

Kurze Mitteilungen

Maximalumfang: 6 Schreibmaschinenseiten (alles inbegriffen). Bis zum 5. des Monats bei der Redaktion eingehende Manuskripte können günstigenfalls am 15. des folgenden Monats veröffentlicht werden.

Fulven-Dimere und -Trimere. Hinweis auf eine [6 + 4]-Cycloaddition von 6,6-Dimethylfulven*

Beat Uebersax** und Markus Neuenschwander***

Institut für Organische Chemie, Universität Bern, Freiestr. 3, CH-3012 Bern.

Abstract

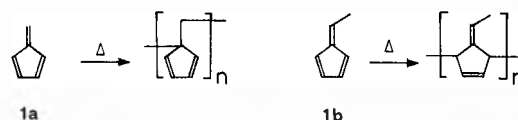
In contrast to earlier assumptions, thermal reaction of simple fulvenes **1a**, **b**, **c** at 20°C gives *Diels-Alder*-dimers **2a**, **b**, **c** in a relatively high yield. Whereas the dimers **2b** and **2c** equilibrate easily with the corresponding fulvenes at 60°C, heating of the fulvene-dimer **2a** produces an equilibrium $2a \rightleftharpoons 3a$. After heating of pure 6,6-dimethylfulvene (**1c**) for several months at 60°C, a trimeric product **6c** is isolated with a 35% yield (60% with respect to reacted **1c**). Formation of **6c** may be explained by a thermodynamically controlled [6 + 4]-cycloaddition of 2 molecules of **1c**, followed by a 1,5-H-shift as well as by *Diels-Alder*-reaction of **5c** with a third fulvene molecule.

1. Einleitung

Obwohl einfache Fulvene bei Cycloadditionen sowohl als 2 π -, 4 π - und 6 π -Komponente reagieren können, setzen sie sich mit Dienen wie Cyclopentadien oder Cyclopentadienonen [3,4] ausschliesslich im Sinne einer *Diels-Alder*-Reaktion (und meist als 2 π -Komponenten) um. In neuerer Zeit haben Houk und Mitarbeiter eingehende Untersuchungen über die Periselectivität von Fulvenen bei Cycloadditionen durchgeführt [5]. Auf Grund von Grenzorital-Betrachtungen wurden Fälle vorausgesagt, in welchen Fulvene als 6 π -Komponente reagieren sollten. Einige dieser Voraussagen sind in der Tat experimentell bestätigt worden [6,7], doch existiert bis heute kein Beispiel einer Fulven-Dimerisation im Sinne einer [6 + 4]-Cycloaddition.

Über das thermische Verhalten von einfachen Fulvenen des Typs **1a**, **b**, **c** ist bis heute wenig bekannt. 1956/58 stellten Thiec und Wiemann fest, dass sich Fulven (**1a**) [8] sowie 6-Methylfulven (**1b**) [9] beim Stehen bei Raumtemperatur innerhalb von Stunden (**1a**) bzw. Tagen (**1b**) in blasse gelbe Gele umwandeln und postulierten auf Grund von IR- und UV-Spektren, dass hochpolymere Verbindungen mit unterschiedlichen Strukturelementen entstanden seien.

Dabei überraschte, daß sich zwei strukturell sehr ähnliche Fulvene in unterschiedlicher Weise (und mechanistisch wenig plausibel) umsetzen sollten. Im Rahmen von

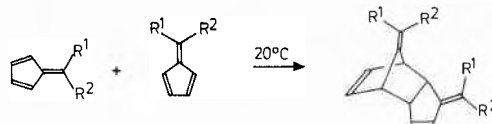


Schema 1: Strukturvorschläge für Fulven-Polymerisate nach [8, 9]

NMR-spektroskopischen Messungen der thermischen Stabilität der Fulvene **1a**, **b**, **c** stellten wir fest, dass die Vorstellungen [8,9] zu revidieren sind.

