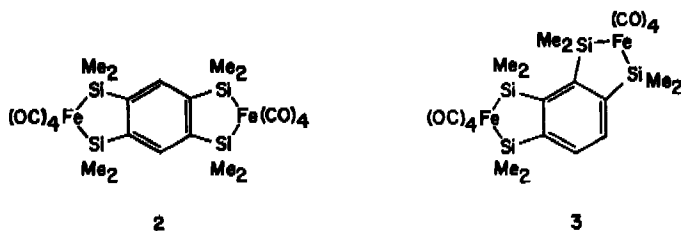


[Smp. 228–230° (Hexan), Ausbeute 84%; NMR. (CDCl₃): 0,68 (s, 12 H Methyl), 0,93 (s, 12 H, Methyl), 7,53 (s, 2 H-arom.); MS. (70 eV): 641/5 (M⁺ - 1), 613/50, 557/56, 501/100, 473/27, 445/54, 417/54].



Die IR.-Spektren der Komplexe (in Cyclohexan) zeigen neben den charakteristischen Banden des aromatischen und aliphatischen Teils sowie von $\nu(\text{Si-CH}_3)$, die Absorptionen terminaler CO-Gruppen bei 2070–1975 cm^{-1} , jedoch keine Banden von Brücken-CO-Liganden.

Die luftstabilen, in unpolaren Lösungsmitteln gut löslichen Verbindungen kristallisieren in stark lichtbrechenden, farblosen Kristallen. Auffallend ist die hohe thermische Beständigkeit von **2** (nur geringe Zersetzung beim Schmelzpunkt) sowie der bei allen Komplexen im NMR.-Spektrum zu beobachtende starke Abschirmungseffekt der $\text{Fe}(\text{CO})_4$ -Gruppe.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. Fink, *Helv.* 57, 1010 (1974).
 [2] W. Fink, in Vorbereitung.

157. Photoaffinitätsmarkierung von Chymotrypsin.

Synthese der photolysierbaren Liganden

von Emanuel Escher und Robert Schwyzer¹⁾

Institut für Molekularbiologie und Biophysik
 Eidgenössische Technische Hochschule, CH -8049 Zürich

(6. VI. 75)

Summary. The syntheses of *m*-azido-L-phenylalanine, *p*-azido-*o*-nitro-L-phenylalanine, Z · Ala-Ala-Xxx · OH, and Z · Ala-Ala(β -³H)-Xxx · OH, with Xxx = Phe, Phe(*p*-NO₂), Phe(*p*-N₃), Phe(*m*-N₃), and Phe(*p*-N₃, *o*-NO₂) are described. The tripeptides with substituted phenylalanine residues are reversible inhibitors of chymotrypsin in the dark, and irreversible ones in the light. Photoaffinity labelling of chymotrypsin has been reported by the authors in *FEBS Letters* 46, 347 (1974).

Photoaffinitätsmarkierung bedeutet den kovalenten Einbau durch photolytische Prozesse eines radioaktiv markierten oder sonstwie gekennzeichneten Liganden in

¹⁾ Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die Unterstützung dieser Arbeit. Die Abkürzungen entsprechen den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur, vgl. E. Wünsch: «Synthese von Peptiden», Bd. 15, Teil 1 von «Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie», E. Müller, Herausgeber, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974.

ein Protein, zu welchem der Ligand eine spezifische, reversible Affinität besitzt. Die Methode könnte bedeutsam werden für die exakte chemische Charakterisierung derjenigen Oberflächenelemente eines Proteins, welche für die Spezifität – für das «Erkennen» des Liganden – verantwortlich sind. Uns interessiert sie besonders im Hinblick auf die chemischen Mechanismen der Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung und der Informations-Transduktion durch die Zellmembran.

