

Abb. 1. Magnetisierung M des Nonacarbens **3** in glasartig erstarrtem MTHF bei 2.1 K (○) und 10.0 K (Δ). Die durchgezogene Linie entspricht dem theoretisch erwarteten Verlauf für den $S = 9$ -Zustand.

Diese Arbeit liefert zwei wichtige Befunde. Erstens ermöglicht das pseudo-zweidimensionale Gerüst von **2** und **3** high-spin-Grundzustände bis zum $S = 9$ -Grundzustand im Nonacarbon **3**. Zweitens gibt es Hinweise darauf, daß die Rotation der Hauptachse der dipolaren Kopplung und der Magnetisierung bei tiefen Temperaturen gehindert ist.

Experimentelles

1,3,5-Tris[3-((3-benzoyl)benzoyl)benzoyl]benzol **4b**: 1,3,5-Tris[3-((3-benzoyl)benzoyl)benzoyl]benzol **4a**, durch Trimerisierung von 1-[3-((3-benzoyl)benzoyl)phenyl]prop-2-in-1-on erhalten, wurde mit $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in Essigsäure zum Nonaketon **6** **4b** oxidiert. Ausbeute nach Reinigung durch Chromatographie an Kieselgel mit einem Hexan/Dichlormethan-Gemisch: 95%. Schmp. = 118–119 °C; IR (Nujol): $\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}] = 1690$ (C=O); FAB-MS: m/z 1016.4 ($M^+ + \text{H}$, 14%), 1015.4 (M^+ , 13).

1,3,5-Tris[diazo(3-(diazo(3-(diazo(phenyl)methyl)phenyl)methyl)phenyl)methyl]benzol **4d**: Das Nonaketon **4b** wurde in das entsprechende Nonahydrazon **4c** durch Zugabe von wasserfreiem Hydrazin und Hydrazinhydrochlorid in Dimethylsulfoxid bei 90 °C überführt. **4c** wurde anschließend mit HgO in einem Benzol/Dichlormethan-Gemisch in Gegenwart einer 3 M-Lösung von KOH in Ethanol oxidiert. Die Lösung wurde 7 d bei Raumtemperatur gerührt, anschließend filtriert und im Vakuum eingedunstet, wobei ein tief-weißes Öl entstand. Sofortige Chromatographie mit Hexan und Benzol an Aluminiumoxid (Woelm neutral, Aktivitätsstufe IV) lieferte die Nonadiazoverbindung **4d** als tiefrotes Öl in 65% Ausbeute. $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , 21 °C): $\delta = 7.43\text{--}6.85$ (m); IR (Nujol): $\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}] = 2060$; UV/VIS (MTHF): $\lambda_{\text{max}}[\text{nm}](\epsilon) = 520$ (950).

Photolyse und magnetische Messungen: Eine Lösung von ca. 20 μg **4d** in 80 μL MTHF in einem Quarz-Probengefäß wurde, in einer supraleitenden Magnetspule (Solenoid) hängend, mit UV-Licht ($480 > \lambda > 400$ nm) bestrahlt. Das UV-Licht wurde durch eine Kombination aus einem Kenko-B-390-Bandpaßfilter und einem OCLI-Typ-B-Kaltlichtspiegel erhalten. Während der magnetischen Messung wurde der Feldgradient gleichbleibend bei 5 Tslam^{-1} gehalten, während das Hauptfeld von 0 auf 7 Tesla gebracht wurde.

Eingegangen am 18. Januar 1993 [Z 5816]

[1] H. C. Longuet-Higgins, *J. Chem. Phys.* **1950**, *18*, 265.

[2] E. Wasserman, L. C. Snyder, W. A. Yager, *J. Chem. Phys.* **1964**, *41*, 1763.

[3] G. Kothe, K.-H. Denkel, W. Sümmermann, *Angew. Chem.* **1970**, *82*, 935; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 906.