2. Dimerisation der Fulvene **1a**, **b**, **c** bei Raumtemperatur

Schema 2*:



1a : R ¹ = R ² = H	2a : 65%
b : R ¹ = H, R ² = CH ₃	b : 63%
c : R ¹ = R ² = CH ₃	c : 16%*

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Thiec und Wiemann [8,9] wandelt sich reines Fulven **1a** beim Stehen unter Argon bei 20°C innerhalb eines Tages in einen Gelpropfen um. Misst man die Umsatzgeschwindigkeit im NMR-Spektrometer (die Halbwertszeit beträgt bei 20°C 3,3 Stunden), so beobachtet man definierte Signale eines Produkts, die sehr wohl auf ein [4 + 2]-Dimeres **2a** zutreffen können**. Nach Extraktion des Gels und Aufarbeitung wird mit bis zu 65% Ausbeute ein sauerstoffempfindliches farbloses Öl isoliert, welches im Kühlschrank kristallisiert.

* Wegen sehr langer Reaktionszeit sowie leichter Retro-Diels-Alder-Reaktion kleine Ausbeute an **2c**.

** Die Gelierung des Reaktionsgemisches dürfte auf eine teilweise Umsetzung von **2a** mit weiterem Fulven im Sinne einer *Diels-Alder*-Reaktion zurückzuführen sein. Dabei entstehen Oligomere mit Leiter-Struktur.

* Eingegangen am 15. Juli 1981.

Fulvene, Fulvalene, 34. Mitt., 33. Mitt. [1].