Als Modellversuch beschrieben wir kürzlich [1] die Photoaffinitätsmarkierung von Chymotrypsin mit verschiedenen Liganden vom *Berger-Bosshard*'schen Tripeptid-Inhibitor-Typus $Z \cdot \text{Ala-Ala-Xxx} \cdot \text{OH}$ [2], wobei Xxx entweder einen Phenylalanin-, *p*-Nitrophenylalanin-, *p*-Azido-phenylalanin-, *m*-Azido-phenylalanin-, oder *p*-Azido-*o*-nitro-phenylalanin-Rest der 1-Reihe bedeutet. Der Zweck der Versuche war, festzustellen, ob *p*-Azido-phenylalanin [3] für die Photoaffinitätsmarkierung (besonders bei relativ kleinen Affinitätskonstanten der Grössenordnung 10^4 l/mol) brauchbar sei, und welche Parameter für diese noch junge Technik zu berücksichtigen wären. Das gewählte System schien uns dazu besonders geeignet, weil bekanntlich aromatische Seitenketten von Chymotrypsin-Inhibitoren durch *van der Waals*-Kräfte in besonders enge Wechselwirkung mit einer «Spezifitäts-Tasche» der Enzymoberfläche treten [4].

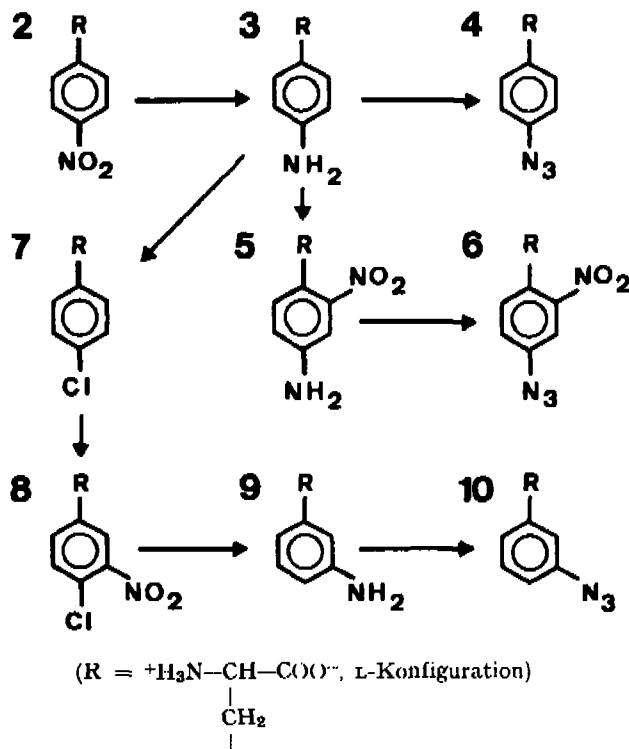
Als wichtigste Ergebnisse erhielten wir: 1) Alle Tripeptide inhibieren Chymotrypsin im Dunkeln in kompetitiver Weise, im Lichte inhibieren die *ar*-substituierten aber irreversibel; 2) *p*-Nitro-phenylalanin ist unerwarteterweise ein ausgezeichnet photolysierbares und covalent einbaubares Phenylalaninderivat, welches bei 365 nm mit guter Quantenausbeute reagiert; 3) *p*-Azido-phenylalanin und *m*-Azido-phenylalanin reagieren – obwohl sie nicht bathochrom substituiert sind – ebenfalls mit Licht von 365 nm Wellenlänge; die dabei entstehenden Nitrene sind genügend reaktionsfähig, um die Inhibitoren covalent einzubauen (vgl. unsere diesbezüglichen, früheren Befürchtungen [5]) (es erübrigt sich also die Einführung einer Nitrogruppe); 4) Die Art und Weise der Reaktion mit der «Spezifitätstasche» scheint von der Lage des stickstoffhaltigen Substituenten (*m* oder *p*) abhängig zu sein – was für einen wohldefinierten Komplex eigentlich zu erwarten wäre.