[4] I. Fujita, Y. Teki, T. Takui, T. Kinoshita, K. Itoh, F. Miko, Y. Sawaki, H. Iwamura, A. Izuoka, T. Sugawara, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4074, zit. Lit.

[5] N. Nakamura, K. Inoue, H. Iwamura, T. Fujioka, Y. Sawaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1484.

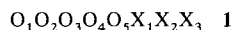
[6] $^1\text{H-NMR}$ -Daten (270 MHz, CDCl_3 , 21 °C): $\delta = 8.41$ (s, 3H; 2,4,6-H), 8.23 (t, $^4J(\text{H,H}) = 1.7$ Hz, 3H; 2'-H), 8.14 (t, $^4J(\text{H,H}) = 1.7$ Hz, 3H; 2''-H), 8.03 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, 3H; 6'-H), 8.00 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, 3H; 4'-H), 7.97 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, 6H; 4'',6''-H), 7.74 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, 6H; 2'',6''-H), 7.62 (t, $^3J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, 3H; 5'-H), 7.57 (t, $^3J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, 3H; 5''-H), 7.52 (t, $^3J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, 3H; 4'''-H), 7.41 (t, $^3J(\text{H,H}) = 8.1$ Hz, 6H; 3'',5'''-H).

Ionenspray-Massenspektrometrie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – Massenspektrometrie von synthetischen Peptidbibliotheken**

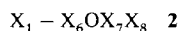
Von Jörg W. Metzger, Karl-Heinz Wiesmüller, Volker Gnau, Jente Brünjes und Günther Jung*

Professor Theodor Wieland zum 80. Geburtstag gewidmet

Synthetische Peptidbibliotheken sind äquimolare Mischungen von immobilisierten oder freien Peptiden mit definierter Länge und Sequenzmotiven, die für das Screening nach neuen Leitstrukturen (z.B. Antibiotica, Enzyminhibitoren) und für die Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen von wachsendem Interesse sind^[1]. Für die Syntheseoptimierung und Charakterisierung solcher komplexen Mischungen werden moderne analytische Methoden benötigt^[2]. Um die Eignung der Ionenspray(IS)-Massenspektrometrie^[3] für diesen Zweck beurteilen zu können, untersuchten wir eine repräsentative Peptidbibliothek aus insgesamt 100 synthetischen 48-Komponenten-Mischungen der Octapeptide **1** (O definierte, X nicht definierte



Positionen, siehe Experimentelles) die das genetisch festgelegte Sequenzmotiv von Peptiden haben, die an den murinen (Maus)Haupthistokompatibilitätskomplex(MHC) der Klasse I mit der Bezeichnung H2-K^b binden^[4]. Daneben wurde eine zweite komplexere Bibliothek analysiert, bestehend aus 24 576 Nonapeptiden **2** (siehe Experimentelles), die das Bin-



dungsmotiv des nichtklassischen murinen MHC der Klasse I mit der Bezeichnung Qa-2^{a[5]} repräsentieren. Solche synthetischen Peptidmischungen ähneln isolierten natürlichen Mischungen mit definierter Länge und „Ankeraminosäuren“ in definierten Positionen^[4–6]. Diese natürlichen Peptide sind Fragmente intrazellulär prozessierter Proteine und werden in der MHC-Bindungstasche cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) präsentiert^[4, 7]. Nach der Erkennung von MHC-gebundenen körperfremden Peptiden, die z.B. aus viralen Proteinen prozessiert wurden, töten virusspezifische CTL die Zelle^[8].

1 und **2** wurden durch Festphasenpeptidsynthese mit einem multiplen Peptidsyntheseautomaten mit Fmoc-Strategie synthetisiert^[1, 6]. Die Peptidmischungen **1** und **2** wurden durch Behandlung des jeweiligen Harzes mit Trifluoressigsäure und anschließender Fällung aus Diethylether gewonnen. Die monoisotopischen relativen Molekülmassen (RMM) der 48 Peptide **1** liegen zwischen 1011.6 (Octapeptid LNYRFSNV) und 1099.5 (Octapeptid LNYRFEKM). Es treten nur 17 unterschiedliche Massenwerte für diese 48 Peptide auf, da einige Peptide der Mischung isobar sind, d.h. eine identische Molekülmasse aufweisen (± 0.1 u).