** Teil der Dissertation [2].

*** Korrespondenzautor: Prof. Dr. M. Neuenschwander.

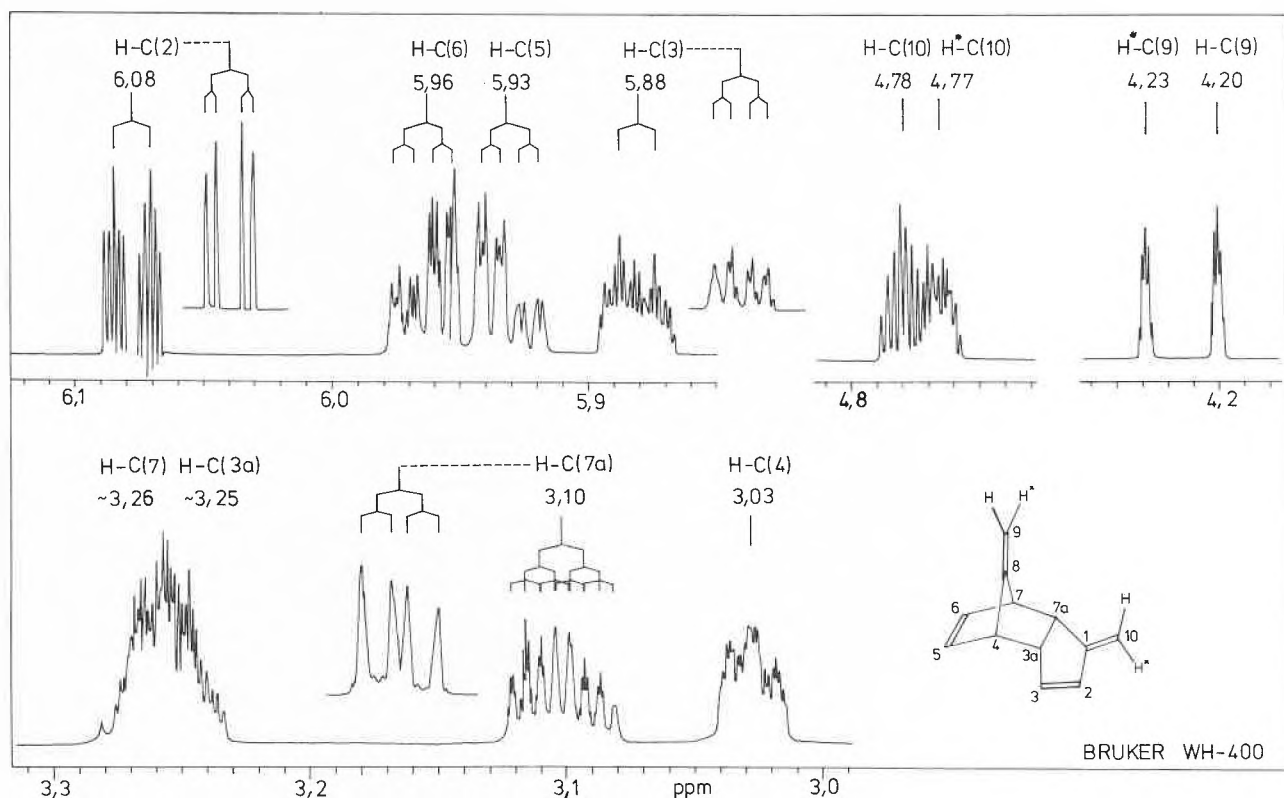


Abb. 1: ^1H -NMR-Spektrum des Fulven-Dimeren **2a** bei 400 MHz. Gedehte Absorptionsbereiche in d_6 -Aceton, restliche Bereiche leer. Eingerückt: Aufspaltung von H_2 , H_3 und H_{7a} bei Entkopplung von H_{10} und H_{10^*} .

Reines 6-Methylfulven (**1b**) setzt sich unter Licht- und O_2 -Ausschluss bei Raumtemperatur wesentlich langsamer um als **1a**: Laut ^1H -NMR-Spektrum sind bei 22°C nach einer Woche rund 50% des Fulvens umgesetzt worden, während die Aufarbeitung nach mehreren Wochen mit 63% Ausbeute zu einem farblosen Öl führt. NMR-Untersuchungen an 6,6-Dimethylfulven (**1c**) bestätigen, dass die thermische Stabilität der Fulvene in der Reihe **1a** < **1b** < **1c** deutlich zunimmt, indem die Halbwertszeit des Umsatzes von (**1c**) zwischen 6 und 10 Monaten liegen dürfte. Bei vorzeitigem Reaktionsabbruch und schonender Aufarbeitung können farblose Nadeln mit Smp. $82\text{--}83^\circ\text{C}$ isoliert werden.

3. Struktur der Fulven-Dimeren

Spektroskopische und analytische Daten lehren, dass die durch thermische Behandlung von **1a**, **b**, **c** gewonnenen Verbindungen Fulven-Dimere sind und strukturell sehr ähnlich aufgebaut sein müssen. Aus der Analyse der 100 MHz- ^1H - und 25 MHz- ^{13}C -NMR-Spektren geht hervor, dass die Dimeren *Diels-Alder*-Addukte sind, wobei die Konfiguration der Addukte vorerst noch offen bleibt.

Dass die isolierten Verbindungen *endo*-Konfiguration aufweisen*, kann einerseits aus einer eingehenden Ana-

* **2b** besteht laut ^{13}C -NMR-Spektrum im wesentlichen aus einem Gemisch von drei *endo*-konfigurierten *Diels-Alder*-Dimeren.

lyse der ^1H -NMR-Spektren bei 400 MHz, andererseits durch ^{13}C -NMR-Vergleich mit Fulven-Cycloaddukten bekannter Konfiguration bewiesen werden. Dies soll am Beispiel des Fulven-Dimeren **2a** kurz aufgezeigt werden. In Abb. 1 ist das 400 MHz ^1H -NMR-Spektrum von **2a** wiedergegeben, wobei die Zuordnung der Signale einerseits auf Grund von typischen Signallagen und Kopplungskonstanten getroffen wird, andererseits aber aus Entkopplungsexperimenten hervorgeht. – Zur Festlegung der Konfiguration dient bei Norbornenen die Grösse der Kopplungskonstanten $J_{3a,4}$ bzw. $J_{7a,7}$ (siehe Abb. 1).

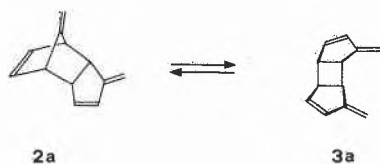
Für *endo*-Isomere (mit *exo*-ständigen Protonen H_{3a} und H_{7a}) erwartet man auf Grund des Diederwinkels Kopplungen $J_{3a,4}$ bzw. $J_{7,7a}$ im Bereich von 3–4 Hz. Für *exo*-Isomere liegen die analogen Kopplungskonstanten nahe bei 0 Hz. Diese Werte können aus dem gedehnten Spektrum (Abb. 1) wegen des komplexen Aufspaltungsbildes nicht direkt entnommen werden. Entscheidend ist die gleichzeitige Entkopplung von H_{10} und H_{10^*} , wobei die Fernkopplungen dieser beiden Protonen gelöscht werden. Davon werden primär H_2 , H_3 und H_{7a} betroffen, wobei H_{7a} als Dublett von Dubletten (vgl. eingerückte Multiplette) erscheint. Die grössere Kopplung von 7,1 Hz entspricht $J_{3a,7a}$, während die kleinere Kopplung von 4,5 Hz = $J_{7,7a}$ die *endo*-Anordnung des Dimeren beweist.