In dieser Arbeit beschreiben wir die Synthese der Liganden und des *m*-Azido-phenylalanins sowie des *p*-Azido-*o*-nitro-phenylalanins. Gegenstände künftiger Publikationen werden der Photolysemechanismus des *p*-Nitrophenylalanins und die Untersuchung der Reaktionsprodukte mit Chymotrypsin sein.

ar-Substituierte Phenylalanine (siehe Schema). Ausgangsprodukt für alle Synthesen war *p*-Amino-phenylalanin (3), welches nach *Bergel & Stock* [6] aus Phenylalanin (1) via *p*-Nitro-phenylalanin (2) gewonnen und früher schon zur Synthese von *p*-Azido-phenylalanin (3) verwendet worden war [3]. Zur Herstellung von *p*-Azido-*o*-nitro-phenylalanin (6) wurde 2 in konz. Schwefelsäure ungeschützt nitriert und das isolierte Produkt (5) durch Spektrenvergleich mit Nitro-toluidin-Isomeren als *p*-Amino-*o*-nitro-phenylalanin identifiziert. Die Diazotierung und Umsetzung mit Natriumazid zu 6 verlief glatt; das Produkt war jedoch äusserst lichtempfindlich und durfte nur in der Dunkelkammer verarbeitet werden. Inzwischen haben *Fahrenholz & Schimmack* [7] ebenfalls eine Synthese von 6 beschrieben; das Produkt scheint identisch mit dem von uns früher erhaltenen [1] zu sein.

Zur Herstellung des *m*-Azido-phenylalanins (10) wurde die *p*-Stellung durch die *Sandmeyer*-Reaktion an 3 durch Chlor geschützt. Anschliessende Nitrierung, kataly-

Schema



tische Hydrierung, Diazotierung und Umsatz mit Natriumazid führte ohne Schwierigkeiten zum gewünschten Produkt.

Benzyloxycarbonyl-tripeptide. Die Chymotrypsin-Inhibitoren Z · Ala-Ala-Xxx · OH wurden nach der Methode von *Bosshard & Berger* [2] aus dem Aktivester Z · Ala-Ala · OSU und der freien Aminosäure (H · Xxx · OH = 1, 2, 4, 6 oder 10) hergestellt und als I-1, I-2, I-3, I-4, I-6 und I-10 bezeichnet. Für die Herstellung radioaktiv markierter Verbindungen wurde Z · Ala-Ala(β -³H) · OSU verwendet, um vorderhand die Synthese radioaktiv markierter Phenylalaninderivate zu vermeiden. Das Vorliegen des substituierten Phenylalaninrestes in der L-Form wurde nicht streng bewiesen. Die Messung der Drehungen von I-2 bis I-10 ist natürlich von Zersetzung durch Photolyse begleitet (besonders bei 365 und 436 nm). Die Werte sind überall gleich oder höher als für I-1, welches zu mindestens 95% L-Phenylalanin enthält; sie sind aber nicht beweisend, weil die Kristallisation Diastereomere nicht unbedingt abtrennt. Die Dünnschichtchromatographie der Benzyloxycarbonyl-tripeptide zeigt allerdings keine Anzeichen des Vorliegens einer diastereomeren Verbindung in nennenswertem Masse.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Smp. wurden in offenen Kapillaren bestimmt und sind uncorr. (Aminosäuren zersetzen sich oberhalb etwa 150°, weshalb auf die Bestimmung verzichtet wurde). Die Elementaranalysen verdanken wir Herrn *Manser*, Laboratorium für organische Chemie der ETH-Z. H-NMR.-Spektren (δ in ppm) wurden mit einem *Varian T60* Spektrometer, IR.-Spektren ($\tilde{\nu}$ in cm⁻¹) mit

