

## QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN ZUM PEPTIDBINDUNGSSCHRITT BEI DER MERRIFIELD-SYNTHESE

G. LOSSE und R. ULBRICH

Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden

(Received in Germany 25 July 1972; Received in the UK for publication 14 August 1972)

**Zusammenfassung**— An den Merrifield-Modellharzen Gly-(P)\*, Val-(P), Gly- $\epsilon$ Acp-(P) und Val- $\epsilon$ Acp-(P) wurde unter Standardbedingungen die Geschwindigkeit der Kupplung mit Boc-Gly und Boc-Val für die DCCI- und Nitrophenylester-Methode gemessen. In matrix-Ferne sind die Umsatzgeschwindigkeiten vorzugsweise durch sterische Hinderung in dem verknüpften Aminosäurepaar bestimmt, während in Matrix-Nachbarschaft zusätzlich die Fixierung der Startaminosäure auf der Matrix massgebend ist. Eine der Reaktion vorgeschaltete Diffusionsperiode für die Kupplungskomponente erhöht die Umsatzrate nicht. Die Adsorptionsmethode führt bei vergleichbaren Molverhältnissen und Konzentrationen gegenüber der üblichen Merrifield-Technik zu teilweise schlechteren Kupplungsausbeuten.

**Abstract**— On the Merrifield-model-resins Gly-(P)\*, Val-(P), Gly- $\epsilon$ Acp-(P) and Val- $\epsilon$ Acp(P) the rate of coupling with Boc-Gly and Boc-Val was measured for the DCCI- and nitrophenylester-method under standard conditions. In matrix-distance the reaction rates are preferentially determined by steric hindrance in the combined amino acid pair, whereas in matrix-vicinity the attachment of the first amino acid to the resin is essential in addition. A diffusion period of the coupling component prior to the reaction does not raise the yields. The adsorption method results in partially worse yields of coupling, using conditions of molar ratio and concentration comparable with the usual Merrifield's technique.

BEI DER Merrifield-Synthese werden die Umsatzraten von einer Vielzahl chemischer und physikalischer Faktoren beeinflusst, deren Kenntnis eine wesentliche Voraussetzung für die kritische Abschätzung der erreichbaren Sequenzlängen ist. Trotz zahlreicher experimenteller Erfahrungen auf diesem Arbeitsgebiet<sup>1</sup> wurden bisher verhältnismässig wenig kinetische Versuche durchgeführt, die Aufschluss über derartige Einflüsse geben.

Erste Geschwindigkeitsmessungen an Merrifield-Harzen führten Gut und Rudinger<sup>2</sup> für die Kupplung mit Nps-Aminosäure-N-hydroxysuccinimidestern aus, wobei sie unterschiedliche Reaktivitäten an den Reaktionszentren des Trägerharzes nachwiesen. Ein Vergleich der Umsatzraten zwischen der N-Hydroxysuccinimidester- und der DCCI-Methode wurde von Weygand und Obermeier<sup>3</sup> vorgenommen. Durch kinetische Messung bei der DCCI-Methode zeigten Esko *et al.*<sup>4</sup> den Einfluss sterischer Faktoren in der Carboxylkomponente auf die Geschwindigkeit der Peptidkupplung. Die unterschiedlichen Reaktivitäten der Kupplungskomponenten unter Standardbedingungen der Merrifield-Synthese wurden von Ragnarsson *et al.*<sup>5</sup> durch gleichzeitige Umsetzung von vier verschiedenen Boc-Aminosäuren mit einem Aminoacyl-

\* Abkürzungen nach den Regeln der IUPAC-IUB-Commission on Biochem. Nomenclature. Z. *physiol. Chem.* **348**, 256 (1967). Darüber hinaus wurden folgende Abkürzungen benutzt: DCCI = N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid; (P) = polymerer Träger; DMF = Dimethylformamid.