4. Verhalten der Fulvene 1 und Fulven-Dimeren 2 beim Erwärmen

10%ige Lösungen der Dimeren **2b** und **2c** färben sich beim Erwärmen in Benzol tiefgelb, wobei im Falle von **2b** 6-Methylfulven NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden kann, während das Gleichgewicht $2c \rightleftharpoons 1c$ völlig auf der Fulvenseite liegt.

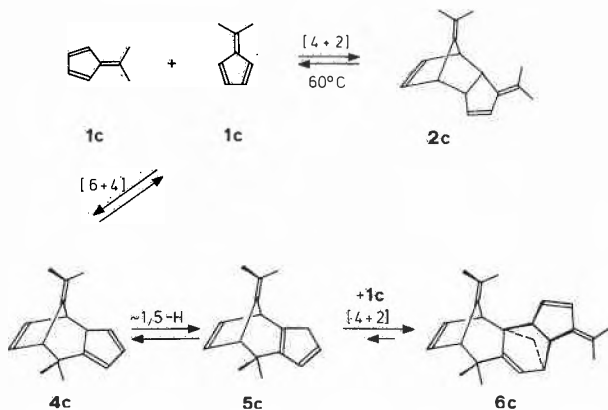
Im Gegensatz dazu tritt beim Erwärmen von 10%igen Lösungen des Fulven-Dimeren **2a** in Benzol am Rückfluss nur eine blassgelbe Farbe auf, und **1a** kann NMR-spektroskopisch nicht nachgewiesen werden. Dafür sind nach einiger Zeit bei 70°C neue Produktsignale erkennbar, und nach rund 15 Stunden hat sich ein Gleichgewicht $2a \rightleftharpoons 3a$ eingestellt, in welchem **3a** im Verhältnis 2,0:1 vertreten ist.

Die Umlagerung $2a \rightarrow 3a$, die in einer formalen 1,3-Wanderung des Dihydrofulven-Teils von **2a** besteht, findet ihr Analogon im thermischen Verhalten von Cyclopentadienon-Dimeren [10]. Die Reaktion ist von der Bildung erheblicher Anteile höhermolekularer Produkte begleitet.



Schema 3: Isomerisierung von **2a** bei thermischer Behandlung

Überraschenderweise führt die thermische Behandlung von 6,6-Dimethylfulven (**1c**) bei 60°C zu einem trimeren Hauptprodukt, das beim Reaktionsabbruch nach 6 Monaten mit einer Ausbeute von 35% (60% bezüglich umgesetztes **1c**) isoliert werden kann. Die Struktur **6c** dieser Verbindung wurde durch eingehende Analyse der ¹H-NMR-Spektren bei 400 MHz weitgehend aufgeklärt und durch Röntgenstrukturanalyse gesichert. Ein plausibler Bildungsmechanismus* ist im Schema 4 formuliert.



Schema 4: Plausibler Bildungsmechanismus von **6c***

Nach Schema 4 wird angenommen, dass neben der nachgewiesenermassen raschen und reversiblen [4 + 2]-Dimerisierung $1c \rightleftharpoons 2c$ gelegentlich auch eine [6 + 4]-Cycloaddition $1c + 1c \rightarrow 4c$ vorkommt. [6 + 4]-Dimerisierungen von Fulven sind auf Grund von Grenzorital-Betrachtungen sehr wohl möglich, jedoch bisher vergeblich gesucht worden. Da 1,5-H-Verschiebungen des Typs $4c \rightleftharpoons 5c$ bei 60°C sehr rasch verlaufen, kann das [6 + 4]-Cycloaddukt **4c** durch die sterisch recht günstige *Diels-Alder*-Reaktion $5c + 1c \rightarrow 6c$ abgefangen werden. Offensichtlich liegt das Gleichgewicht $5c \rightleftharpoons 6c$ bei 60°C stärker auf der Produktseite als das Gleichgewicht $1c + 1c \rightarrow 2c$.