einem Beckman IR 33 und die optischen Drehungen mit einem Perkin-Elmer 141 Polarimeter bestimmt. Zur Dünnschichtchromatographie (DC.) wurden Merck-Silicagel-Platten und folgende Fließmittel verwendet: BAW = 1-Butanol/Eisessig/Wasser 5:2:3 (v/v) und CME = Chloroform/Methanol/Eisessig 95:5:3 (v/v). Entwickelt wurde mit Joddämpfen, mit Ninhydrin, oder mit Reindel-Hoppe Reagens. Radioaktive Dünnschichtplatten wurden 10 Tage auf Ilford HP4-Film gelegt und dieser dann mit Microphen Ilford entwickelt. Die Entsalzung der Aminosäuren wurde wie folgt ausgeführt: In einer Schüttelapparatur von 1 l Fassungsvermögen wurden die Aminosäurelösung und 100 g Ionenaustauscher Dowex 50 W-8 bei einem totalen Volumen von ca. 1/2 l während 30 Min. geschüttelt. Die wässrige Phase wurde abgesaugt und verworfen, das Harz neutral gewaschen und 2mal mit je 1/2 l 10proz. NH_3 -Lösung während 30 Min. extrahiert. Lichtschutz: Arbeiten mit **2**, **4**, **8** und **10** wurden unter Ausschluss von Tages- und Fluoreszenzlampe-Licht mit Glühlampen-Belichtung, die Synthese von **6** in der photographischen Dunkelkammer und Peptidsynthesen mit **6** bei Natrium-Licht ausgeführt.

p-Amino-*o*-nitro-phenylalanin (**5**). 1,8 g **3** (10 mmol) wurde in 15 ml konz. Schwefelsäure gelöst und im Eis/Methanol-Bad gerührt. Nach Eintropfen von 1,0 ml 100proz. Salpetersäure (25 mmol) wurde bei -20° 4 Std. weitergerührt. Die Mischung wurde auf 500 g Eis gegossen und in der Hitze mit Bariumhydroxid neutralisiert. Das ausgefallene Bariumsulfat wurde abfiltriert, die gelbe Lösung eingedampft, entsalzt und das Produkt aus Wasser mit 2-Propanol umkristallisiert. DC. (BAW) einheitlich, Rf 0,50 (gelb). - IR.: 3440 s und 3340 s (N-H); 1520 s und 1450 s (NO_2). - NMR.: 7,0 bis 7,2 (m, 3 H, s. Fig. 1); 3,15 bis 3,35 (q, 1 H); 2,9 bis 3,1 (m, 2 H). - Ausbeute: 1,2 g (5,3 mmol), 53%.

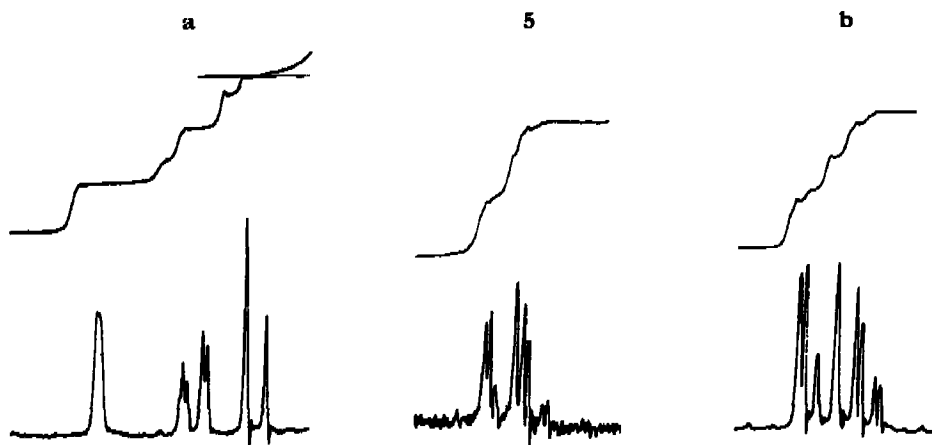


Fig. 1. Bestimmung der Substituentenanordnung von **5** mittels NMR. (Aromatenregion) durch Vergleich mit **a** und **b** (**a** = 3-Nitro-*p*-toluidin; **b** = 2-Nitro-*p*-toluidin)