Harz bestätigt. Wie durch Karlsson, *et al.*<sup>6</sup> ebenfalls an Modellsystemen nachgewiesen wurde, liegen die Reaktivitäten bei der Nitrophenylester-Methode grundsätzlich niedriger als bei der Arbeitsweise mit DCCI. Bodanszky und Bath<sup>7</sup> bestimmten durch Messung der Halbwertszeiten für Reaktionen mit verschiedenen aktiven Estern die Reaktivitätsabstufungen in homogener und heterogener Phase. Mit der Bildung von Rumpf- und Fehlsequenzen befassten sich Bayer und Hagenmaier<sup>8-10</sup> eingehender. Sie schlugen zur Erhöhung der Kupplungsgeschwindigkeiten und Verminderung der schwer isolierbaren Fehlsequenzen modifizierte Träger vor. Am Modellpeptid (Leu-Ala)<sub>6</sub> wurde auch der Einfluss der Kettenlänge auf sterische Hinderungseffekte untersucht<sup>11</sup> und ein Abfall der Kupplungsausbeuten bei fortschreitender Synthese registriert. Den Einfluss der Trägerstruktur auf den Peptidbindungsschritt untersuchte Losse<sup>12</sup> an verschiedenen makroporösen Harzen.

Die Kupplungsausbeuten bei der Festphasen-Synthese hängen somit auf Grund sterischer Effekte wesentlich von der Struktur der zu verknüpfenden Aminosäuren sowie dem Kupplungsort innerhalb der matrixgebundenen Peptidkette ab. Um diese Verhältnisse systematischer zu erkunden, haben wir an vier Modellharzen

Gly-(P) (Beladung: 0.244 mMol Gly/g Gly-(P))

Val-(P) (Beladung: 0.261 mMol Val/g Val-(P))

Gly-εAcp-(P) (Beladung: 0.144 mMol Gly-εAcp/g Gly-εAcp-(P))

Val-εAcp-(P) (Beladung: 0.140 mMol Val-εAcp/g Val-εAcp-(P))

die Umsatzgeschwindigkeiten und maximalen Umsatzraten für die Kupplung mit Boc-Gly und Boc-Val, d.h. mit sterisch differenzierten Aminosäuren, in unmittelbarer Matrixnähe (Gly-(P): Val-(P)) sowie in grösserem Abstand vom Festkörper (Gly-εAcp-(P): Val-εAcp-(P)) unter Anwendung der DCCI- und der Nitrophenylester-Methode gemessen. Ausserdem wurden eine Reihe weiterer für die Festphasentechnik relevanter Faktoren wie Lösungsmittel- und Diffusionseffekte untersucht. Um zwischen den verschiedenen Systemen vergleichbare Werte zu erhalten, erfolgten alle Versuche unter Standardbedingungen mit 3 Äquivalenten Boc-Aminosäure und 3 Äquivalenten DCCI (bzw. 3 Äquivalenten Boc-Aminosäure-p-nitrophenylester) je

TABELLE 1. REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT VON BOC-AMINOSÄUREN MIT AMINOACYL-POLYSTYROLHARZEN  
(%, bezogen auf die Aminosäurebeladung des Ausgangsharzes)

Kupplungs- methode	Kupplungs- zeit	Boc-Gly + Gly-(P)	Boc-Val + Gly-(P)	Boc-Gly + Val-(P)	Boc-Val + Val-(P)
DCCI in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10 min	73.9 (30.0)*	72.1	87.6	85.7
	30 min	78.8 (41.2)*	74.7	92.2	90.1
	1 h	82.4 (52.5)*	76.3	94.4	92.3
	4 h	89.4 (80.2)*	81.9	96.0	95.8
	16 h	93.4 (87.0)*	85.1	96.8	96.1
	Nachkuppl. 16 h	94.9 (93.2)*	92.5	97.4	97.1
<i>p</i> -Nitro- phenylester in DMF	16 h	81.7	79.5	92.1	64.6
	Nachkuppl. 16 h	87.2	87.4	93.2	79.6

\* Die Reaktion wurde in DMF statt CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durchgeführt.

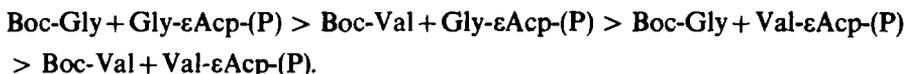
harzgebundenes Äquivalent Aminosäure (bzw. Dipeptid) in 0.1 m Lösung. Als analytische Methode zur quantitativen Umsatzbestimmung diente die Dorman-Variante mit Pyridinhydrobromid, die sich nach unseren früheren Untersuchungen<sup>13</sup> unter den chemischen Methoden als besonders leistungsfähig erwiesen hatte.