Wir danken der Ciba-Geigy AG, Basel, für die grosszügige finanzielle Unterstützung, Herrn Dr. H. P. Kellerhals (Spectrospin AG, Fällanden) für die 400 MHz ¹H-NMR-Spektren sowie PD Dr. P. Engel (Abteilung für Kristallographie und Strukturlehre, Universität Bern) für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse.

Literatur

- 1 P. Kronig, M. Slongo und M. Neuenschwander: Makromol. Chem. im Druck.
- 2 B. Uebersax: Dissertation, Bern (1979).
- 3 K. N. Houk und L. J. Luskus: J. org. Chem. 38 (1973) 3836.
- 4 K. N. Houk: Topics in Current Chemistry (1978) 1; dort weitere Zitate.
- 5 K. N. Houk, J. K. George und R. E. Duke: Tetrahedron 30 (1974) 523.
- 6 L. C. Dunn, Y.-M. Chang und K. N. Houk: J. Amer. Chem. Soc. 98 (1976) 7095.
- 7 S. E. Reiter, L. C. Dunn und K. N. Houk: J. Amer. Chem. Soc. 99 (1977) 4199.
- 8 J. Thiec und J. Wiemann: Bull. Soc. Chim. France (1956) 177.
- 9 J. Thiec und J. Wiemann: Bull. Soc. Chim. France (1958) 207.
- 10 U. Klinsmann, J. Gauthier, K. Schaffner, M. Pasternak und B. Fuchs: Helv. Chim. Acta 55 (1972) 2643.

* Ein anderer wenig wahrscheinlicher Weg zu **4c** besteht in der Isomerisierung des *endo*-Dimeren **2c** zum *exo*-Isomeren, gefolgt von einer *Cope*-Umlagerung.

Rapid Synthesis of Bradykinin in Solution*

Hanspeter Rolli and Conrad H. Schneider**

Institute for Clinical Immunology, Inselspital, 3010 Bern and Institute for Organic Chemistry, Freiestrasse 3, 3012 Bern

Abstract

Two variants of the two-phase-purification method are examined, using the preparation of bradykinin as a model. In one synthesis, intermediate purification by liquid-liquid extraction was carried out after each completed elongation, in the other, new variant, the extractions were performed after the deprotection steps. If not hampered by technical difficulties the second variant is more efficient.

Introduction

Earlier communications from this laboratory described a strategy for peptide synthesis in solution which consistently uses liquid-liquid extraction (at present in semi-automated form) for the purification of intermediary peptides [1, 2]. Thus far the liquid-liquid extractions were carried out after each elongation step, i.e. the fully protected intermediary peptide was purified¹. Particularly efficient syntheses appear feasible however, if the extractions can be performed after deprotection of the N-terminus of the peptide under elongation. This tactic requires that the N-terminally deblocked peptides are sufficiently lipophilic to withstand extraction. We briefly report here two bradykinin syntheses carried out by the two-phase-purification method using identical amino acid derivatives including δ, ω' -di-Z-arginine and O-benzyl-serine derivatives which should ensure that the peptide remains quite lipophilic during elongations. In one synthesis, the full liquid-liquid extraction program was carried out after the completed elongations, in the other one, only after the deprotection steps.

Experimental

Abbreviations for amino acids (L-configuration) and protecting groups are those recommended by the IUPAC-IUB Com-

* Received August 14, 1981.

