⁹⁾ Für die Reaktion wurde Leucin-methylester-hydrochlorid eingesetzt und mit 1 Äquiv. N-Methylmorpholin versetzt. Da der Drehwert eines Aminosäureester-hydrochlorids vom pH-Wert der Lösung abhängt, könnte die anfängliche Abnahme des Drehwerts durch einen pH-Effekt hervorgerufen werden.

3. Synthese einfacher Peptidester. - 3.1. *Allgemeines.* Bei der Umsetzung von *N*-geschützten Aminosäuren mit «Push-Pull»-Acetylenen **1** entstehen Enolester **5**, die sich mit dem Ester einer zweiten Aminosäure zum Dipeptidester umsetzen können¹⁰⁾. Die in *Schema 2* formulierte Reaktion kann präparativ sehr einfach ohne Isolierung des Enolesters **5** durchgeführt werden: Normalerweise wird die *N*-geschützte Aminosäure in Dichlormethan vorgelegt und bei -10 bis 0° mit einer Lösung von **1** in Dichlormethan versetzt. Nach 2 Stunden ($=t_1$) bei Raumtemperatur wird je 1 Äquiv. Aminosäureester-hydrochlorid und *N*-Methylmorpholin zugegeben, über Nacht ($=t_2$) bei Raumtemperatur gerührt und durch einfaches Ausschütteln mit verdünnter Säure oder durch Chromatographie an Silicagel aufgearbeitet. Im allgemeinen werden reine farblose, kristalline Rohprodukte isoliert, welche nach einer Umkristallisation mit den Literaturwerten übereinstimmende Schmelzpunkte und Drehwerte zeigen.

3.2. *Wahl des Acetylen 1.* Die Wahl des «Push-Pull»-Acetylen richtet sich nach dessen thermischer Stabilität, der Reaktivität der daraus bereiteten Enolester sowie der einfachen Aufarbeitung der Reaktionsgemische.

4-Dimethylamino-3-buten-2-on [5] ist aus Stabilitätsgründen zur Peptidsynthese wenig geeignet [9]. 4-Diäthylamino-3-buten-2-on (**1a**) [6] ist thermisch wesentlich stabiler als das Dimethyl-Derivat, doch bereitet die chromatographische Abtrennung des «Wasseraddukts» **3a** Schwierigkeiten: **3a** wandert auf Silicagel als Keton/Enol-Tautomerengemisch in sehr breiter Zone und verunreinigt den Dipeptidester **6**. Die Reinigungsprobleme lassen sich durch Ersatz der Dialkylaminogruppe in **1** durch einen *N*-Methylpiperazin-Ring (**1b**, **1c**, **1d**) beseitigen: Zur Abtrennung des «Wasseraddukts» **3** genügt in diesen Fällen meist das Ausschütteln mit verdünnter Säure oder das Filtrieren über Silicagel. Somit weisen **1b** und **1c** sehr günstige Ei-



¹⁰⁾ Die zweite Aminosäure kann auch in freier Form eingesetzt werden, doch sind die Aminosäureester besser löslich, ferner die *Z*-Peptidester **6** in der Literatur besser charakterisiert.

genschaften auf¹¹⁾. Dagegen kommt **1d** trotz guter Säurelöslichkeit des «Wasseraddukts» nur in Ausnahmefällen in Frage, da die Reaktionsfähigkeit der daraus bereiteten Enolester **5d** im Vergleich zu **5c** geringer ist.

3.3. *Ergebnisse.* Ausgehend von **1b** werden die rohen Dipeptidester in Ausbeuten von 81–94% gewonnen (Tab. 1). Ihre Schmelzpunkte zeigen an, dass der Gehalt an Verunreinigungen klein sein muss. Bei der Umkristallisation lassen sich Verluste (2,5–5%) in engen Grenzen halten.

Tabelle 1. Mit Hilfe von **1b** synthetisierte einfache Peptidester

Peptidester	Rohprodukt		Reinprodukt		t ₁ ^{c)} [Std.]	t ₂ ^{c)} [Std.]	
	[%]	Smp. ^{a)}	[%]	Smp. ^{a)b)}			
Z-Ala-Gly-OMe	92,5	93,5	90	96–96,5	([10]: 94–96)	2	48
Z-Ala-Val-OMe	85	80,5	81	83	([11]: 84)	2	80
Z-Ala-Phe-OMe	81	97	77	99	([12]:101)	2	12
Z-Gly-DL-Phe-OMe	94	84–86	90	84	([13]: 80)	2	12
Z-Gly-DL-Phe:Gly-OEt ^{d)}	92	129	87	131	([14]:132)	2	12
Z-Gly-Phe:Gly-OEt	93	114–116	89	116–117,5	([14]:116,5)	2	12

a) In °. Angabe von nur einem Wert bedeutet, dass die Verbindung innerhalb eines Grades vom angegebenen Wert an aufwärts schmilzt.

b) [α]_D-Werte, vgl. exper. Teil.

c) t₁ und t₂^{b)} wurden nicht in allen Fällen optimiert. Oft wurde sicherheitshalber eine lange Reaktionsdauer gewählt.

d) : heisst: Dort wurden die Molekeln verknüpft.

Tabelle 2. Mit Hilfe von **1c** synthetisierte einfache Peptidester

Peptidester	Rohprodukt		Reinprodukt		t ₁ ^{c)} [Std.]	t ₂ ^{c)} [Std.]	
	[%]	Smp. ^{a)}	[%]	Smp. ^{a)b)}			
Z-Ala-Gly-OMe	97	94–96	91	96	([10]: 96)	2 ^{d)}	12
Z-Ala-Val-OMe	98	79–83	84	83,5	([11]: 84)	2 ^{d)}	24
Z-Ala-Phe-OMe	97	97–100	88	99	([11]: 99)	2 ^{d)}	12
Z-Leu-Ala-OMe	98	77	77	94		12	36
Z-Gly-Val-OMe	97	e)	e)			24	80
Z-Ile-Ile-OCH ₂ Ph	87	119	75	122		18	24
Z-Gly-Phe:Gly-OEt ^{f)}	98	114,5–116	90	116,5–117	([14]:116,5–117)	2	12
Z-Leu-Ala:Gly-Val-OMe	98	154–156	82	158–160	([15]:160)	12	12
Z-Asp(O- <i>t</i> -Bu)-Phe:Val-OMe	97	115–117	85	119		6	18

a) In °. Angabe von nur einem Wert: Schmelzbereich innerhalb eines Grades vom angegebenen Wert an aufwärts.

b) [α]_D-Werte, vgl. exper. Teil.

c) t₁ und t₂^{b)} wurden nicht immer optimiert. Oft wurde sicherheitshalber eine lange Reaktionsdauer gewählt.

d) 1 Std. bei 0°, dann 1 Std. bei 20°.

e) Produkt ölig.

f) : heisst: Dort wurden die Molekeln verknüpft.

11) Während sich bei **1b** das «Wasseraddukt» **3b** sowie nicht umgesetzter Enolester **5b** besonders leicht abtrennen lassen, liegen die Vorteile von **1c** in der guten thermischen Stabilität, der einfachen Handhabung des kristallinen Acetyls und der im Vergleich zu **5b** erhöhten Reaktionsfähigkeit der Enolester **5c**.

Noch bessere Ergebnisse werden mit **1c** erzielt, da die Enolester **5c** im Vergleich zu **5b** etwas reaktiver sind (Tab. 2). Selbst Aminosäureester mit stark abgeschirmter Aminofunktion wie Phenylalanin-methylester oder insbesondere Isoleucin-methylester lassen sich problemlos als Nucleophile einsetzen. Ebenso gelingt die Verknüpfung der aus Z-Dipeptiden bereiteten Enolester **2c** ($R^3 = Z-NHCHR-CO-NHCHR-$) mit Aminosäureestern zu Tripeptiden oder mit Dipeptidestern zu Tetrapeptiden.

4. Peptidester aus Aminosäuren mit weiteren funktionellen Gruppen. - Da «Push-Pull»-Acetylene mit Carbonsäuren sehr viel leichter reagieren als mit Aminien [5] [16] oder Phenolen [17], kann beim Einsatz polyfunktioneller Aminosäuren mit einer bevorzugten Reaktion der Carboxylgruppe gerechnet werden. In der Tat reagiert Z-Serin mit **1b** annähernd quantitativ zum Enolester **5b**, und die anschliessende Verknüpfung mit Glycin-äthylester gelingt in guten Ausbeuten. Die Versuche von *Gais & Lied* [8]¹²⁾ lassen erwarten, dass bei einer Konkurrenz zwischen Carboxylgruppe und OH, NH oder SH-Gruppe stets selektiv die Carboxylgruppe an **1** adiert wird.