TABELLE 2. REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT VON BOC-AMINOSÄUREN MIT PEPTIDYL-POLYSTYROLHARZEN  
(%, bezogen auf die Peptidbeladung des Ausgangsharzes)

Kupplungs- methode	Kupplungs- zeit	Boc-Gly + Gly-εAcp-(P)	Boc-Val + Gly-εAcp-(P)	Boc-Gly + Val-εAcp-(P)	Boc-Val + Val-εAcp-(P)
DCCI in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10 min	86.3	80.8	47.5	25.2
	30 min	87.5	86.3	55.7	39.5
	1 h	90.8	88.8	67.0	51.2
	4 h	93.7	92.3	80.4	72.1
	16 h	93.6	92.0	91.1	82.6
	Nachkuppl. 16 h	93.9	92.3	97.1	94.9
<i>p</i> -Nitro- phenylester in DMF	16 h	83.4	78.8	22.4	15.8
	Nachkuppl. 16 h	87.8	85.2	65.7	30.7

Den Umsatzverlauf der acht möglichen Kupplungskombinationen zeigen die Tabellen 1 und 2. Daraus ergeben sich folgende Aussagen:

1. In Matrix-Ferne (Gly-εAcp-(P) und Val-εAcp-(P)) wird unter diesen Standardbedingungen die Kupplungsgeschwindigkeit mit DCCI nur durch sterische Hinderung in dem zu verknüpfenden Aminosäurepaar bestimmt, d.h. N-terminales Glycin ist reaktionsfähiger als N-terminales Valin. Andererseits verhält sich Boc-Gly als Carboxylkomponente reaktiver als Boc-Val. Daraus resultiert die Reaktivitätsabstufung



Das entspricht den üblichen, auch die homogene Phase betreffenden Beobachtungen.

2. In Matrix-Nachbarschaft (Gly-(P) und Val-(P)) ist in Übereinstimmung mit bisherigen Erfahrungen für den Verlauf der Peptidbildungsreaktion offenbar die durch die Anesterung erfolgte sterische Placierung der ersten Aminosäure massgebend. Glycin kann an der Matrix auch in Positionen fixiert werden, die für die nächste Aminosäure schwerer erreichbar sind, während von dem voluminösen Valin bei der Anesterung von vornherein mehr exponierte Stellen der Matrix besetzt werden. Hierdurch wird unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Tatsache, dass Boc-Gly gegenüber Boc-Val wiederum die reaktivere Carboxylkomponente darstellt, die Reaktivitätsabstufung



erklärt. Damit hängen bereits in einfachen Modellsystemen die Kupplungsraten stark von der Art der Aminosäuren und dem Kupplungsort ab.

3. In DMF erfolgt die Kupplung mit DCCI langsamer als in Methylenechlorid, was auf die bevorzugte Acylharnstoffbildung in DMF zurückzuführen ist.<sup>14</sup> Die Nitrophenylester-Methode erfordert in Übereinstimmung zu l.c.<sup>6</sup> grundsätzlich längere Reaktionszeiten und liefert niedrigere Kupplungsausbeuten als die DCCI-Methode.

4. Selbst unter den günstigsten der hier angewandten Bedingungen sowie Wiederholung des Kupplungsschrittes wird niemals ein annähernd vollständiger Umsatz erreicht. Die DCCI-Methode liefert für alle untersuchten acht Kupplungskombinationen bei Nachkupplung, d.h. insgesamt 32 Stunden Reaktionszeit, eine mittlere Kupplungsrate  $a$  von 95.0%, die Nitrophenylester-Methode entsprechend von 77.1%. Für die theoretische Gesamtausbeute  $P$  (%) eines in  $n$  Kupplungsschritten aufgebauten Peptids ergeben sich nach  $P = (a/100)^n \cdot 100$  die in Tabelle 3 aufgeführten Daten.

TABELLE 3. THEORETISCHE GESAMTAUSBEUTE (%) BEI  $n$  KUPPLUNGSSCHRITTEN

Mittlere Kuppl. ausbeute $a$	Zahl der Kuppl. schritte $n$	5	10	20	50	100
	95.0 (DCCI-Methode)		77.4	59.9	35.8	7.7
77.1 ( <i>p</i> -Nitrophenylester-Methode)		27.2	7.4	0.6	—	—

Die Werte zeigen, dass durch Merrifield-Technik nur Peptide begrenzter Sequenzlänge aufgebaut werden sollten, um einheitliche, definierte Endprodukte isolieren zu können. Dies gilt auch für Reaktionsführungen, in welchen Überschuss und Konzentration der Kupplungskomponenten sowie die Reaktionszeit gegenüber unseren Standardbedingungen weiter erhöht sind.