[*] Prof. Dr. G. Jung, Dr. J. W. Metzger, Dr. K.-H. Wiesmüller, Dipl.-Chem. Volker Gnau, Dipl.-Biol. J. Brünjes
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, W-7400 Tübingen
Telefax: Int. +7071/29-6925

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (SFB 323, Teilprojekt C-3 Metzger und Landesforschungsschwerpunkt Teilprojekt Jung).

Beispielsweise haben acht Peptide dieser Mischung (LNYRFTNL, LNYRFTNI, LNYRFSKL, LNYRFSQI, LNYRFSKI, LNYRFTQV, LNYRFTKV und LNYRFSQL) eine RMM von 1039.6. Das IS-Massenspektrum von **1** zeigt zwei Gruppen von Peaks, mit m/z -Werten, die den einfach protonierten Molekülonen $[M + H]^+$ (m/z 1012.6–1100.5) und den zweifach protonierten Molekülonen $[M + 2H]^{2+}$ (m/z 506.8–550.8) der einzelnen Peptide entsprechen (der Bereich der einfach geladenen Ionen ist in Abb. 1 gezeigt). Mehrfachladungen entstehen durch Protonierung der basischen Zentren der Peptide^[9, 10]. Alle Peptide von **1** enthalten mindestens zwei basische Zentren, den freien N-Terminus und den Arginylrest in Position 4. 16 Peptide von **1** tragen eine zusätzliche positive Ladung am Lysylrest in Position 7. Die dreifach geladenen Ionen $[M + 3H]^{3+}$ dieser Peptide werden zwischen m/z 338.2 und 367.5 beobachtet. Alle erwarteten m/z -Werte für die $[M + H]^+$ -Ionen von **1** können im Massenspektrum gefunden werden (Abb. 1). Die Abwesenheit von zusätzlichen Peaks im Massenspektrum ist ein klarer Hinweis darauf, daß die Mischung keine Nebenprodukte wie Peptide mit Fehlsequenzen (niedrigere Molekülmasse) oder Peptide mit nicht entfernten Schutzgruppen (höhere Molekülmasse) enthält.

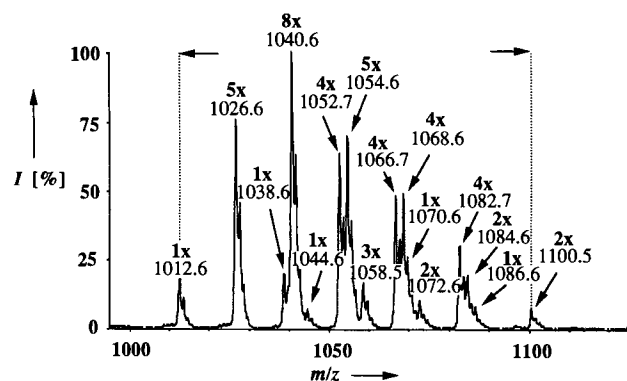


Abb. 1. IS-Massenspektrum der 48-Komponenten-Peptidmischung **1** (Bereich der einfach geladenen Quasi-Molekülonen; die vertikalen, unterbrochenen Linien geben die berechneten m/z -Werte für das leichteste und das schwerste Peptid der Mischung an; die Zahlenwerte über den Peaks entsprechen den m/z -Werten und der dazu gehörigen Zahl isobarer Peptide).

Trotz der möglichen Diskriminierungseffekte (z.B. aufgrund unterschiedlicher Basizität und Hydrophobizität der Peptide) und der Verteilung der Ionenintensität auf mehrere Ladungszustände scheint die Intensitätsverteilung der $[M + H]^+$ -Ionen die Zahl der entsprechenden isobaren Peptide in der Mischung widerzuspiegeln (Abb. 1).