Aus Tabelle 3 geht hervor, dass die Enolester **5** ihrerseits bei einer Konkurrenz zwischen NH_2 -, OH- und SH-Gruppen sehr selektiv die Aminofunktion bevorzugen (Reaktion mit Serin, Tyrosin, 4-Hydroxyprolin und Cystein). Von besonderem Interesse ist, dass Cystein ohne Schutz der SH-Funktion leicht verknüpft werden kann, ebenso dass Histidin sehr selektiv mit der nucleophileren 2-Aminogruppe reagiert.

Deutlich schlechtere Ausbeuten werden bei der Synthese von Z-Phe-His-Leu-

Tabelle 3. Peptidester aus Aminosäuren mit weiteren funktionellen Gruppen (OH, SR, NH)

Peptidester	1	Rohprodukt		Reinprodukt		$t_1^c)$ [Std.]	$t_2^c)$ [Std.]	
		[%]	Smp. ^{a)}	[%]	Smp. ^{a)} ^{b)}			
Z-Ala-Ser-OMe	1b	83,5	121	79	130	((18]: 134)	2	60
Z-Ala-Ser-OMe	1c	98	128-132	90	133,5	((18]: 134)	2 ^{d)}	72
Z-Ser-Gly-OEt	1b	88	96-98	81	99	((11]: 106)	2	24
Z-Ala-Tyr-OMe	1c	99	118-121	91	122	((19]: 122)	2 ^{d)}	72
Z-Ala-4-Hyp-OMe	1c	98	^{e)}	^{e)}			12	24
Z-Ala-Met-OMe	1c	100	76-79	85	81		2 ^{d)}	15
Z-Ala-Cys-OMe	1c	95	112	81	115-117	((20]: 116,5-118)	2 ^{d)}	12
Z-Ala-His-OMe	1d	95	160	80	163		2 ^{d)}	96
Z-Arg(7N-NO ₂)-Ala-OMe	1b	62	150,5	54	154	((21]: 157)	8	24
Z-Phe-His-Leu-OMe ^{§)}	1c	72	^{e)}	63 ^{f)}	^{e)}		12	12

^{a)} In °. Angabe von nur einem Wert: Schmelzbereich innerhalb eines Grades vom angegebenen Wert an aufwärts.

^{b)} $[\alpha]_D$ -Werte. vgl. exper. Teil.

^{c)} t_1 und t_2 ^{§)} wurden nicht immer optimiert. Oft wurde sicherheitshalber eine lange Reaktionsdauer gewählt.

^{d)} 1 Std. bei 0°, dann 1 Std. bei 20°.

^{e)} Produkt ölig.

^{f)} Reinigung durch Schütteln mit Aktivkohle.

^{§)} \ddagger heisst: Dort wurden die Molekeln verknüpft.

¹²⁾ 4-Dimethylamino-3-butin-2-on setzt sich mit einer Reihe von Carbonsäuren, die zusätzlich Hydroxyl-, Amino- und Mercapto-Gruppen tragen, in hohen Ausbeuten zu Enolestern des Typs **2** bzw. **5** (Serin) um.

OMe und von Z-Arg (7 N-NO₂)-Ala-OMe festgestellt. Der deutliche Abfall der Ausbeuten bei der Verknüpfung von Z-Phe-His mit Leucin-methylester könnte auf sterische Effekte zurückgehen und möglicherweise durch Erhöhung von t_2 behoben werden. Dagegen sind die Ursachen für das relativ schlechte Ergebnis bei der Verknüpfung von 2 N-Z-7 N-Nitroarginin mit Alanin-methylester schwer abzuschätzen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass «Push-Pull»-Acetylene **1** auch zur Verknüpfung von Aminosäuren mit weiteren funktionellen Gruppen (OH, SH, schwächer nucleophiles NH₂ oder NH) sehr geeignet sind. Besonders vorteilhaft ist die Tatsache, dass zusätzliche funktionelle Gruppen weder die Addition der Carboxylgruppe an **1** behindern, noch die Acylierung der zweiten Aminosäure durch **5** beeinträchtigen.

5. Orientierende Versuche zur Peptidsynthese in Wasser. - Aufgrund der ausgeprägten Reaktionsträgheit sowohl der Acetylene **1**¹³⁾ wie auch der Enolester **2** bzw. **5** gegenüber Wasser sind gute Voraussetzungen für eine Peptidsynthese in wässrigen Lösungen gegeben. Somit könnten die mit dem Enolester **5** zur Reaktion gebrachten weiteren Aminosäuren in freier Form eingesetzt werden. Durch stufenweise Zugabe von **1**, Aminosäure, **1** usw. wäre ein schrittweiser Aufbau von Polypeptiden in wässrigen Systemen ohne Schutzgruppen denkbar, sofern sich die Enolester **2** bzw. **5** unter diesen Bedingungen bilden (Versuche diesbezüglich sind im Gange)! Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass in diesem Fall Wasser in grossem Überschuss vorliegt, und ferner sowohl die erwünschten Reaktionen (Peptidsynthese) wie die unerwünschten Nebenreaktionen pH-abhängig sind.

Da die Aminolyse der Enolester **5** (t_2) beträchtlich langsamer verläuft als die Carbonsäure-Addition an **1**, haben wir die Hydrolysegeschwindigkeit eines Enolesters **5** in Abhängigkeit vom pH einer wässrigen Pufferlösung bestimmt. Für den Zerfall des aus Z-Glycin und **1b** gebildeten Enolesters **5b** ($R^6 = H$) werden bei 20° folgende Halbwertszeiten gemessen: 86 Stunden bei pH 4,7, 44 Stunden bei pH 6,0, 18 Stunden bei pH 7,0 und 12 Stunden bei pH 8,0. Damit wird deutlich, dass die Hydrolysebeständigkeit der Enolester **5** in schwach saurem Gebiet sehr gross ist, dagegen in schwach basischem Milieu erwartungsgemäss absinkt, so dass die gewünschte Aminolyse des Enolesters **5**¹⁴⁾ in basischem Milieu durch die Hydrolyse konkurrenziert wird.

Die Umsetzung einer 0,1 M wässrigen Lösung des Enolesters **5b** ($R^6 = H$) mit einer Aufschlammung von Phenylalanin ergibt bei pH 7,15 Z-Gly-Phe in einer Rohausbeute von 82 bzw. einer Reinausbeute von 53%. Dieses Experiment zeigt, dass die Idee einer Peptidsynthese mittels der Acetylene **1** in Wasser (oder wasserhaltigen Lösungsmitteln) nicht von der Hand zu weisen ist, dass aber noch wesentliche Optimierungen nötig sind, wenn die Ausbeuten in aprotischem Milieu erreicht werden sollen (Tab. 1-3).

6. Racemisierungstests. - Bei der Synthese von Peptiden sollte der Kupplungsschritt weitgehend ohne Racemisierung ablaufen. Die Racemisierung tritt bei den

¹³⁾ Dies gilt für neutrales Milieu. Dagegen können die Acetylene **1** mit Wasser in saurem oder Lewis-saurem Milieu zur Reaktion gebracht werden [5].

¹⁴⁾ Für die in Figur 2 wiedergegebene Reaktion von **5b** ($R^6 = H$) mit Leucin-methylester-hydrochlorid in Dichlormethan bei 20° in Anwesenheit von 1 Äquiv. N-Methylmorpholin beträgt die Halbwertszeit der Aminolyse ca. 4 Stunden.

üblichen Synthesemethoden normalerweise bei der aktivierten Carbonylkomponente auf, wobei vor allem der Azlacton-Mechanismus von Bedeutung ist. Ausserdem kann bei Aminosäuren mit elektronenabziehenden Gruppen am C(2)-Atom eine direkte Deprotonierung zur Racemisierung führen.