In Tabelle 4 und 5 sind für die acht Kupplungskombinationen Umsatzraten angeführt, welche (a) unter Standardbedingungen, (b) unter gleichen Bedingungen, aber 4-stündiger Einwirkung der Boc-Aminosäure auf das Harz vor Reaktionsbeginn

TABELLE 4. REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT VON Boc-AMINOSÄUREN MIT AMINOACYL-POLYSTYROLHARZEN BEI VORHERIGER DIFFUSION BZW. ADSORPTION (%), bezogen auf die Aminosäurebelastung des Ausgangsharzes)

Kupplungsbedingungen (DCCI in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Kupplungszeit	Boc-Gly + Gly-(P)	Boc-Val + Gly-(P)	Boc-Gly + Val-(P)	Boc-Val + Val-(P)
a. Standardbedingungen (ohne Diffusionszeit)	10 min	73.9	72.1	87.6	85.7
b. 4 h Diffusionszeit	10 min	74.8	70.8	92.8	83.6
c. 4 h Adsorptionszeit	10 min	64.7	62.5	92.3	79.1

**TABELLE 5. REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT VON Boc-AMINOSÄUREN MIT PEPTIDYL-POLYSTYROLHARZEN BEI VORHERIGER DIFFUSION BZW. ADSORPTION**  
 (% , bezogen auf die Peptidbeladung des Ausgangsharzes)

Kupplungsbedingungen (DCCI in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Kupplungs- zeit	Boc-Gly + Gly-εAcp-(P)	Boc-Val + Gly-εAcp-(P)	Boc-Gly + Val-εAcp-(P)	Boc-Val + Val-εAcp-(P)
a. Standardbedingungen (ohne Diffusionszeit)	10 min	86·3	80·8	47·5	25·2
b. 4 h Diffusionszeit	10 min	89·8	82·9	49·5	27·5
c. 4 h Adsorptionszeit	10 min	89·9	84·7	51·2	27·2

(Diffusionszeit) und (c) unter gleichen Bedingungen, 4-stündiger Einwirkung der Boc-Aminosäure auf das Harz sowie anschließende Entfernung des Überschusses durch Absaugen und Auswaschen vor Reaktionsbeginn (Adsorptionsmethode<sup>15</sup>) erhalten wurden. Gemessen wurde die Anfangsperiode nach 10 min Reaktion, wo Diffusions- und Konzentrationseffekte in der Matrix besonders hervortreten sollten. Man erkennt, dass eine vorgeschaltete Diffusionsperiode die Kupplungsausbeuten nicht merklich beeinflusst. Die Diffusion der Boc-Aminosäuren in das Harz ist damit für die Gesamtreaktion nicht geschwindigkeitsbestimmend. Die Adsorptionsmethode zeigt in vielen Fällen annähernd dieselben Kupplungsraten wie bei den entsprechenden Versuchen ohne Entfernung der überschüssigen Boc-Aminosäuren. Für die Peptidbildung muss daher die Konzentration der an der Matrix adsorbierten Kupplungskomponente geschwindigkeitsbestimmend sein. Sofern das Adsorptionsgleichgewicht stark zugunsten des matrixgebundenen Anteils liegt, kann überschüssige Boc-Aminosäure vor Reaktionsbeginn abgetrennt werden, ohne dass Ausbeuteverluste auftreten. Allerdings trifft dies nicht generell zu. Wie die Versuche an Gly-(P) zeigen, kann in bestimmten Systemen der Waschvorgang ausreichen, um die Boc-Aminosäurekonzentration in der Matrix derart zu reduzieren, dass niedere Kupplungsraten resultieren.

**TABELLE 6. AUSGANGSWERTE DER AMINOACYL-BZW. DIPEPTIDYL-HARZE**

Harz	Chlorgehalt vor Anesterung %	Aminosäurebeladung nach Anesterung mMol/g Harz	Aminosäurebeladung nach Anesterung mMol/g Harz
Gly-(P)	4·22	1·20	0·244
Val-(P)	3·19	0·91	0·261
Gly-εAcp-(P)	3·01	0·86	0·144
Val-εAcp-(P)	3·01	0·86	0·140

#### EXPERIMENTELLER TEIL

1. *Boc-Gly* (Schmp. 88–89°) und *Boc-DL-Val* (Schmp. 118–120°) wurden nach E. Schnabel,<sup>16</sup> *Boc-Gly-ONp* (Schmp. 71°) und *Boc-DL-Val-ONp* (Schmp. 85–87°) nach E. Sandrin<sup>17</sup> dünn-schichtchromatographisch rein gewonnen.