p-Amino-*o*-nitro-phenylalanin (**6**). 0,90 g **5** (4 mmol) wurden in 50 ml 6N Salzsäure gelöst. Unter Eiskühlung wurde eine wässrige Lösung von 305 mg Natriumnitrit zugegeben und 1 Std. weitergerührt. Zur Entfernung von überschüssigem Nitrit wurde während 10 Min. bei 10 Torr entgast. Anschliessend wurde eine wässrige Lösung von 280 mg Natriumazid (4,4 mmol) langsam eingerührt und nach 1 Std. die Salzsäure im Hochvakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und entsalzt. Aus 2-Propanol wurde umkristallisiert und anschliessend getrocknet. DC. (BAW) einheitlich, Rf 0,65. - IR.: 2100 (N_3); 1530 und 1460 (NO_2). - NMR.: 7,0 bis 7,2 (m, 3 H); 3,15 bis 3,35 (m, 1 H); 2,9 bis 3,1 (m, 2 H). - Ausbeute: 669 mg (2,66 mmol), 66%.

$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_4$ (251,20) Ber. C 55,72 H 2,81 N 21,67% Gef. C 55,85 H 2,91 N 21,51%

p-Chlor-*m*-nitro-phenylalanin (**8**). 54,0 g **3** (300 mmol) wurden in 600 ml 4N Salzsäure gelöst, im Methanol-Eisbad gekühlt und unter Rühren eine wässrige Lösung von 20,7 g Natriumnitrit (300 mmol) langsam zugegeben. Anschliessend wurde 1 Std. evakuiert (bis Nitritprobe mit Jodstärkepapier negativ). Diese Diazoniumlösung wurde langsam in 400 ml 20proz. Salzsäure, 10 g

Kupfer(I)-chlorid und 3 g Kupferpulver enthaltend, eingetragen. Nach beendeter Gasentwicklung wurde das Gemisch bei 4° über Nacht stehen gelassen, das Unlösliche abfiltriert und die Mutterlauge im Vakuum eingengt und nochmals filtriert. Ausbeuten: 1. Fällung 53,0 g getrocknetes Hydrochlorid, 2. Fällung 9,2 g. Gesamtausbeute 61,2 g (260 mmol), 86%. Das braune Hydrochlorid war im DC. einheitlich (BAW), Rf 0,60. DC., NMR. und IR. identisch mit *rac.*-7 von BDH London.

4,5 g freies 7 (22,5 mmol durch Entsalzen hergestellt) wurden in 15 ml konz. Schwefelsäure gelöst und unter Rühren im Eis/Methanol-Bad 1,0 ml 100proz. Salpetersäure (25,5 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde 2 Std. weitergerührt und dann auf das 5fache Volumen Eis gegossen. Die entstandene Fällung wurde über Nacht stehen gelassen, abfiltriert und direkt als nichtstöchiometrisches Hydrosulfat weiterverwendet. Aus einem anderen Ansatz wurde die Aminosäure isoliert und charakterisiert: DC. (BAW), Rf 0,60 Ninhydrin gelb. - IR.: 1450 und 1520 (NO₂). - NMR.: 7,2 (br. s, 1 H); 7,0 (s, 2 H, s. Fig. 2); 3,1 bis 2,2 (m, 3 H (α und β)).

m-Amino-phenylalanin (8). Die saure Hydrierung von 8 führte je nach Katalysator zu verschiedenen Produkten. Platinoxid ergab Ringhydrierung neben dem gewünschten Produkt, Raney-Nickel reduzierte nur die Nitrogruppe, Palladium auf Aktivkohle führte zum gewünschten Amin 9. Alle Hydrierungsprodukte wurden mit DC. (BAW) und NMR. charakterisiert.

Ni: Rf 0,57 einheitlich. - NMR.: 7,2 bis 6,1 (kompliziertes m, 3 H); 3,2 bis 2,2 (m, 3 H);

PtO₂: Rf 0,04, starke Schwanzbildung. - NMR.: 2,0 bis 1,5 (m);

Pd/C: Rf 0,23 einheitlich. - NMR.: 7,4 bis 7,1 (m, 1 H); 6,9 bis 6,6 (m, 3 H). - IR.: 3340 (Phenyl-NH₂).