6.1. *Der Anderson-Callahan-Test* [22]. Z-Gly-Phe wird mit **1b** (in Dichlormethan oder Aceton) sowie mit **1c** (in Dichlormethan) aktiviert und mit Glycin-äthylester umgesetzt. Aus der 2proz. Lösung des gebildeten Tripeptids in Äthanol sollte bei Racemisierung zuerst das Racemat auskristallisieren, das gravimetrisch sowie durch Bestimmung des Schmelzpunkts bestimmt wird [22]. Innerhalb der Nachweisgrenze (1–2% Racemat) kann aber keine Racemisierung festgestellt werden.

6.2. *Der Young-Test* [23]. Aus dem relativ racemisierungsempfindlichen Benzoyl-L-leucin und Glycin-äthylester wird PhCO-Leu-Gly-OEt hergestellt; aus der optischen Drehung des Rohprodukts lässt sich der maximale Racemat-Anteil¹⁵⁾ berechnen, wobei die Empfindlichkeit auch hier etwa bei 1–2% Racemat liegt [23].

Der *Young-Test* ergibt bei Aktivierung von Benzoyl-L-leucin mit **1c** in Dichlormethan und Reaktion mit Glycin-äthylester-hydrochlorid einen Racemat-Anteil im Dipeptidester¹⁵⁾ von 4,7%, im polaren Dimethylformamid erhöht sich der Racemat-Anteil auf 12,9%.

Diese Resultate sind im Zusammenhang mit der meist weit grösseren Racemisierung zu werten, welche *Williams & Young* [23] bei andern Peptid-Syntheseverfahren fanden. So ergibt die Dicyclocarbodiimid-Methode im *Young-Test* eine Racemisierung zwischen 40 und 85%. Mit dem von *Woodward* vorgeschlagenen *N*-Äthyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonat [24] werden Racemat-Anteile von 4–37% festgestellt, je nach verwendetem Lösungsmittel und eingesetzter Base. Selbst bei der als racemisierungssicher geltenden Azidmethode [25] tritt eine Racemisierung von 0 bis 12% ein.

6.3. *Racemisierungstest nach Sieber & Riniker*. Kürzlich berichteten *Sieber & Riniker* [26] über eine unerwartet starke Racemisierung bei der Verknüpfung der Teilsequenz 11–16 mit der Teilsequenz 17–28 von Calcitonin M mittels der Azid-Methode. Dieses Phänomen wurde bei der Kupplung von Z-Asp(O-*t*-Bu)-Phe mit Valin-methylester-hydrochlorid näher untersucht. Die Übertragung dieses Tests auf dieselbe, aber mittels **1c** durchgeführte Kupplung ergibt folgenden Gehalt an D-Phenylalanin¹⁶⁾17): 2,1% in Dichlormethan, 2,4% in Acetonitril und 2,7% in Dimethylformamid.

6.4. *Folgerungen*. Verglichen mit andern Methoden kann die Peptidsynthese über «Push-Pull»-Acetylene als weitgehend racemisierungssicher bezeichnet werden. In dieser Hinsicht unterscheiden sich «Push-Pull»-Acetylene sehr wesentlich von den von *Viehe et al.* [27] zur Peptidsynthese herangezogenen reaktiven Inaminen, bei welchen eine beträchtliche Racemisierung festgestellt wird [28].

¹⁵⁾ Die korrekte Zusammensetzung des Reaktionsgemischs wird mittels Elementaranalyse geprüft [23]. Es ist jedoch möglich, dass Verunreinigungen die optische Drehung reduzieren, ohne die Elementaranalyse stark zu verfälschen.

¹⁶⁾ Z-Asp(O-*t*-Bu)-Phe wird mit **1c** aktiviert und mit Valin-methylester-hydrochlorid verknüpft. Danach wird das rohe Tripeptid einer sauren Totalhydrolyse unterworfen. Die resultierenden Aminosäuren werden in Isopropylester übergeführt, trifluoracetyliert und chromatographisch in die D- und L-Form aufgetrennt. Vom gemessenen Gehalt an D-Phenylalanin wird der auf die Racemisierung bei der Totalhydrolyse zurückzuführende Anteil abgezogen.

¹⁷⁾ Wir danken Herrn *P. Sieber, Ciba-Geigy AG*, Basel, für die Durchführung dieses Tests.

7. Diskussion und Zusammenfassung. - Im Vergleich zu Inaminen reagieren die «Inamin-carbonylsysteme» **1** bei der Peptidsynthese sehr viel selektiver und weitgehend racemisierungsfrei, während verschiedene Folge- und Nebenreaktionen sowohl der Inamine wie der daraus bereiteten Enolester [28] [30] nicht beobachtet werden. Bei der Peptidsynthese über Isoxazoliumsalze von Woodward & Woodman [31] entstehen *N*-monosubstituierte 3-Acyloxy-acrylamide des Typs **5**, deren Amidfunktion Nebenreaktionen eingehen kann [32]. Dies ist bei den aus «Push-Pull»-Acetylenen **1** bereiteten Enolestern **5**, welche eine Dialkylamidfunktion tragen, nicht möglich.

Die ausgeprägte Selektivität sowohl von **1** gegenüber Carboxylgruppen als auch von **5** gegenüber Aminfunktionen führt dazu, dass Aminosäuren mit weiteren funktionellen Gruppen meist problemlos verknüpft werden können. Ferner bietet sich die Möglichkeit zur Peptidsynthese in wasserhaltigen Lösungsmitteln oder in Wasser an. Die höhere Selektivität der Acetylene **1** im Vergleich zu Inaminen hat erhebliche Vorteile (vgl. oben), führt aber auch zu einer geringeren Reaktivität [29]. Während die Reaktionsdauer t_2^8 zur Synthese von Di-, Tri- und Tetrapeptiden in den meisten Fällen im Bereich von 1 Tag liegt, könnte der Geschwindigkeitsabfall bei der Verknüpfung längerer Peptid-Teilsequenzen zu einem limitierenden Faktor werden.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt Nr.2.517-0.76) für die Unterstützung der Arbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeines. - Zur Synthese von «Push-Pull»-Acetylenen, s. [5] [6]. Smp.: bei Angaben von nur einem Wert liegt der Schmelzbereich innerhalb eines Grades vom angegebenen Wert an aufwärts. Weitere allgemeine Angaben in [6].

1. Orientierende Versuche zur Synthese von Peptiden. 1.1. 3-(4-Chlorphenyl)-3-(*Z*-glycyl)oxy-*N,N*-(3-methyl-3-azapentamethylen)acrylamid (**5c**, $R^6=H$). In einem 100-ml-Dreihalskolben werden unter N_2 1046 mg (5 mmol) *Z*-Glycin in 25 ml abs. Dichlormethan aufgeschlämmt. Bei -10° wird unter Rühren eine Lösung von 1314 mg (5 mmol) **1c** in 10 ml abs. Dichlormethan während 15 Min. zugegeben. Die schwach gelbe Lösung wird 2 Std. bei RT. gerührt, bei RT./10 Torr auf ca. 10 ml eingengt und mit Äther versetzt. Dabei fällt das Produkt aus. Nach inverser Filtration, Tieftemp.-Kristallisation aus $CHCl_3$ /Äther und Trocknen bei RT./ 10^{-2} Torr: 2,312 g (98%) farblose Kristalle mit Smp. 112,5–113°. - NMR. (100 MHz, $CDCl_3$): 7,44–7,05 (*m*, 9 H), darin bei 7,20 (*s*, 5 H); 6,27 (*s*, 1 H), 5,76 (*t*, $J=6$, 1 H); 5,05 (*s*, 2 H); 4,17 (*d*, $J=6$, 2 H); 3,53 (*br.s.*, 4 H); 2,45–2,10 (*m*, 7 H), darin bei 2,23 (*s*, 3 H)¹⁸⁾.