Nebenprodukte der Peptidsynthese können leicht mit IS- und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-IS-Massenspektrometrie detektiert werden^[11, 12]. Im Gegensatz zur HPLC-UV-Detektion kann die HPLC-IS-Massenspektrometrie zwei oder mehrere Peptide, die gleichzeitig eluieren, unterscheiden. Wir haben diese On-line-Technik verwendet, um die Anwesenheit von isobaren Peptiden in **1** nachzuweisen. **1** wurde mit Reversed-Phase-HPLC-IS-Massenspektrometrie analysiert. Nach Optimierung des Gradienten konnten die 48 Peptide zum Teil getrennt werden (vgl. rekonstruiertes Totalionenchromatogramm; Abb. 2a). Das Ionenchromatogramm von m/z 1040.6, welches den monoisotopischen $[M + H]^+$ Ionen von acht verschiedenen Peptiden entspricht, zeigt fünf Hauptpeaks und läßt erkennen, daß drei Peptide mit weiteren Peptiden mit RMM 1039.6 coeluieren (Abb. 2b). Die Massenspektren in den

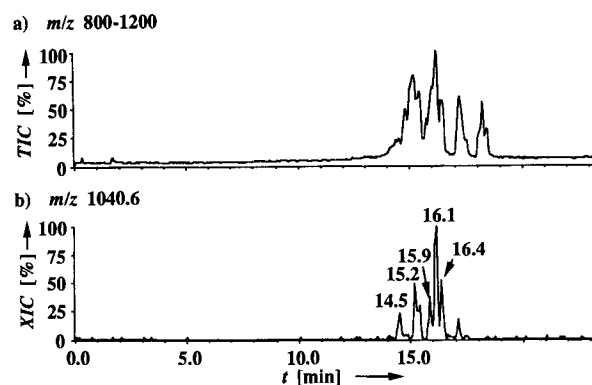


Abb. 2. HPLC-IS-MS von **1**. a) Rekonstruiertes Totalionenchromatogramm (m/z 800–1200) und b) Ionenchromatogramm von m/z 1040.6 entsprechend der monoisotopischen $[M + H]^+$ -Ionen von acht isobaren Peptiden der Mischung (TIC: Totalionenstrom; XIC: extrahierter Einzelionenstrom).

Maxima der fünf Hauptpeaks im Ionenchromatogramm von m/z 1040.6 enthalten nicht nur dieses Ion, sondern auch weitere Ionen, die coeluierenden Peptiden mit anderer Masse entsprechen (Abb. 3). Sequenzinformationen über einzelne Peptide von **1** wurden durch Tandem-Massenspektrometrie^[13] erhalten. Bei Anwesenheit anderer, isobarer Peptide wurde On-line-HPLC-MS/MS durchgeführt (nicht abgebildet).

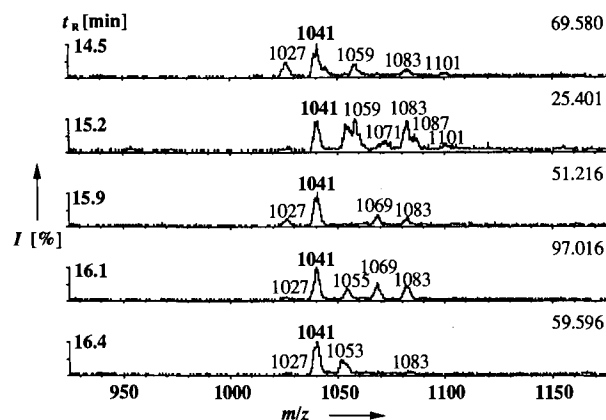


Abb. 3. IS-Massenspektren, die in den Peakmaxima des Ionenchromatogramms von m/z 1040.6 erhalten wurden (t_R : Retentionszeit; vgl. Abb. 2b).