Das nasse Hydrosulfat des vorhergehenden Versuches wurde in 250 ml 50proz. Essigsäure gelöst, 100 mg Pd/C zugegeben und bei 22° über Nacht bei Atmosphärendruck hydriert. Der

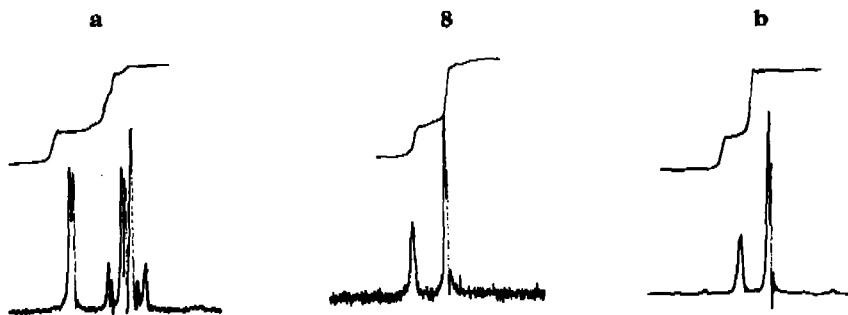


Fig. 2. Bestimmung der Substituentenanordnung von 8 mittels NMR. (Aromatenregion), durch Vergleich mit a und b (a = 2-Nitro-p-chlor-toluol; b = 3-Nitro-p-chlor-toluol)

Katalysator wurde abfiltriert, das Gemisch schonend eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Dowex 50 entsalzt. Das Produkt wurde mit 2-Propanol aus Wasser gefällt und getrocknet. Ausbeute: 2,25 g (12,5 mmol), 56%.

m-Azido-phenylalanin (10). 3,0 g 9 (16,7 mmol) wurden mit 1,27 g Natriumnitrit (18,5 mmol) in 200 ml 6N Salzsäure wie üblich diazotiert und mit einer wässrigen Lösung von 1,24 g Natriumazid (1,95 mmol) versetzt. Das Gemisch wurde schonend eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und entsalzt. Das Azid wurde aus Wasser mit 2-Propanol umkristallisiert und getrocknet. Ausbeute: 1,34 g (6,5 mmol) 39%. DC. (BAW): Rf 0,64. - IR.: 2100 s (N₃). - NMR.: 7,4-6,8 (m, 4 H); 3,6-2,8 (m, 3 H).

C₉H₁₀N₄O₂ (206,21) Ber. C 64,74 H 3,62 N 20,14% Gef. C 64,85 H 3,68 N 20,03%

Synthese der Tripeptide, allgemeines Verfahren. 1 mmol der Aminosäuren 1, 2, 4, 6 oder 10 wurde in 2 ml abs. Dimethylformamid suspendiert, 111 μl N-Methyl-morpholin zugegeben und im Eisbad gerührt. 391,4 mg (1 mmol) Aktivester Z · Ala-Ala · OSU [2] wurden in 2 ml Dimethylformamid gelöst, zur Aminosäure-Suspension gegeben, mit 2 ml Essigester nachgespült und über Nacht im auftauenden Eisbad weitergerührt. Das Gemisch wurde eingedampft, in Essigester auf-

genommen und über Kaliumhydrogensulfat-Lösung bei pH 2 ausgeschüttelt. Nach Trocknung der organischen Phase wurde das Produkt aus Essigester/Diisopropyläther umkristallisiert.

	I-1	I-2	I-4	I-6	I-10
Ausbeuten	68	80	70	71	48%
DC. (CME): Rf	0,3	0,15	0,25	0,23	0,26
Smp.	178°	192°	(165°)	(140°)	(169°)

() bedeutet Zersetzung

NMR. - I-1 in DMSO: 7,2 (s, 5 H). I-2 in Dimethylformamid/Trifluoressigsäure: 7,8 (AA'BB', 4 H). I-4 in DMSO: 7,1 (AA'BH', 4 H). I-6 in DMSO: 8,2-7,4 (m, 3 H). I-10 in DMSO: 7,3-6,8 (m, 4 H).

Für alle Verbindungen gilt: 5,0 (s, 2 H); 1,2 (2 m, 6 H).