$C_{24}H_{26}ClN_3O_5$ (471,96) Ber. C 61,08 H 5,55 N 8,90% Gef. C 61,09 H 5,52 N 8,97%

1.2. *N'*-Benzyl-2*N*-*Z*-glycinamid. Analog zu 1.1 werden unter N_2 418,4 mg (2 mmol) *Z*-Glycin in 10 ml CH_2Cl_2 vorgelegt. Bei -10° wird unter Rühren während 15 Min. eine Lösung von 333,4 mg (2 mmol) **1b** in 5 ml CH_2Cl_2 zugetropft, wobei sich das *Z*-Glycin langsam auflöst. Nach 1 Std. bei RT. werden bei -10° 212,2 mg (2 mmol) Benzylamin in 5 ml CH_2Cl_2 zugegeben, bei RT. 2 Std. gerührt und im RV. auf ca. 5–10 ml eingengt. Das Gemisch wird über ca. 20 g Silicagel mit CH_2Cl_2 /THF 2:1 chromatographiert. Die ersten 100 ml Eluat enthalten das gewünschte farblose Rohprodukt (Kontrolle des Eluations-Endpunktes im DC. unter UV.-Licht). Nach Abdampfen im RV. und Trocknen bei RT./ 10^{-2} Torr, 510 mg (86%) farblose Kristalle mit Smp. 114–115°. Umkristallisation aus EtOAc/Petroläther ergibt Nadeln mit Smp. 116° ([14]: 118–119°).

¹⁸⁾ Weitere spektroskopische Daten sowie Abbildungen der Spektren in [3].

Die analoge Umsetzung von 2 mmol Z-Glycin, 2,2 mmol **1b** und 2,3 mmol Benzylamin ergibt nach Chromatographie 95% *N*'-Benzyl-2*N*-Z-glycinamid mit Smp. 116°.

Die analoge Umsetzung von 2 mmol Z-Glycin, 2,2 mmol **1b** und 2 mmol Benzylamin ergibt nach Chromatographie 97% *N*'-Benzyl-2*N*-Z-glycinamid mit Smp. 115°.

1.3. *Optimierung der Synthese von Z-Ala-Phe-OMe mit Hilfe von 1b. – Allgemeine Vorschrift.* In der Apparatur von 1.1 werden 446,4 mg (2 mmol) Z-Alanin unter N₂ in 10 ml abs. Lösungsmittel vorgelegt und bei –10° unter Rühren während 15 Min. mit einer Lösung von 333,4 mg (2 mmol) **1b** versetzt. Dann wird auf RT. erwärmt und während t₁⁸) reagieren gelassen. Der entstandene Enolester **5b** wird ohne Isolierung direkt zum Peptid umgesetzt. Zu der wieder auf –10° gekühlten Lösung von **5b** wird eine Aufschlammung von 431,4 mg (2 mmol) Phenylalanin-methylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin in 5 ml desselben Lösungsmittels gegeben. Nach 20 Min. bei –10° wird während t₂⁸) bei RT. weitergerührt. Das Gemisch wird bei RT./5 Torr auf etwa 5 ml eingengt und an ca. 25 g Silicagel mit CH₂Cl₂/THF 2:1 chromatographiert. Es bilden sich 3 Zonen: eine dunkelgelbe, fast stationäre, eine gelbe, sehr langsam laufende und eine farblose, rasch laufende Zone, welche das Produkt enthält. Die ersten 100 ml Eluat werden im RV. eingedampft. Nach dem Trocknen bei RT./10⁻² Torr werden Ausbeute und Smp. des Rohprodukts bestimmt. Bei der Umkristallisation aus EtOAc/Petroläther betragen die Verluste ca. 5–10%. Resultate vgl. *Tabelle 4*.

Tabelle 4. Ausbeuten an Z-Ala-Phe-OMe bei Variation der Reaktionsparameter

Lösungsmittel	t ₁ ⁸) [Std.]	t ₂ ⁸) [Std.]	Ausbeute ^{a)}		Smp. ^{b)} [°]
			[mg]	[%]	
CH ₂ Cl ₂	1	2	469,0	61	97–99
CH ₂ Cl ₂	1	12	592,1	77	96–98
CH ₂ Cl ₂	12	24	607,4	79	96–97
CH ₂ Cl ₂	2	12	599,7	78	97–98
CH ₂ Cl ₂ ^{c)}	2	12	615,0	80	97–98
CH ₃ CN	2	12	568,9	74	94–96
THF	2	12	592,1	77	94–96

^{a)} Ausbeute nach Chromatographie.

^{b)} Das aus EtOAc/Petroläther umkristallisierte Dipeptid hat einen Smp. von 99–100°.

^{c)} 10% Überschuss an **1b**.

1.4. *Kinetische Optimierung der Reaktion von Z-Alanin mit 1c (s. Fig. 1).* In einem 50-ml-Zweihalskolben werden bei RT. unter N₂ 223,2 mg (1 mmol) Z-Alanin in 5 ml abs. Dichlormethan vorgelegt. Dazu wird unter Rühren eine Lösung von 262,7 mg (1 mmol) **1c** in 5 ml abs. Dichlormethan gegeben. Nach 1 Min. werden mit einer Pipette ca. 2 ml Gemisch entnommen und in eine bei 20° thermostatisierte Polarimeterzelle gefüllt. Die Reaktion wird durch Messung der zeitlichen Abhängigkeit des Drehwinkels verfolgt.

1.5. *Aminolyse von 5b (R⁶=H) mit Leucin-methylester (s. Fig. 2).* Analog zu 1.1 werden 5 mmol Z-Glycin mit 5 mmol **1b** umgesetzt. 375,5 mg (1 mmol) des erhaltenen Enolesters **5b** (R⁶=H) werden in 5 ml CH₂Cl₂ vorgelegt und mit einer Lösung von 181,7 mg (1 mmol) Leucin-methylester-hydrochlorid sowie 101 mg (1 mmol) *N*-Methylmorpholin in 5 ml CH₂Cl₂ versetzt. Nach 1 Min. intensiven Rührens werden ca. 2 ml Gemisch in eine bei 20° thermostatisierte Polarimeterzelle gefüllt. Die Reaktion wird durch Messung der zeitlichen Abhängigkeit des Drehwinkels verfolgt.

2. *Synthese von Peptidestern mittels «Push-Pull»-Acetylenen 1⁵)⁷) (Tab. 1, 2 und 3).* – 2.1. *Allgemeine Arbeitsvorschrift.* In einem 100-ml-Dreihalskolben mit Magnetrührer, Kühlbad, Innenthermometer und Tropftrichter mit Druckausgleich werden unter N₂ 2 mmol *N*-geschützte Aminosäure (bzw. *N*-geschütztes Peptid) in 10 ml abs. Dichlormethan vorgelegt. Bei –10° wird unter Rühren eine Lösung von 2 mmol «Push-Pull»-Acetylen **1** in 5 ml abs. Dichlormethan zugetropft. Es wird zwischen 2 und 24 Std. (= t₁) bei RT. gerührt (die optimale Reaktionsdauer kann mit Hilfe des Polarimeters bestimmt werden: sobald der Drehwert konstant bleibt, ist die Bildung des Enolesters **5b** (bzw. **2b**) beendet). Die Lösung wird bei 0° mit einer Aufschlammung von 2 mmol Aminosäureester-hydrochlorid (bzw. Peptid-

ester-hydrochlorid) und 2 mmol *N*-Methylmorpholin in 5 ml abs. Dichlormethan versetzt. Nach 12-96 Std. (= t_2) Rühren wird das Lösungsmittel im RV. bei 30°/12 Torr entfernt und der Rückstand mit 30-40 ml EtOAc versetzt. Die organische Phase wird 2mal mit je 10 ml 0,2N HCl, 1mal mit 5 ml 1N NaHCO₃ und 1mal mit 5 ml Wasser ausgeschüttelt, die Wasserphase kurz mit wenig AcOEt extrahiert und verworfen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Das farblose oder blassgelbe, meist kristalline Rohprodukt wird durch Umkristallisation gereinigt.

Nach dieser Vorschrift wurden hergestellt (Änderungen sind ausdrücklich vermerkt):

2.2. *Z-Alanyl-glycin-methylester*. Aus 446,4 mg (2 mmol) *Z*-Alanin, 333,4 mg (2 mmol) **1b**, 251,1 mg (2 mmol) Glycin-methylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin ($t_1 = 2$ Std., $t_2 = 48$ Std.): 544 mg (92,5%) Kristalle mit Smp. 93,5°. Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther 1:1 liefert 528 mg (90%) farblose Kristalle mit Smp. 96-96,5°, $[\alpha]_D^{25} = -23,6^{(19)}$ ([10]: $[\alpha]_D^{25} = -25^{(19)}$).

Eine analoge Reaktion mit 525,5 mg (2 mmol) **1c** ($t_1 = 2$ Std.²⁰) und $t_2 = 12$ Std.) ergibt 571 mg (97%) gelbes Rohprodukt mit Smp. 94-96°. Nach Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther 1:1 535 mg (91%) farblose Kristalle mit Smp. 96°, $[\alpha]_D^{25} = -23,7^{(19)}$.