2. *Boc-Dipeptide*. Zur Darstellung von *Boc-Gly-εAcp* und *Boc-DL-Val-εAcp* wurde von εAcp-OBzI·HCl<sup>18</sup> ausgegangen. Nach Freisetzung des Esters mit Triäthylamin/Methylenchlorid (1:1) erfolgte Kupplung der Boc-Aminosäuren mit DCCI in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und danach Verseifung mit 1n NaOH in Dioxan. *Boc-Gly-εAcp*: Schmp. 85–86°. (Gef: C, 54·59; H, 8·31; N, 9·73. C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> erfordert: C, 54·17; H, 8·34; N, 9·73%).

Boc-DL-Val-εAcP: Schmp. 156–158°. (Gef: C, 58.21; H, 9.25; N, 8.31.  $C_{16}H_{30}N_2O_5$  erfordert: C, 58.18; H, 9.10; N, 8.48%).

3. *Aminoacyl- bzw. Dipeptidyl-Polystyrolharze*. Merrifield-Harz (2% mit Divinylbenzol quervernetzt; Korngröße 30–80 µm; Quellung in  $CH_2Cl_2$  5.28 ml/g) wurde mit 85-proz. Monochlordimethyläther und  $SnCl_4$  chlormethyliert<sup>19</sup> sowie mit der betreffenden Boc-Aminosäure bzw. dem Boc-Dipeptid in Äthanol verestert<sup>19</sup> (vgl. Tabelle 6). Die Deblockierung der Aminofunktion erfolgte mit Trifluoressigsäure/Methylenchlorid (1:1).<sup>20</sup> Der Anesterungsgrad wurde mit Pyridinhydrobromid bestimmt (s. 5. Umsatzbestimmung).

4. *Kupplungsreaktion*. Alle Reaktionen wurden in G3-Glasfritten (Volumen 80 ml) mit Absaugvorrichtung<sup>21</sup> durchgeführt. Die Durchmischung der Reaktionskomponenten erfolgte durch Vibration.

Alle Messpunkte wurden durch Einzelsätze von je 0.3–1 g Harz ermittelt. Für alle Quellungs- und Waschkvorgänge wurde das Harz mit jeweils 10 ml Lösungsmittel/g 5 min geschüttelt. Das Molverhältnis DCCI:harzgebundene  $NH_2$ -Gruppen betrug in allen Fällen 3:1.

a. *Standard-Kupplungsbedingungen*. 1. Zweimaliges Quellen des Harzes in dem betreffenden Lösungsmittel der Kupplungsreaktion. 2. Zugabe von 3 Äquivalenten Boc-Aminosäure in 0.1 m Lösung und 3 Äquivalenten DCCI (fest) bzw. 3 Äquivalenten 0.1 m Boc-Aminosäure-nitrophenylester/DMF, bezogen auf 1 Äquivalent harzgebundener Aminogruppe. 3. Absaugen nach der betreffenden Reaktionszeit sowie 3 × Waschen mit dem Lösungsmittel der Kupplungsreaktion ( $CH_2Cl_2$  bzw. DMF), 3 × Äthanol und 3 × DMF (bzw.  $CH_2Cl_2$ , wenn die Reaktion in DMF stattfand).

b. *Kupplung mit Diffusionszeit*. Die einzige Veränderung gegenüber den Standardbedingungen bestand darin, dass festes DCCI erst nach 4-stündiger Einwirkungszeit der Boc-Aminosäure auf das Harz zugesetzt wurde.

c. *Adsorptionsmethode*. Nach der 4-stündigen Einwirkungszeit der Boc-Aminosäure entsprechend b wurde abgesaugt, 3 × mit 10 ml  $CH_2Cl_2$ /g Harz gewaschen und 3 Mole DCCI, bezogen auf 1 Äquivalent harzgebundener  $NH_2$ -Gruppe, in 0.1 m  $CH_2Cl_2$ -Lösung zugesetzt. Für alle weiteren Operationen galten die Standardbedingungen.