Nicht nur kleine Peptidteilbibliotheken können durch IS-Massenspektrometrie analysiert werden. Das IS-Massenspektrum der 24 576 Nonapeptide **2** (Abb. 4a) ähnelt dem Spektrum der 48-Komponenten-Mischungen **1** (vgl. Abb. 1). Deutlich erkennbar sind Peaks, die den einfach protonierten Molekülonen entsprechen. Die durch vertikale, unterbrochene Linien im Spektrum gekennzeichneten m/z -Werte 977.6 und 1179.5 gehören zu den Massen der $[M + H]^+$ -Ionen, die man für die „leichtesten“ (AITPVIHNI und entsprechende isobare Peptide) und „schwersten“ Peptide (EM-NEIMHEF und entsprechende isobare Peptide) dieser Mischung erwartet.

Die monoisotopischen Massen für $[M + H]^+$ und die jeweils zu einer bestimmten Masse gehörige Zahl verschiedener Peptide der Mischung **2** wurde berechnet (siehe Experimentelles) und gegeneinander aufgetragen (Abb. 4b). Diese Darstellung kommt dem IS-Massenspektrum von **2**

(Abb. 4a) sehr nahe. Wie im Falle der 48-Komponentenmischung korreliert die beobachtete Intensitätsverteilung von $[M + H]^+$ ungefähr mit der Zahl der isobaren Peptide (siehe oben) und ermöglicht deshalb Rückschlüsse auf die Zusammensetzung solcher komplexer Mischungen. Ausführlicher untersucht werden diese quantitativen Aspekte gegenwärtig an definierten Mischungen, hergestellt aus einzelnen, gereinigten Peptiden.

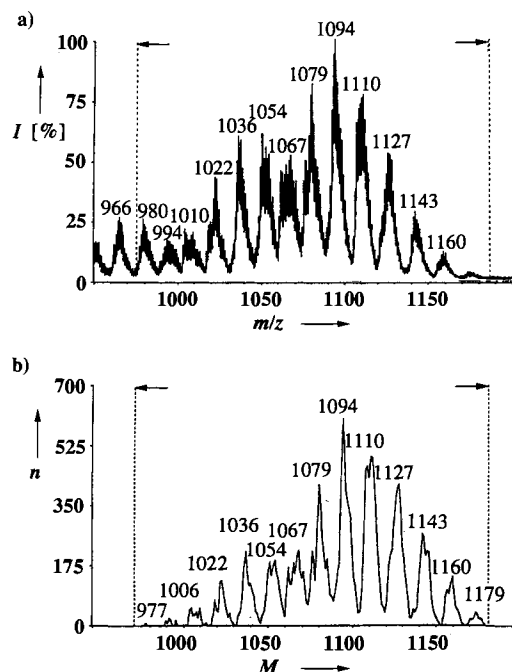


Abb. 4. a) IS-Massenspektrum der synthetischen, 24 575 Komponenten umfassenden Nonapeptidbibliothek 2 (Bereich der einfach geladenen Quasi-Molekülonen; die vertikalen, unterbrochenen Linien geben die berechneten m/z -Werte für die leichtesten und schwersten Peptide der Mischung an). b) Berechnete Anzahl n von Peptiden einer bestimmten RMM aufgetragen gegen die monoisotopischen Massen M der $[M + H]^+$ -Ionen.

Fassen wir zusammen: Die IS-Massenspektrometrie allein oder in Kombination mit HPLC ist eine wertvolle Methode, um die Identität (z.B. die Differenzierung zwischen einer Hexa- und einer Octapeptidbibliothek), die Zusammensetzung und die Reinheit einfacher, aber auch komplexerer Peptidmischungen abzuschätzen. Eine eindeutige und detaillierte Charakterisierung der einzelnen Peptide (z.B. Sequenzinformation) ist nur mit Mischungen aus einer kleineren Zahl von Peptiden möglich. Auch wenn unsere Erfahrungen mit Peptidbibliotheken bisher noch begrenzt sind, zeichnet sich doch ab, daß die Herstellung und das Testen von Peptidgemischen mit sehr vielen Komponenten nur von eingeschränkten Nutzen sein wird.