2.3. *Z-Alanyl-valin-methylester*. Aus 446,4 mg (2 mmol) *Z*-Alanin, 333,4 mg (2 mmol) **1b**, 335,3 mg (2 mmol) Valin-methylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin ($t_1 = 2$ Std., $t_2 = 80$ Std.): 570 mg (85%) Kristalle mit Smp. 80,5°. Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther 1:1 liefert 543 mg (81%) farblose Kristalle mit Smp. 83°, $[\alpha]_D^{20} = -38,3^{(19)}$ ([11]: $[\alpha]_D^{20} = -38,3^{(19)}$).

Eine analoge Reaktion mit 525,5 mg (2 mmol) **1c** ($t_1 = 2$ Std.²⁰, $t_2 = 24$ Std.) ergibt 659 mg (98%) gelbe Kristalle mit Smp. 79-83°. Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther 1:1 ergibt 565 mg (84%) farblose Kristalle mit Smp. 83,5°, $[\alpha]_D^{20} = -38,6^{(19)}$.

2.4. *Z-Alanyl-phenylalanin-methylester*. Aus 446,4 mg (2 mmol) *Z*-Alanin, 333,4 mg (2 mmol) **1b**, 431,4 mg (2 mmol) Phenylalanin-methylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin ($t_1 = 2$ Std., $t_2 = 12$ Std.): 622 mg (81%) Kristalle mit Smp. 97-98°. Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther liefert 591 mg (77%) farblose Kristalle mit Smp. 99-100°, $[\alpha]_D^{25} = -14,1^{(19)}$ ([12]: $[\alpha]_D^{25} = -14,2^{(19)}$).

Eine analoge Reaktion mit 525,5 mg (2 mmol) **1c** ($t_1 = 2$ Std.²⁰, $t_2 = 12$ Std.) ergibt 746 mg (97%) gelbe Kristalle mit Smp. 97-100°. Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther 1:1 liefert 676 mg (88%) farblose Kristalle mit Smp. 99°, $[\alpha]_D^{25} = -14,1^{(19)}$.

2.5. *Z-Glycyl-DL-phenylalanin-methylester*. Aus 418,4 mg (2 mmol) *Z*-Glycin, 333,4 mg (2 mmol) **1b**, 431,4 mg (2 mmol) DL-Phenylalanin-methylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin ($t_1 = 2$ Std., $t_2 = 12$ Std.): 696,4 mg (94%) blassgelbe Kristalle mit Smp. 84-86°. Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther liefert 667 mg (90%) farblose Kristalle mit Smp. 84°.

2.6. *Z-Glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-äthylester*. Aus 712,9 mg (2 mmol) *Z*-Glycyl-DL-phenylalanin, 333,4 mg (2 mmol) **1b**, 279,2 mg (2 mmol) Glycin-äthylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin ($t_1 = 2$ Std., $t_2 = 12$ Std.): 813,1 mg (92%) rohes Tripeptid mit Smp. 129°. Umkristallisation aus Äthanol liefert 768 mg (87%) farblose Kristalle mit Smp. 131°.

2.7. *Z-Glycyl-phenylalanyl-glycin-äthylester*. Aus *Z*-Glycyl-phenylalanin wie unter 2.6: 821 mg (93%) farblose Kristalle mit Smp. 114-116°. Umkristallisation aus Äthanol liefert 786 mg (89%) Tripeptid mit Smp. 116-117,5°, $[\alpha]_D^{25} = -12,5^{(21)}$ ([14]: $[\alpha]_D^{25} = -12,6^{(21)}$).

Eine analoge Reaktion mit 525,5 mg (2 mmol) **1c** ($t_1 = 2$ Std., $t_2 = 12$ Std.) ergibt 868 mg (98%) blassgelbes Rohprodukt mit Smp. 114,5-116°. Umkristallisation aus Äthanol liefert 794 mg (90%) reines Tripeptid, Smp. 116,5-117°, $[\alpha]_D^{25} = -12,6^{(21)}$.

2.8. *Z-Leucyl-alanin-methylester*. Aus 1061,2 mg (4 mmol) *Z*-Leucin in 20 ml CH₂Cl₂, 1050,8 mg (4 mmol) **1c**, 558,4 mg (4 mmol) Alanin-methylester-hydrochlorid und 404,6 mg (4 mmol) *N*-Methylmorpholin ($t_1 = 12$ Std., $t_2 = 36$ Std.): 1373 mg (98%) braungelbes Rohprodukt mit Smp. 77°. Es wird in AcOEt gelöst und mit wenig Aktivkohle versetzt. Nach der Filtration wird mit Petroläther gefällt: 1079 mg (77%) farblose Kristalle mit Smp. 94°.

2.9. *Z-Glycyl-valin-methylester*. Aus 1040 mg (5 mmol) *Z*-Glycin in 40 ml CH₂Cl₂/CH₃CN 1:1, 1313,5 mg (5 mmol) **1c**, 838,3 mg (5 mmol) Valin-methylester-hydrochlorid und 505,8 mg (5 mmol) *N*-Methylmorpholin ($t_1 = 24$ Std., $t_2 = 80$ Std.): 1554 mg (97%) blassgelbes Öl. Dünnschicht-Chromatographie (Silicagel) mit CHCl₃/Aceton 10:1 ergibt einen Fleck mit Rf 0,76 ([15]: Rf 0,75).

¹⁹⁾ $c = 1$, CH₃OH (1 g Substanz in 100 ml Lösung).

²⁰⁾ Es wird 1 Std. bei 0°, dann 1 Std. bei RT. geführt.

²¹⁾ $c = 2$, Äthanol (2 g Substanz in 100 ml Lösung).

2.10. *Z-Isoleucyl-isoleucin-benzylester*. Aus 1061 mg (4 mmol) *Z*-Isoleucin in 20 ml CH_2Cl_2 , 1051 mg (4 mmol) **1c**, 1574 mg (4 mmol) (Isoleucin-benzylester)-*p*-toluolsulfonat und 404,6 mg *N*-Methylmorpholin ($t_1 = 18$ Std., $t_2 = 24$ Std.). Zur Zerstörung von restlichem Enolester werden 432 mg (4 mmol) 4-Aminopicolin zugegeben und 12 Std. gerührt. Bei der Aufarbeitung nach 2.1 wird anstelle von 0,2N HCl 10proz. Citronensäurelösung verwendet: 1630 mg (87%) leicht gelbes Rohpeptid mit Smp. 119°. Umkristallisation aus AcOEt/Äther/Petroläther ca. 2:1:1 ergibt 1410 mg (75%) chromatographisch einheitliches Dipeptid mit Smp. 122°, $[\alpha]_D^{20} = -32,5^{21}$). - $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, CDCl_3): 7,36 (s, 10 H); 6,28 (d, $J = 9$, 1 H); 5,31 (d, $J = 9$, 1 H); 5,22 (d, $J = 12$, 1 H); 5,15 (d, $J = 12$, 1 H); 5,12 (s, 2 H); 4,63 (m, 1 H); 4,04 (m, 1 H); 2,1-1,0 (mehrere m, 6 H); 1,0-0,7 (m, 12 H). - IR. (KBr): 3270_{vs}, 3060_m, 3030_m, 2958_s, 2926_{m-s}, 1725_s, 1680_s, 1644_{vs}, 1528_s, 1452_{m-s}, 1380_s, 1285_s, 1241_{vs}, 1194_s, 1124_m, 1036_{m-s}, 1000_{w-m}, 974_m, 902_w, 750_{m-s}, 697_s¹⁸).

$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$ (468,61) Ber. C 69,21 H 7,74 N 5,97% Gef. C 69,15 H 7,68 N 5,91%

2.11. *Z-Leucyl-alanyl-glycyl-valin-methylester*. Aus 672,8 mg (2 mmol) *Z*-Leucylalanin in 10 ml CH_2Cl_2 , 525,4 mg (2 mmol) **1c**, einer Lösung von 376,4 mg (2 mmol) Glycyl-valin-methylester und 120 mg (2 mmol) Essigsäure in 10 ml CH_2Cl_2 und aus 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin ($t_1 = 12$ Std., $t_2 = 72$ Std.): 993 mg (98%) rohes Tetrapeptid mit Smp. 154-156°. 2malige Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther liefert 831 mg (82%) farblose Kristalle mit Smp. 158-160°, $[\alpha]_D^{20} = -31,75^{21}$) ([15]: $[\alpha]_D^{20} = -31,8^{21}$)).