5. *Umsatzbestimmung*. Die Kupplungsraten wurden durch die quantitative Bestimmung freier, nicht umgesetzter Aminogruppen nach der Pyridinhydrobromid-Methode<sup>13</sup> ermittelt. Es wurde wie folgt gearbeitet: Schütteln des Harzes (3 min mit jeweils 10 ml/g) 3 ×  $CH_2Cl_2$ , 1 × 0.2n Pyridinhydrobromid/ $CH_2Cl_2$ , 5 ×  $CH_2Cl_2$ , 8 × DMF, danach 1 × Triäthylamin/DMF (1:10) und 8 × DMF. Im Filtrat und den vereinigten Waschlösungen des Neutralisationsschrittes wurde nach Ansäuern mit 1n  $H_2SO_4$  zu 0.3–0.4n Lösung Triäthylaminhydrobromid in einer Konzentration von 0.02–0.25 mMol/l mit 0.01n  $AgNO_3$  titriert (Elektroden: Ag/AgBr: Hg/Hg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Die Standardabweichung der Bromidtitration betrug 0.3% ( $f = 8$ ).<sup>22,13</sup> Jeder Messwert in den Tabellen 1, 2, 4 und 5 stellt den Mittelwert von zwei unabhängigen Kupplungsansätzen dar. Die Standardabweichung der so ermittelten Kupplungsraten betrug 1.4% ( $f = 32$ ).

## LITERATUR

- <sup>1</sup> Übersichtsreferate: J. M. Stewart und J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman, San Francisco (1969); R. B. Merrifield, *Advances in Enzymol.* **32**, 221 (1969); G. Losse und K. Neubert, *Z. Chem.* **10**, 48 (1970); A. Marglin und R. B. Merrifield, *Ann. Rev. Biochem.* **39**, 841 (1970).
- <sup>2</sup> V. Gut und J. Rudinger, *Proc. of the 9th European Peptide Symposium* S. 185 North-Holland, Amsterdam (1968).
- <sup>3</sup> F. Weygand und R. Obermeier, *Z. Naturforsch.* **23b**, 1390 (1968).
- <sup>4</sup> K. Esko, S. Karlsson und J. Porath, *Acta Chem. Scand.* **22**, 3342 (1968).
- <sup>5</sup> U. Ragnarsson, S. Karlsson und B. Sandberg, *Ibid.* **25**, 1487 (1971).
- <sup>6</sup> S. Karlsson, G. Lindeberg und U. Ragnarsson, *Ibid.* **24**, 337 (1970).
- <sup>7</sup> M. Bodanszky und R. J. Bath, *Chem. Comm.* 1259 (1969).
- <sup>8</sup> E. Bayer, *Chem. Labor Betrieb* **20**, 193 (1969).
- <sup>9</sup> E. Bayer, H. Hagenmaier, G. Jung, W. Parr, H. Eckstein, P. Hunziker und R. E. Sievers, *Proc. of the 10th European Peptide Symposium* S. 65 North-Holland, Amsterdam (1971).
- <sup>10</sup> E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W. A. König, W. Brüning, H. Hagenmayer und W. Parr, *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 1735 (1970).
- <sup>11</sup> H. Hagenmaier, *Tetrahedron Letters* 283 (1970).
- <sup>12</sup> A. Losse, *Ibid.* 4989 (1971).

- <sup>13</sup> G. Losse und R. Ulbrich, *Z. Chem.* **11**, 346 (1971)
- <sup>14</sup> N. A. Smart, G. T. Young und M. W. Williams, *J. Chem. Soc.* 3902 (1960)
- <sup>15</sup> K. Esko und S. Karlsson, *Acta Chem. Scand.* **24**, 1415 (1970)
- <sup>16</sup> E. Schnabel, *Liebigs Ann.* **702**, 188 (1967)
- <sup>17</sup> E. Sandrin und R. A. Boissonnas, *Helv. Chim. Acta* **46**, 1637 (1963)
- <sup>18</sup> M. Rothe und K. Gehrke, *Makromolekulare Chem.* **83**, 1 (1965)
- <sup>19</sup> G. Losse, W. Grenzer und K. Neubert, *Z. Chem.* **8**, 21 (1968)
- <sup>20</sup> B. Gutte und R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 501 (1969)
- <sup>21</sup> K. Neubert, Dissertation, TU Dresden (1970)
- <sup>22</sup> K. Doerffel, *Statistik in der analytischen Chemie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1966)