Experimenteller Teil

Peptidsynthese. Die Synthese von 100 Mischungen der Octapeptide **1** (definierte Positionen: O_1 : R,I,L,S,A; O_2 : N; O_3 : Y,P; O_4 : R,D,E,K,T; O_5 : F,Y; nicht definierte Positionen: X_1 : T,I,E,S; X_2 : N,Q,K; X_3 : L,M,I,V) wurde unter Verwendung von vorgemischten Fmoc- X_2 -Wang-Harzen (*p*-Benzyloxybenzylalkohol-Polystyrol, quervernetzt mit 1%-Divinylbenzol) und der Fmoc/tBu-Strategie durchgeführt. Die feuchten Harze wurden in gleiche Mengen geteilt und mit den geschützten Aminosäuren X_2 und nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit den Aminosäuren X_1 jeweils in dreifachem Überschuß gekuppelt. TBTU (*O*-Benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluorborat) diente als Aktivierungskomponente. Gleiche Teile des Fmoc- $X_1X_2X_3$ -Harzes wurden mit einem multiplen Peptidsyntheseautomaten (SMPs 350, Zinsser Analytic, Frankfurt) zu Octapeptidmischungen verlängert (vgl. Literaturhin-

weise in [1]). Nach Abspaltung der Peptidmischungen von den Harzen (Trifluoressigsäure/Thioanisol/Thiocresol 190:5:5, v:v:v) wurde die synthetische 48-Komponenten-Mischung LNYRFX₁X₂X₃ für die massenspektrometrische Analyse ausgewählt.

Identische Verfahren wurden für die Synthese und Abspaltung der Nonapeptidbibliothek **2** verwendet (definierte Position: O: H; nicht definierte Positionen: X_1 : A,E,K,Q; X_2 : M,I,L,Q; X_3 : L,I,L,N,T; X_4 : D,E,K,P; X_5 : V,I; X_6 : M,I,L,K; X_7 : E,Q,N,K; X_8 : L,I,F).

IS-Massenspektrometrie: Die synthetischen Peptidmischungen (ca. 100 µg) wurden in Methanol/1 proz. Ameisensäure (1:1, 1 mL) gelöst. IS-Massenspektren wurden mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer API III, ausgestattet mit einer Ionensprayquelle (druckluftunterstütztes Elektrospray) [3] aufgenommen (Sciex, Thornhill, Ontario, Canada). Die Lösungen wurden kontinuierlich mit einer medizinischen Infusionspumpe (Modell 22, Harvard Apparatus, South Natick, USA) bei einer Flußgeschwindigkeit von 5 µL min⁻¹ zugeführt. Die beiden Quadrupole Q_1 und Q_3 wurden mit Caesiumiodid kalibriert. IS-Massenspektren wurden mit Einheitsauflösung aufgenommen (Massenbereich: m/z 800 bis 1200; Schrittweite 0.1 Da; Akkumulationszeit: 10 ms pro Schritt). Fünf bis acht Spektren wurden aufsummiert. Die Spannung an der Sprühnadel lag bei +4.9 kV. Spektren mit einfach, zweifach und dreifach geladenen Quasi-Molekülonen wurden bei einer Orifice-Spannung von 60 V aufgenommen. Eine höhere Spannung von 120 V wurde gewählt, um die Intensität von $[M + H]^+$ zu verstärken und die Bildung der mehrfach geladenen Ionen zu unterdrücken. Die Massenwerte über den (nicht zentrierten) Massenpeaks in den Massenspektren (Abb. 1–4) entsprechen den Werten in den Peakmaxima. In Übereinstimmung mit der natürlichen Isotopenverteilung sind die experimentell bestimmten Intensitäten für die monoisotopischen $[M + H]^+$ Ionen (berechnet mit $C = 12.000$) höher als die Intensitäten der Ionen mit dem Isotop ¹³C. Die Genauigkeit der Massenbestimmung beträgt ±0.1 u. Tandem-Massenspektrometrie (kollisionsinduzierte Dissoziation) wurde mit Argon als Kollisionsgas durchgeführt.