2.12. *Z-Asparagyl(t-butylester)-phenylalanyl-valin-methylester*. Aus 941,1 mg (2 mmol) *Z*-Asparagyl-(*t*-butylester)-phenylalanin, 525,4 mg (2 mmol) **1c**, 335,3 mg (2 mmol) Valin-methylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin ($t_1 = 6$ Std., $t_2 = 18$ Std.): 1132 mg (79%) blassgelbe Kristalle mit Smp. 115-117°. Zur Reinigung wird unter Erwärmen in wenig AcOEt gelöst, unter Rühren mit Aktivkohle versetzt, nach 10 Min. über *Celite* filtriert, eingedampft und aus AcOEt/Äther/Petroläther ca. 2:1:1 umkristallisiert: 993 mg (85%) farblose Kristalle des Tripeptids, Smp. 119°, $[\alpha]_D^{20} = -36,5^{21}$). - $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, CDCl_3): 7,57 (s, 5 H); 7,21 (s, 5 H); 7,02 (d, $J = 8$, 1 H); 6,28 (d, $J = 8$, 1 H); 5,78 (d, $J = 8$, 1 H); 5,11 (s, 2 H); 4,8-4,3 (mehrere m, 3 H); 3,71 (s, 3 H); 3,08 (d, $J = 8$, 1 H); 2,86 (2d, $J = 17$ bzw. $J' = 5$, 1 H); 2,62 (2d, $J = 17$ bzw. $J' = 6$, 1 H); 2,3-1,8 (mehrere m, 1 H); 1,41 (s, 9 H); 0,84 (d, $J = 7$, 3 H); 0,81 (d, $J = 7$, 3 H). - IR. (KBr): 3285_s, 2963_m, 1732_{vs}, 1691_s, 1640_{vs}, 1531_s, 1391_m, 1367_{m-s}, 1265_m, 1229_s, 1158_s, 1050_{m-s}, 1022_m, 846_{w-m}, 746_{m-s}, 701_{m-s}, 581_{w-m}, 507_{w-m}¹⁸).

$\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8$ (583,70) Ber. C 63,79 H 7,08 N 7,21% Gef. C 63,84 H 7,16 N 7,20%

2.13. *Z-Alanyl-serin-methylester*. Aus 446 mg (2 mmol) *Z*-Alanin, 333,4 mg (2 mmol) **1b**, 311,2 mg (2 mmol) Serin-methylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin ($t_1 = 2$ Std., $t_2 = 60$ Std.): 541 mg (83,5%) farblose Kristalle mit Smp. 121°. Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther liefert 512 mg (79%) farblose Kristalle mit Smp. 130°, $[\alpha]_D^{20} = -20,5^{19}$) ([18]: $[\alpha]_D^{20} = -20,5^{19}$)).

Analog wird mit 525,5 mg (2 mmol) **1c** in 20 ml abs. Dichlormethan umgesetzt, $t_1 = 2$ Std.²⁰, $t_2 = 5$ und 67 Std. (nach 5 Std. Rühren bei RT. wird mit 20 ml CH_3CN versetzt und weitere 67 Std. gerührt, bis sich fast alles gelöst hat): 636 mg (98%) blassgelbes Rohprodukt mit Smp. 128-132°. Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther ergibt 584 mg (90%) weisse Kristalle mit Smp. 133,5°, $[\alpha]_D^{20} = -20,4^{19}$).

2.14. *Z-Seryl-glycin-äthylester*. Aus 478,5 mg (2 mmol) *Z*-Serin, 333,4 mg (2 mmol) **1b**, 279,2 mg (2 mmol) Glycin-äthylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin. Aus Löslichkeitsgründen werden anstelle von CH_2Cl_2 insgesamt 25 ml abs. THF verwendet; $t_1 = 2$ Std., $t_2 = 12$ und 12 Std. (nach 12 Std. wird das THF i.RV. entfernt und durch 25 ml CH_2Cl_2 ersetzt, worauf nochmals 12 Std. gerührt wird): 575 mg (88%) Rohprodukt mit Smp. 96-98°. Umkristallisation aus CHCl_3 liefert 525 mg (81%) farblose Kristalle mit Smp. 99°, $[\alpha]_D^{20} = -5,9^{19}$) ([11]: $[\alpha]_D^{20} = -5,9^{19}$)).

2.15. *Z-Alanyl-tyrosin-methylester*. Aus 446,5 mg (2 mmol) *Z*-Alanin, 525,5 mg (2 mmol) **1c**, 463,4 mg (2 mmol) Tyrosin-methylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin in insgesamt 20 ml CH_2Cl_2 , $t_1 = 2$ Std.²⁰, $t_2 = 5$ und 67 Std. (nach 5 Std. Rühren bei RT. wird mit 20 ml CH_3CN versetzt und weitere 67 Std. gerührt): 793 mg (99%) blassgelbes Rohprodukt mit Smp. 118-121°. Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther ergibt 728 mg (91%) farblose Kristalle, Smp. 122°, $[\alpha]_D^{20} = -22,2^\circ$ ($c = 1,95$ proz. Essigsäure) ([19]: $[\alpha]_D^{20} = -22,2^\circ$ ($c = 1,95$ proz. Essigsäure)).

2.16. *Z-Alanyl-(4-hydroxyprolin)-methylester*. Aus 446,5 mg (2 mmol) *Z*-Alanin und 525,5 mg **1c** wird der Enolester bereitet, $t_1 = 12$ Std. Nach Zugabe von 263,3 mg (2 mmol) 4-Hydroxyprolin-methylester-

hydrochlorid und 203,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin wird mit 5–10 ml CH₃CN versetzt, t₂ = 72 Std.: 670 mg (97,7%) blassgelbes Öl, das nicht kristallisiert werden kann. Eine weitere Reinigung des Rohprodukts ist schwierig. Im ¹H-NMR-Spektrum sind neben dem Produkt noch wenige Prozent Enolester sichtbar.

2.17. *Z-Alanyl-methionin-methylester*. Aus 446,5 mg (2 mmol) *Z*-Alanin, 525,5 mg (2 mmol) **1c**, 399,4 mg (2 mmol) Methionin-methylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin t₁ = 2 Std.²⁰, t₂ = 15 Std.): 737 mg (100%) gelbes Rohprodukt mit Smp. 76–79°. Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther ergibt 626 mg (85%) farblose Kristalle, Smp. 81°, [α]_D²⁰ = –35,5°¹⁹). – ¹H-NMR. (100 MHz, CDCl₃): 7,21 (*m*, 5 H); 6,95 (*br.d.* 1 H); 5,64 (*d*, *J* = 7, 1 H); 5,02 (*s*, 2 H); 4,61 (*m*, 1 H); 4,25 (*m*, 1 H); 3,67 (*s*, 1 H); 2,6–1,7 (*m*, 7 H), darin bei 2,02 (*s*); 1,36 (*d*, *J* = 7, 3 H). – IR. (CCl₄): 3420*w-m*, 3330*w-m*, 3064*w*, 3032*w*, 2978 sh, 2952*w-m*, 2916*w*, 1740*s*, 1713 sh, 1680*s*, 1498*s*, 1445*m-s*, 1436 sh, 1355*m*, 1302*w-m*, 1228 sh, 1208 sh, 1176*m*, 1113*w-m*, 1054*m*, 1028*w*, 697*m*²²).

C₁₇H₂₄N₂O₅S (368,45) Ber. C 55,42 H 6,57 N 7,60% Gef. C 55,37 H 6,57 N 7,69%

2.18. *Z-Alanyl-cystein-methylester*. Aus 446,5 mg (2 mmol) *Z*-Alanin, 525,5 mg (2 mmol) **1c**, 343,3 mg (2 mmol) Cystein-methylester-hydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin, t₁ = 2 Std.²⁰, t₂ = 12 Std. Wegen der O₂-Empfindlichkeit des Reaktionsprodukts wird unter N₂ aufgearbeitet: 647 mg (95%) blassgelbes Rohprodukt mit Smp. 112°. Umkristallisation aus AcOEt/Petroläther ergibt 551 mg (81%) farblose Kristalle mit Smp. 115–117°, [α]_D²⁰ = –26,4° (*c* = 1,28, CH₃OH) ([20]: [α]_D²⁰ = –26,5° (*c* = 1,28, CH₃OH)).