** Author to whom correspondence may be addressed: Prof. Dr. C. H. Schneider.

¹ This approach has been referred to as the "two-phase method", based on the picture of a peptide chain being elongated in one (the hydrophobic) phase while being purified by extraction with a second aqueous phase containing acid and subsequently base. This nomenclature appears ambiguous however and in particular may interfere with the term catalytic two-phase reaction used in the field of phase transfer catalysis (E. V. Dehmlow and S. S. Dehmlow: Phase Transfer Catalysis, Verlag Chemie, Weinheim 1980, p. 2). The term two-phase method is therefore replaced by "two-phase-purification method" and the abbreviation TPM stands for the new term.

mission on Biochemical Nomenclature. Further abbreviations are: TFA, trifluoroacetic acid; HOBT, 1-hydroxybenzotriazole; DCC, dicyclohexylcarbodiimide; t.l.c., thin layer chromatography. Protected amino acids and reagents were obtained from Bachem AG, Bubendorf and Fluka AG, Buchs.

The protected bradykinin was prepared according to Fig. 1 using N_α -Boc-protected amino acids and DCC plus HOBT according to König and Geiger [3] for each elongation.

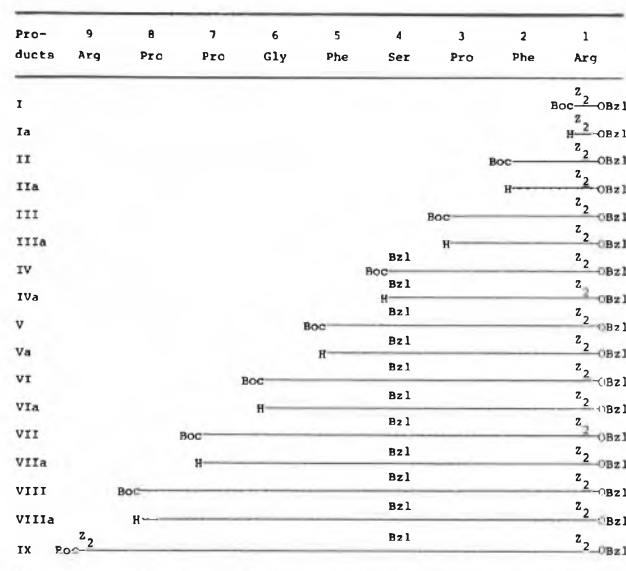


Fig. 1: Outline of bradykinin syntheses.

Synthesis A: The N-protected amino acid derivatives (generally 10% excess with respect to the peptide) were dissolved in a small volume of peroxide-free tetrahydrofuran together with an equimolar amount of HOBT and 10% excess DCC and stirred for 1 hour at 0° and 1 hour at room temp. After filtering off the urea derivative the filtrate was added to the N_α -deprotected peptide in CH_2Cl_2 together with sufficient triethylamine to neutralize the solution. The reaction solvent was tetrahydrofuran/ CH_2Cl_2 (1:1) except for the first two couplings where CH_2Cl_2 was used. The reactant concentration was 0.1–0.15 M and reaction times were 2–3 hours at room temp. After the coupling reactions, 0.3 equivalent of 2-diethylaminoethylamine (with respect to the initial amount of N-protected amino acid) was added and stirring continued for another hour. The reaction solutions were clarified by filtration diluted to 500 ml with CH_2Cl_2 and extracted in the spray column extractor with 0.1 M HCl, H_2O , 0.3 M K_2CO_3 and again H_2O as described previously. The solvent was removed in vacuo at room temp. and the residues dried at the pump. Deprotection was carried out in TFA at room temp. for ½ hours. The bulk of the TFA was removed in vacuo and the residues, after dissolution in 500 ml CH_2Cl_2 were extracted with 3 liters H_2O in the spray column extractor in order to remove any free TFA. Solvent removal in vacuo left the peptide trifluoroacetates which were dried at the pump.

Synthesis B: The N_α -deprotected peptides with again 10% excess amino acid derivative were dissolved in tetrahydrofuran (0.1–0.2 M) and mixed with 5–10% excess DCC and 100%

excess HOBt at 0°. N-ethylmorpholin was used for neutralization. After 1 hour the reaction mixture was further stirred at room temp. for 2 hours or overnight. The urea derivative was filtered off and solvent removal in vacuo at room temp. left a residue from which a 50–100 µg aliquot was run on a t.l.c. plate with chloroform/methanol (9:1) in order to verify that no components stainable with ninhydrin or fluorescamin were left. For N-terminal deprotection the residues were dissolved in 10 ml TFA at 0°, kept for 30 min. at 20° whereupon the bulk of the solvent was removed in vacuo below 40°. The residues were taken up in 500 ml CH₂Cl₂ and extracted with at least 2.5 liters 0.1 M HCl, 0.5–0.8 liter H₂O, 2.5 liters 0.3 M K₂CO₃ and 1.5 liter H₂O in the spray column extractor. The CH₂Cl₂-solvent was then removed in vacuo and the residues were dried at the pump. Product Ia (Fig. 1) was only extracted with H₂O and was thus obtained as the trifluoroacetate.