Für On-line-HPLC-MS wurde ein Applied Biosystems ABI 140A HPLC-System mit Narrow-Bore-Säule (Nucleosil C-18, 2 × 100 mm; 5 µm; Grom, Herrenberg) und einer Vorsäule (2 × 10 mm; gleiches Füllmaterial) bei einer Flußgeschwindigkeit von 200 µL min⁻¹ verwendet. Ein linearer Gradient von 5 auf 20% Eluent B innerhalb von 40 min wurde verwendet (Eluent A: 0.1proz. wäßrige Trifluoressigsäure; Eluent B: 0.1proz. Trifluoressigsäure in Acetonitril). Der Fluß wurde geteilt, so daß 40 µL min⁻¹ in das IS-Interface gelangten. Etwa 500 pmol der Mischung **1** gelöst in 5 µL Wasser wurden auf die Säule gegeben.

Computerprogramm: Ein Programm für die Berechnung der Molmassen und der Anzahl der dazu gehörigen Peptide wurde entwickelt, das alle möglichen Permutationen erzeugt, wie sie von den variablen Positionen innerhalb der Peptidsequenz definiert werden. Zur Bestimmung der Massenverteilung wurden die Massen der jeweiligen Peptide auf ganzzahlige Werte auf- oder abgerundet und diese Werte gezählt. Um die Zuordnung zusätzlicher Massenpeaks von Nebenprodukten im IS-Massenspektrum zu erleichtern, lassen sich die Massen für Peptide mit nicht abgespaltenen Schutzgruppen oder mit Fehlsequenzen ebenfalls berechnen und darstellen.

Eingegangen am 17. Dezember 1992,
ergänzte Fassung am 26. Januar 1993 [Z 5723]

- [1] G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 375–391; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 367–383.
- [2] J. W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, S. Stevanović, G. Jung in *Peptides 1992 (Proc. 22nd Eur. Pept. Symp. Interlaken, Schweiz, 1992)* (Hrsg.: C. Schneider, A. Eberle), Escom, Leiden, **1993**.
- [3] A. P. Bruins, T. R. Covey, J. D. Henion, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2642–2646.
- [4] K. Falk, O. Röttschke, S. Stevanović, G. Jung, H.-G. Rammensee, *Nature* **1991**, *351*, 290–296.
- [5] O. Röttschke, K. Falk, S. Stevanović, B. Grahovac, M. J. Soloski, G. Jung, H.-G. Rammensee, *Nature* **1993**, *361*, 642–644.
- [6] S. Stevanović, K.-H. Wiesmüller, J. W. Metzger, A. G. Beck-Sickinger, G. Jung, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 431–436.
- [7] N. Zimmermann, O. Röttschke, K. Falk, D. Rognan, G. Folkers, H.-G. Rammensee, G. Jung, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 928–931; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 886–890.
- [8] A. Townsend, H. Bodmer, *Annu. Rev. Immunol.* **1989**, *354*, 601–624.
- [9] T. R. Covey, R. F. Bonner, B. I. Shushan, J. Henion, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **1988**, *2*, 249–256.
- [10] R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, H. R. Udseth, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 882–899.
- [11] A. Beck-Sickinger, G. Schnorrenberg, J. Metzger, G. Jung, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *38*, 25–31.
- [12] H. Dürr, A. G. Beck-Sickinger, G. Schnorrenberg, W. Rapp, G. Jung, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *38*, 146–153.
- [13] D. F. Hunt, J. R. Yates, J. Shabanowitz, S. Winston, C. R. Hauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 6233–6237.