2.19. *Z-Alanyl-histidin-methylester*. Aus 446,5 mg (2 mmol) *Z*-Alanin und 415,3 mg (2 mmol) **1d** wird der Enolester bereitet, t₁ = 2 Std.²⁰. Nach Zugabe von 484,2 mg (2 mmol) Histidin-methylester-dihydrochlorid und 404,6 mg (4 mmol) *N*-Methylmorpholin wird mit 20 ml abs. Acetonitril versetzt, t₂ = 96 Std. Nach dem Eindampfen wird mit 60 ml AcOEt versetzt und 3mal mit je 20 ml 0,2N HCl extrahiert. Die Wasserphase wird mit Na₂CO₃-Lösung neutralisiert und bei 40°/12 Torr auf wenige ml eingengt. Nach Zugabe von 20 ml 2N Na₂CO₃ wird die Wasserphase 3mal mit je 300 ml AcOEt extrahiert. Die vereinigten Essigester-Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt, wobei das Produkt als voluminöser Niederschlag ausfällt: 711 mg (95%) Rohprodukt mit Smp. 160°. Nach Umkristallisation aus AcOEt/CH₃OH 599 mg (80%) farblose Kristalle mit Smp. 163°, [α]_D²⁰ = –11,6°¹⁹). – ¹H-NMR. (100 MHz, (CD₃)₂CO): 7,54 (*s*, 1 H); 7,37 (*m*, 5 H); 6,90 (*s*, 1 H); 5,51 (*s*, 2 H); 4,69 (*m*, 1H); 4,27 (*m*, 1 H); 3,74 (*br.s.*, H₂O und NH); 3,65 (*s*, 3 H); 3,06 (*d*, *J* = 6, 2 H); 1,36 (*d*, *J* = 7, 3 H). – IR. (KBr): 3380*m-s*, 3248*m-s*, 3036 sh, 2990*m*, 2960 sh, 2924 sh, 2850*m*, 1727*s*, 1699*s*, 1643*s*, 1564*m-s*, 1557 sh, 1500*s*, 1465*w-m*, 1452*m*, 1433*m*, 1381*m*, 1340*m-s*, 1310*w*, 1295 sh, 1288*m-s*, 1261 sh, 1234*s*, 1178*m*, 1112*w*, 1094*w-m*, 1064*m-s*, 1048*w-m*, 1012*m*, 998*w*, 948*w-m*, 922*w*, 905*w*, 884*w-m*, 867*w-m*, 828*w-m*, 799*w-m*, 780*w-m*, 763*m*, 755*m*, 744*m*, 718*w-m*, 704*m*, 697*m*, 625*m*, 512*w*, 495*w*, 450*w*, 400*w*²²).

C₁₈H₂₂N₄O₅ (374,40) Ber. C 57,75 H 5,92 N 14,96% Gef. C 57,88 H 6,09 N 15,00%

2.20. (*2N-Z-7N-Nitro-arginyl*)-alanin-methylester. 706,8 mg (2 mmol) *2N-Z-7N-Nitro-arginin* und 333,4 mg (2 mmol) **1b** werden in 15 ml CH₂Cl₂/CH₃CN 1:1 umgesetzt, t₁ = 8 Std. Das Lösungsmittel wird i.RV. abgedampft und durch 15 ml CH₂Cl₂ ersetzt. Dann werden 279,2 mg (2 mmol) Alanin-methylester-hydrochlorid und 203,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin zugegeben, t₂ = 24 Std.: 548 mg (62%) blassgelbes Rohprodukt, Smp. 150,5°. Umkristallisation aus CHCl₃/Äther liefert 474 mg (54%) weisse Kristalle mit Smp. 154°, [α]_D²⁵ = –18,4°¹⁹) ([21]: [α]_D²⁵ = –18,8°¹⁹).

2.21. *Z-Phenylalanyl-histidyl-leucin-methylester*. 872,9 mg (2 mmol) *Z*-Phenylalanyl-histidin und 525,5 mg (2 mmol) **1c** werden in abs. DMF umgesetzt, t₁ = 12 Std. Nach Zugabe von 362,1 mg (2 mmol) Leucin-methylester-hydrochlorid und 203,3 mg (2 mmol) *N*-Methylmorpholin wird während t₂ = 12 Std. gerührt. Anstelle von 0,2N HCl wird mit 5proz. Citronensäurelösung ausgeschüttelt: 801,6 mg (72%) blassgelbes Rohprodukt. Zur Reinigung wird in AcOEt aufgenommen, mit ca. 30 mg Aktivkohle versetzt, filtriert und abgedampft: 701 mg (63%) blassgelbes Tripeptid. Eine weitere Reinigung des Produkts ist schwierig.

3. Orientierende Versuche zur Peptidsynthese in Wasser. – *Beispiel: Z-Glycyl-phenylalanin*. Aus 418,4 mg (2 mmol) *Z*-Glycin und 333,4 mg (2 mmol) **1b** wird analog zu 2.1 der Enolester **5b** (R⁶ = H) her-

²²) Weitere spektroskopische Daten sowie Abbildungen der Spektren in [4].

gestellt. Das vom Lösungsmittel befreite Produkt wird mit einer Aufschlammung von 330,4 mg (2 mmol) Phenylalanin in 20 ml dest. Wasser versetzt. Der pH-Wert der Lösung wird durch Zutropfen von Triäthylamin von 6,8 auf 7,15 gebracht (pH-Meter, Glaselektrode). Das Gemisch wird 72 Std. gerührt, die nun klare Lösung mit 20 ml 1N HCl angesäuert und 3mal mit AcOEt ausgezogen. Die organische Phase wird mit 5 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und abgedampft: 584 mg (82%) amorphes Rohprodukt, das aus Wasser/Aceton umkristallisiert wird. Es werden 381 mg (53%) weisses, kristallines, NMR.-reines Produkt mit Smp. 112° isoliert.

4. Racemisierungstests. - 4.1. *Anderson-Callahan-Test* [22] (vgl. auch [14]). In einem 100-ml-Dreihalskolben werden unter N_2 712,7 mg (2 mmol) reines Z-Glycyl-phenylalanin (Smp. $125,5^\circ$, $[\alpha]_D^{24} = +38,5^\circ$ ($c=5$, Äthanol)) vorgelegt und bei -10° während 15 Min. mit einer Lösung von 333,4 mg (2 mmol) 4-(4'-Methyl-1'-piperazinyl)-3-butin-2-on (**1b**) in 5 ml abs. Dichlormethan versetzt. Es wird 2 Std. (= t_1) bei RT. gerührt, dann bei 0° eine Aufschlammung von 279,2 mg (2 mmol) Glycin-äthylesterhydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) N-Methylmorpholin in 5 ml abs. Dichlormethan zugegeben und 12 Std. (= t_2) bei RT. gerührt. Das Lösungsmittel wird bei $30^\circ/10$ Torr entfernt und der Rückstand in 30 ml AcOEt und 10 ml Wasser aufgenommen. Die organische Phase wird 2mal mit 10 ml 0,2N HCl und je 1mal mit 10 ml 1N NaHCO_3 und 5 ml Wasser ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet, i. RV. eingedampft und bei 10^{-2} Torr getrocknet: 821 mg (93%) weisses, kristallines Rohprodukt mit Smp. 112° .

Das Tripeptid wird in 41 g abs. Äthanol zu einer 2proz. Lösung gelöst, mit Spuren des Racemats (Z-Glycyl-DL-phenylalanyl-glycin-methylester) geimpft und im Kühlschrank bei 0° stehen gelassen. Es kristallisieren die folgenden Fraktionen: 0,6 mg (Smp. $118-119^\circ$), 6 mg (Smp. $117,5-118,5^\circ$), 394 mg (Smp. $117,5-119^\circ$), 384 mg (Smp. $117,5-119^\circ$), also insgesamt 784,6 mg (89%). Da das racemische Tripeptid bei $132-133^\circ$ schmilzt und unter den gewählten Bedingungen zuerst auskristallisiert [22], liegt der Racemisierungsgrad unter der Nachweiskgrenze.