IR. (in Nujol). - I-1: 3260 s (Amid-NH, Carbonsäure); I-2: 3260 s (Amid-NH, Carbonsäure); 1350 m (NO₂); I-4: 3260 s (Amid-NH, Carbonsäure), 2100 s (N₃); I-6: 3260 s (Amid-NH, Carbonsäure), 2100 s (N₃), 1350 m (NO₂); I-10: 3260 s (Amid-NH, Carbonsäure), 2090 s (N₃).

Optische Drehung [α]_D²⁰.

	λ 365 nm	436 nm	546 nm	578 nm	589 nm
I-1	1,9°	1,7	1,1	0,98	0,96
I-2	(8,8)°	8,9	1,1	0,7	0,5
I-4	(15,8)°	15,6	6,1	5,1	4,5
I-6	(90,4)°	(91,4)	17,0	12,5	11,1
I-10	(15,2)°	14,9	6,3	5,1	4,7

() bedeutet Zersetzung, alle Messungen mit $c = 1$ in 50 mm Tris-Puffer, pH 8.

Synthese der radioaktiven Tripeptide. - Z · Ala-Ala(β -³H) · OH. 10 mg Alanin (β -³H) (5 mCi, 0,112 mmol) wurde in 0,5 ml halbgesättigter Hydrogencarbonatlösung gelöst, in ein Reagensglas transferiert und mit 0,5 ml Dioxan nachgespült. 45 mg Z · Ala · OSU (0,14 mmol) wurden fest bei Raumtemperatur zugegeben und 2 Std. weitergerührt. Die Lösung wurde i.V. eingedampft, angesäuert und mehrmals mit Essigester ausgezogen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, getrocknet und mit DC. (CME) und Autoradiographie kontrolliert: einheitlich, Rf wie bei Z · Ala-Ala · OH. Das radioaktive Dipeptid wurde mit 50 mg gewöhnlichem Dipeptid verdünnt, aus Essigester/Petroläther umkristallisiert und getrocknet. Ausbeute 71,1 mg (0,242 mmol), 86%. Spezifische Aktivität 13,84 mCi/mmol, Gesamt-Aktivität 3,35 mCi.

Z · Ala-Ala(β -³H) · OSU. 35 mg Z · Ala-Ala(β -³H) · OH (1,65 mCi, 0,119 mmol) wurden mit 112,5 mg unmarkiertem Peptid (0,381 mmol), 115 mg N-Hydroxy-succinimid (1 mmol) und 125 mg Dicyclohexyl-carbodiimid (0,6 mmol) zusammengegeben, in 2 ml Dimethylformamid/Essigester 1:1 (v/v) gelöst, mit 2 ml Essigester nachgespült und im Eisbad über Nacht weitergerührt. Der ausgefallene N,N'-Dicyclohexyl-harnstoff wurde abfiltriert, die Lösung eingedampft, in Essigester wieder gelöst und mit Natriumhydrogencarbonat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingedampft, in 5 ml Dimethylformamid aufgenommen und in 5 gleiche Portionen aufgeteilt.

Z · Ala-Ala(β -³H)-Xxx · OH. Je 0,15 mmol der Aminosäuren 1, 2, 4, 6 oder 10, je 15,6 μ i N-Methyl-morpholin (0,12 mmol) wurden in 0,5 ml Dimethylformamid suspendiert, je ein Teil des radioaktiven Z · Ala-Ala(β -³H) · OSU unter Rühren dazugegeben und über Nacht weitergerührt. Die Lösungen wurden eingedampft, in halbgesättigter Hydrogencarbonatlösung aufgenommen und mit 1 N Salzsäure wieder ausgefällt. Die Fällungen wurden abfiltriert, in Essigester aufgenommen, getrocknet, mit Petroläther ausgefällt und im Hochvakuum getrocknet. Kontrolle mit DC. (CME) und Autoradiographie: einheitlich, Rf jeweils wie bei Z · Ala-Ala-Xxx · OH.