Total deprotection with HF [4]: The protected bradykinin (1.0 g) from synthesis A together with 0.9 ml distilled anisole was stirred at 0° in 10 ml HF for 60 min. After removal of HF in vacuo the residue was 3 times triturated with ether and the ether removed in vacuo. It was washed with liberal amounts of ether on a filter, dissolved in 150 ml 1 M acetic acid and extracted 3 times with 100 ml ether. The water was removed in vacuo at 35° and the residue taken up again in water. The resulting fine suspension was clarified by filtration and lyophilized. The peptide from synthesis B was similarly reacted in presence of 0.2 ml anisole in 5 ml HF.

Details on t.l.c. and electrophoretic methods were reported previously [2]. For estimating pharmacological potency the Ersparmer method measuring the action on the rat uterus of young virgin rats in full oestrus [5] was used. The reference sample of bradykinin (lot 9104) synthesized according to Nicolaidis and de Wald [6] was obtained from Bachem.

Results and discussion

Yields and chromatographic characterization of syntheses A and B are summarized in Figs. 2 and 3 respectively.

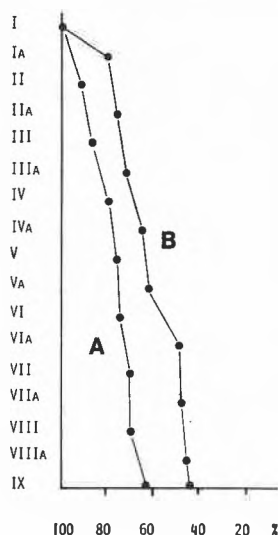


Fig. 2: Overall yields of bradykinin syntheses A and B.

It is to be noted that the decrease in overall yield was similar in both syntheses except for the two intermediates Ia and VIa in synthesis B, where more pronounced losses occurred. In both syntheses a series of trace contaminants were detected. Their removal by additional purification was however not attempted. In particular, the fast mov-

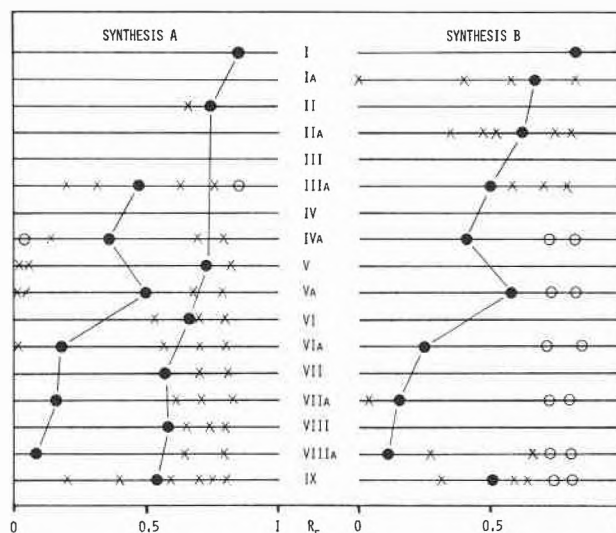


Fig. 3: Characterization of intermediates by t.l.c. in CHCl₃/methanol (9:1). Main products: full dots; side products: empty circles; trace contaminants: crosses.

ing compounds of R_f approx. 0.7 and 0.8 did not undergo further reaction and could be left even in syntheses B where they were found in higher proportions. The R_f 0.7 compound was identified as the dicyclohexylurea derivative.