Auch bei analogen Racemisierungstests mit **1b** in Acetonitril und **1c** in CH_2Cl_2 bleibt der Racemat-Anteil unter der Empfindlichkeitsgrenze [3].

4.2. *Young-Test* [23]. 4.2.1. *In CH_2Cl_2* . Wie in 4.1 wird aus 941,1 mg (4 mmol) Benzoyl-leucin, 1050,8 mg (4 mmol) **1c**, 558,4 mg (4 mmol) Glycin-äthylesterhydrochlorid und 404,6 mg (4 mmol) N-Methylmorpholin in abs. Dichlormethan das Dipeptid Benzoyl-leucyl-glycin-äthylester bereitet, $t_1=6$ Std., $t_2=12$ Std. Anstelle von 0,2N HCl wird mit 20 ml 10proz. Citronensäurelösung ausgeschüttelt: 1204 mg (94%) blassgelbes Dipeptid mit korrekter Elementaranalyse¹⁵), Smp. $152-153^\circ$ ([23]: $155-156^\circ$ für reines Dipeptid), $[\alpha]_D^{25} = -32,4^\circ$ ($c=3$, Äthanol) ([23]: $[\alpha]_D^{25} = -34,0^\circ$ ($c=3$, Äthanol) für reines Dipeptid). Daraus berechnet sich ein *Racemat-Anteil* von 4,7%.

4.2.2. *In Dimethylformamid*. Aus 941,1 mg (4 mmol) Benzoyl-leucin, 1050,8 mg (4 mmol) **1c**, 558,4 mg (4 mmol) Glycin-äthylesterhydrochlorid und 404,3 mg (4 mmol) N-Methylmorpholin in abs. Dimethylformamid werden 966 mg (75%) rohes Benzoyl-leucyl-glycin-äthylester mit korrekter Elementaranalyse isoliert. Aus dem Drehwert von $[\alpha]_D^{25} = -29,6^\circ$ berechnet sich der *Racemat-Anteil* zu 12,9%.

4.3. *Racemisierungstest nach Sieber & Riniker* [26]¹⁷). Nach 2.1 und 2.12 wird unter Variation des Lösungsmittels aus 941,1 mg (2 mmol) Z-Asparagyl(*t*-butylester)-phenylalanin, 525,4 mg (2 mmol) **1c**, 335,3 mg (2 mmol) Valin-methylesterhydrochlorid und 202,3 mg (2 mmol) N-Methylmorpholin Z-Asparagyl(*t*-butylester)-phenylalanyl-valin-methylester hergestellt ($t_1=6$ Std., $t_2=18$ Std.). Bei der Aufarbeitung wird anstelle von Salzsäure eine 10proz. Citronensäurelösung verwendet. Das nach dem Eindampfen der Essigester-Phase anfallende rohe Tripeptid wird bei 10^{-2} Torr getrocknet und ohne weitere Reinigung zur Messung der Racemisierung eingesetzt. Dazu wird das Tripeptid bei 100° in Salzsäure einer Totalhydrolyse unterworfen, und die trifluoracetylierten Aminosäuren werden als Isopropylester gas-chromatographisch in L- und D-Enantiomere aufgetrennt [26].

Synthese in CH_2Cl_2 . 1,15 g (98%) blassgelbes Rohprodukt. Gehalt an D-Phenylalanin (nach Abzug des Blindwertes): 2,1%.

Synthese in Acetonitril. 1,062 g (91%) blassgelbes Rohprodukt. Gehalt an D-Phenylalanin (nach Abzug des Blindwertes): 2,4%.

Synthese in Dimethylformamid. 1,109 g (95%) gelbes Rohprodukt. Gehalt an D-Phenylalanin (nach Abzug des Blindwertes): 2,7%.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *M. Neuenschwander, U. Lienhard, H.-P. Fahrni & B. Hurni*, *Helv. 61*, 2428 (1978), dort weitere Zitate.
- [2] *M. Neuenschwander, H.-P. Fahrni & U. Lienhard*, *Chimia 32*, 214 (1978).
- [3] *H.-P. Fahrni*, Dissertation, Bern, November 1977.
- [4] *U. Lienhard*, Dissertation, Bern, April 1977.
- [5] *H.-J. Gais, K. Hafner & M. Neuenschwander*, *Helv. 52*, 2641 (1969); dort weitere Zitate.
- [6] *U. Lienhard, H.-P. Fahrni & M. Neuenschwander*, *Helv. 61*, 1609 (1978).
- [7] *A. Niederhauser & M. Neuenschwander*, *Helv. 56*, 1318 (1973).
- [8] *H.-J. Gais & T. Lied*, *Angew. Chem. 90*, 283 (1978).
- [9] *P. Wolf*, Lizentiatsarbeit, Bern 1973.
- [10] *K. T. Poroschin, V. G. Debow, V. A. Schibnew & T. D. Kozarenko*, *Ž. obšč. Chim 31*, 3006 (1961); *Chem. Abstr. 56*, 15604c (1962).
- [11] *S. Yamada & Y. Takeuchi*, *Tetrahedron Letters 39*, 3595 (1971).
- [12] *S. Yamada & Y. Takeuchi*, *Tetrahedron Letters 39*, 3593 (1971); *H. Faulstich*, *Chimia 23*, 150 (1969).
- [13] *H. T. Huang & C. Niemann*, *J. Amer. chem. Soc 72*, 921 (1950).
- [14] *R. B. Woodward, R. A. Olofson & H. Mayer*, *Tetrahedron Suppl. Nr.8*, 321 (1966).
- [15] *R. B. Merrifield*, *J. Amer. chem. Soc. 85*, 2149 (1963); *idem*, *ibid. 86*, 304 (1964).
- [16] *A. Niederhauser, A. Frey & M. Neuenschwander*, *Helv. 56*, 944 (1973); *M. Neuenschwander & P. Bigler*, *ibid. 56*, 959 (1973).
- [17] *A. Niederhauser & M. Neuenschwander*, *Helv. 56*, 1331 (1973).
- [18] *F. Marchiori, R. Rocchi, L. Moroder, A. Fontana & E. Scoffone*, *J. Amer. chem. Soc. 90*, 5889 (1968).
- [19] *K. Jost, V. G. Debow, H. Nesvadba & J. Rudinger*, *Coll. Czech. chem. Comm. 29*, 419 (1964); *Chem. Abstr. 60*, 8124a (1964).
- [20] *T. Inui*, *Bull. chem. Soc. Japan 44*, 2518 (1971).
- [21] *K. Hofmann, W. D. Peckham & A. J. Rheiner*, *J. Amer. chem. Soc. 78*, 238 (1956).
- [22] *G. W. Anderson & F. M. Callahan*, *J. Amer. chem. Soc. 80*, 2902 (1958).
- [23] *M. W. Williams & G. T. Young*, *J. chem. Soc. 1963*, 881.
- [24] *R. B. Woodward, R. A. Olofson & H. Mayer*, *J. Amer. chem. Soc. 83*, 1010 (1961).
- [25] *Y. S. Klausner & M. Bodansky*, *Synthesis 1974*, 549.
- [26] *P. Sieber & B. Riniker*, *Proc. 11th Europ. Peptide Symp.*, Wien 1971, North-Holland Publishing Comp., Amsterdam 1973.
- [27] *R. Buyle & H. G. Viehe*, *Angew. Chem. 76*, 572 (1964); *idem*, *ibid. Int. Ed. 3*, 582 (1964).
- [28] *F. Weygand, W. König, R. Buyle & H. G. Viehe*, *Chem. Ber. 98*, 3632 (1965).
- [29] *W. Steglich, G. Höfle, W. König & F. Weygand*, *Chem. Ber. 101*, 308 (1968).
- [30] *H. G. Viehe, R. Fuks & M. Reinstein*, *Angew. Chem. 76*, 571 (1964); *idem*, *ibid. Int. Ed. 3*, 581 (1964).
- [31] *R. B. Woodward, R. A. Olofson & H. Mayer*, *Tetrahedron Suppl. Nr.8*, 321 (1966); *R. B. Woodward & D. J. Woodman*, *J. Amer. chem. Soc. 90*, 1371 (1968).
- [32] *R. B. Woodward, D. J. Woodman & Y. Kobayashi*, *J. org. Chemistry 32*, 388 (1967); *D. J. Woodman*, *ibid. 33*, 2397 (1968).