Ausbeute:	I-1	I-2	I-4	I-6	I-10
mg	23,3	32,2	29,8	22,1	30,1
% der Theorie	52,8	66,2	61,8	41,4	62,4
spez. Aktivität mCi/mmol	2,80	2,74	2,72	2,72	2,76

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. Escher & R. Schwyzer, FEBS Letters 46, 347 (1974); E. Escher, Dissertation Nr. 5363, ETH-Z (1974).
- [2] H. R. Bosshard & A. Berger, Biochemistry 13, 266 (1974); H. R. Bosshard, FEBS Letters 38, 139 (1974).
- [3] R. Schwyzer & M. Caviezel, Helv. 54, 1395 (1971); T. Wieland, A. V. Dungen & C. Birr, Liebigs Ann. Chem. 752, 109 (1971).
- [4] T. A. Steitz, R. E. Henderson & D. M. Blow, J. mol. Biol. 46, 337 (1969).
- [5] E. Escher, R. Jost, H. Zuber & R. Schwyzer, Israel J. Chemistry 12, 129 (1974).
- [6] F. Bergel & J. A. Stock, J. chem. Soc. 1959, 90.
- [7] F. Fahrenholz & G. Schimmack, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 356, 469 (1975).

158. Herstellung von DL-N-Benzoyloxycarbonyl- γ -carboxy-glutaminsäure- γ, γ' -di-*t*-butyl- α -methyl-ester, einem für die Peptidsynthese geeigneten Derivat der neuen Aminotricarbonsäure aus Prothrombin

von Walter Märki und Robert Schwyzer¹⁾

Institut für Molekularbiologie und Biophysik,
Eidgenössische Technische Hochschule, CH-8049 Zürich
(6. VI. 75)

Summary. The first synthesis of a selectively, fully protected derivative of the new aminotricarboxylic acid found in prothrombin and other homologous blood-clotting factors, γ -carboxy-glutamic acid (Gla), is described. The compound DL-N-benzoyloxycarbonyl- γ -carboxy-glutamic acid γ, γ' -di-*t*-butyl- α -methyl-ester is potentially useful for peptide synthesis. The free amino-acid (DL-Gla) and DL-pyro- γ -carboxy-glutamic acid dimethyl-ester were also prepared.

Kürzlich wurde die Struktur einer neuen Aminosäure im N-terminalen Teil des (Vitamin K)-abhängigen Blutgerinnungsfaktors Prothrombin vorgeschlagen [1] [2] und durch Synthese bestätigt [3]. Sie wurde im N-terminalen Polypeptid (1–42) den Stellungen 7 und 8 [1] [2], sowie 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30 und 33 [1] zugeordnet. Diese ungewöhnliche γ -Carboxy-glutaminsäure (Gla) findet man auch in der 'light chain' von Bovine Factor X₁ (Stuart Factor) [4]. Factor II (Prothrombin) und Factor X besitzen homologe Ca²⁺-Bindungsstellen [4] [5], mit Bindungskonstanten von log $K_{ass} = 3,5$ für 6 Bindungsstellen im Prothrombin-Aktivierungsfragment ($M_r = 23000$) [7]. Ein Modell für die Koordination eines Calcium-Ions mit den Carboxylgruppen von zwei γ -Carboxyglutaminsäureresten als Calciumbindungsstelle wird in [4] vorgeschlagen. Durch Einbau von mit ¹⁴C radioaktiv markiertem CO₂ in Prothrombin *in vivo* konnte biosynthetisch gezeigt werden, dass im (Vitamin K)-abhängigen Schritt Glutaminsäurereste carboxyliert werden [6]. Nach enzymatischem Abbau des Proteins wurde die Radioaktivität in einer einzelnen, sauren Aminosäure (Gla) gefunden, welche durch die übliche saure Totalhydrolyse zu Glutaminsäure decarboxyliert wurde [1] [2].

¹⁾ Diese Arbeit ist ein Teil der Dissertation von W. Märki. Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die gewährte Unterstützung. Nomenklatur und Abkürzungen entsprechen den in der Peptid- und Proteinchemie üblichen Normen, vgl. E. Wünsch: «Synthese von Peptiden», Bd. 15 von «Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie», E. Müller, Herausgeber, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.