Total deprotection of 1.0 g of protected bradykinin from synthesis A in HF gave 0.65 g after lyophilization. This material was chromatographed with 50% acetic acid on a 2.5 × 13 cm Amberlite CG-50, 100–200 mesh column. The bulk of the eluted material (460 mg bradykinin after lyophilization) was homogeneous upon high voltage paper electrophoresis (cathodic movement: 68 mm, pH 3.6, 50 Volts/cm; 20 min.). It showed $[\alpha]_D^{22} - 79.1^\circ$ (c 0.9, 1 N CH₃COOH); Lit, $[\alpha]_D^{25} - 76.5^\circ$ [7] and the amino acid ratios were: Ser 0.95; Pro₃ 3.02; Gly 1.04; Phe₂ 2.09; Arg₂ 2.01. In the rat uterus assay it proved equipotent with a bradykinin sample obtained by classical synthesis.

A 100 mg aliquot of nonapeptide IX from synthesis B was deprotected at the N-terminal end with TFA and the residue was chromatographed on 15 g silica gel (2.6 × 12 cm column) with CHCl₃/methanol (9:1). The eluted product (approx. 80%) proved homogeneous upon t.l.c. in CHCl₃/methanol (9:1). This material was fully deblocked with HF and chromatographed on a 1.8 × 34 cm Sephadex-G-15 column with 0.2 M acetic acid. The bulk of the material emerging in fractions 25–35 (2 ml fractions) was lyophilized. It proved homogeneous upon high voltage paper electrophoresis (cathodic movement 67 mm, pH 3.6, 50 Volts/cm; 20 min.) and paper chromatography (R_f 0.80, t-butanol/acetic acid/H₂O, 2:1:1). Amino acid analysis: Ser 0.98; Pro₃ 2.98; Gly 1.03; Phe₂ 2.01; Arg₂ 2.01.

These results show that sufficiently lipophilic protected peptide sequences can be prepared according to synthesis A as well as B. Relatively simple methods of purification were sufficient to give after full deprotection the desired

bradykinin samples in acceptable quality. It is to be expected that inherently less lipophilic sequences could also be prepared according to synthesis B provided specially adapted C-terminal protecting groups such as the p-oxy-methylbenzyl cholestan-3 β -yl succinate residue (-OSuco) [1] are employed. The OSuco group would possibly also help to prevent the pronounced losses due to increased extractions exemplified by the low yields of products Ia and VIa in synthesis B.

The most important simplification of procedure in synthesis B is the fact that diethylaminoethylamine or picolylamine treatments for transforming excess active ester into extractable compounds can be omitted since deprotection with TFA also splits e. g. benzotriazole or hydroxysuccinimide esters. It is also to be kept in mind that highly lipophilic amino acid derivatives will be more easily extracted in the N_α-deblocked form. A further asset is that TFA will be comfortably removed by extraction although the bulk of the acid is best evaporated prior to extraction. It should be emphasized however that emulsion problems during extractions were found in the present and also subsequent work to be more frequent and more severe when the schedule of synthesis B is followed. Therefore only small scale preparations with

the possibility to work at high dilutions can at present be recommended for schedule B syntheses.

Acknowledgements

This work was supported by the Swiss National Science foundation (grants 3.700.76 and 3.318.78). For amino acid analysis on a Beckman-Spinco analyzer we are indebted to Dr. P. Lavanchy, Eidg. Forschungsanstalt, Liebefeld. We thank Prof. H. Reuter, Institute of Pharmacology for providing space and equipment for measuring bradykinin potency and Miss. M. Kings for competently performing the assays.

Literature

- 1 C. H. Schneider, H. Rolli and K. Blaser: *Int. J. Peptide and Protein Res.* 15 (1980) 411.
- 2 H. Rolli, K. Blaser, C. Pfeuti und C. H. Schneider: *Int. J. Peptide and Protein Res.* 15 (1980) 339.
- 3 W. König and R. Geiger: *Chem. Ber.* 103 (1970) 788.
- 4 J. M. Stewart and J. D. Young: *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman, San Francisco 1969.
- 5 J. Trautschold: in *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 25 (O. Eichler, A. Farah, H. Herken and A. D. Welch, eds.), Springer, Berlin 1970, pp. 52-81.
- 6 E. D. Nicolaides and H. A. de Wald: *J. Org. Chem.* 26 (1961) 3872.
- 7 R. B. Merrifield: *Biochemistry* 3 (1964) 1385.