

carbonyle (*t*-Boc) protège la fonction α -aminée des amino-acides. Le cas échéant, les fonctions latérales des amino-acides sont bloquées sous forme :

1) d'ester benzylique pour la chaîne carboxylique de l'acide aspartique; 2) d'éther benzylique pour l'hydroxyle des sérine, thréonine et tyrosine; 3) d'éther méthoxybenzylique pour le sulfhydryle de la cystéine; 4) de dinitro-2,4-phényle pour l'imidazolyle de l'histidine; 5) de groupe benzoxy-carbonyle pour la fonction ϵ -aminée de la lysine.

Au cours de la synthèse, on incorpore les différents acides aminés à la chaîne peptidique par la méthode au dicyclohexylcarbodiimide (DCCI), en faisant réagir un quadruple excès en amino-acides protégés par rapport à la proline fixée en premier sur la résine; on laisse la réaction se poursuivre pendant 2 heures. Les *t*-Boc sont éliminés par l'acide trifluoroacétique en solution dans le chlorure de méthylène; après lavage au chlorure de méthylène, la neutralisation est effectuée par de la triéthylamine dans ce même solvant.

Après incorporation de la méthionine en position 8, on ajoute 1% d'éthanedithiol-1,2 à la solution d'acide trifluoroacétique et on conserve ce réactif pour les acides aminés suivants pour éviter l'oxydation de l'acide aminé soufré.

L'asparagine et la glutamine sont introduites sous forme de leurs esters paranitro-phényliques, en solution dans le diméthylformamide (DMF) additionné de 1% d'acide acétique. Si l'essai de contrôle du couplage à la ninhydrine [6] est négatif, on remplace l'acide acétique par de l'acide pivalique (1%); si la coloration bleue persiste encore dans cet essai, on sature le DMF/1% AcOH avec de l'urée [7]. Si le couplage n'est pas total au bout de 48 heures de réaction, comme c'est le cas pour la glutamine en position 24, on acétyle la thréonine qui n'a pas réagi, par l'acétylimidazole dans le chlorure de méthylène.

A la fin, on élimine le groupe protecteur de l'imidazole de l'histine, alors que le peptide est encore lié à la résine, à pH 8, avec du mercapto-éthanol en solution dans le DMF. Le peptide est séparé de la résine par traitement à l'acide fluorhydrique liquide en présence d'anisole et de méthionine. Tous les groupes protecteurs sont éliminés au cours de cette opération.

Le peptide est purifié par filtration sur gel. Les fractions, correspondant aux pics principaux, sont rassemblées, lyophilisées, reprises dans un tampon à pH 8 et oxydées durant 24 heures par un courant d'air pour former le pont disulfure entre les deux résidus cystéiniques. Le pic possédant l'activité biologique et radioimmunologique recherchée est purifié à nouveau sur résine échangeuse d'ions CMC 52 à l'aide d'un gradient acide d'élution. Le peptide obtenu est homogène à l'électrophorèse sur papier et à la chromatographie sur cellulose.

Après hydrolyse acide, la composition en acides aminés est la suivante, rapportée à la proline = 2 (entre parenthèses les chiffres théoriques): Ala (2) 2,40; Asp (3) 3,04; Cys (2) 1,90; Glu (2) 2,04; Gly (4) 4,6; His (1) 0,89; Ile (1) 0,80; Leu (2) 2,0; Lys (1) 0,96; Met (1) 0,65; Phe (3) 3,05; Pro (2) 2,0; Ser (1) 1,05; Thr (5) 5,26; Tyr (1) 0,88; Val (1) 1,2.

Partie expérimentale. – Les *t*-Boc-amino-acides portant des fonctions latérales proviennent de la *Fox Chemical Company* (Los Angeles, Californie) ou sont préparés au laboratoire par la méthode de *Schnabel* [8] dans un autotitracteur; leur pureté est déterminée par polarimétrie, F. et chromatographie sur couche mince de silice.

L'hydrolyse du peptide purifié est effectuée en tube scellé sous vide, par HCl 6N (110°; 24 h).

1. *Synthèse de la séquence de la thyrocalcitonine*. On utilise 1 g de résine portant 0,5 mmole de proline. L'appareil et les étapes successives ont été décrits à propos de la LH–RH [4]. Toutefois, le chlorure de méthylène n'est pas additionné de 1% d'éthanedithiol-1,2 pour les lavages après les éliminations de *t*-Boc par CF₃CO₂H/CH₂Cl₂ 1:1 après l'incorporation de la méthionine.

Pour rendre la réaction à la ninhydrine négative, il a fallu coupler: 2 fois la Thr en position 25 (2 × 24 h), 5 fois la Gln en position 24 (3 × 12 h dans DMF/1% AcOH; 1 × 24 h dans DMF/1% acide pivalique; 1 × 48 h dans DMF/1% AcOH, saturé d'urée); enfin, le taux de couplage étant de l'ordre de 90%, une acétylation de l'amine de Thr a été faite; 2 fois la Pro en position 23 (2 × 2 h); 2 fois Asn en position 17 (1 × 12 h dans DMF/1% AcOH, 1 × 48 h, DMF/1% AcOH, saturé d'urée); 2 fois Asn en position 3 (2 × 48 h dans DMF/1% AcOH).

2. *Élimination du groupe dinitrophényle de l'histidine*: A 15 ml de DMF, on ajoute 2 ml de mercaptoéthanol et on ajuste le pH à 8 avec de la triéthylamine. On introduit ce réactif dans l'appareil et on laisse l'agitation se poursuivre toute la nuit. On filtre et lave la résine alternativement avec du chlorure de méthylène (3 fois) et du méthanol (3 fois). Après séchage sous vide, le poids de la résine est de 2,8 g.

3. *Libération du peptide de la résine avec élimination des groupes protecteurs*: On distille 15 ml d'acide fluorhydrique dans un mélange de 1,5 g de résine, 1,5 ml d'anisole et 300 mg de méthionine. On agite 1 h à 0° et 30 min. à température ambiante. On chasse l'acide sous vide, puis on reprend le résidu dans 3 fois 5 ml d'acide acétique et on précipite le tout par de l'éther éthylique exempt de peroxyde. On centrifuge à froid; on lave plusieurs fois le précipité à l'éther et on le sèche sous vide. Le précipité est repris par de l'eau; l'insoluble est éliminé par centrifugation. La solution est ensuite lyophilisée donnant 800 mg de produit brut.

4. *Purification*: 200 mg de peptide sont placés au sommet d'une colonne (diamètre 2,5 cm, longueur 90 cm) de Biogel, P6, 50–100 mesh. On élue à l'aide d'acide acétique 0,1M et on recueille des fractions de 12 ml en 20 min en suivant l'élution à l'aide d'un enregistreur UV. à 280 nm. La thyrocalcitonine est recueillie dans les fractions 23 à 28.

5. *Formation du pont S-S*: Les fractions 23–28 sont rassemblées et lyophilisées. Le résidu est repris dans 500 ml de tampon hydrogencarbonate d'ammonium 1M, pH 8, et soumis à un barbotage d'air à travers une plaque poreuse, pendant 24 h. La solution est lyophilisée; le résidu est purifié sur colonne CMC52 Whatman par gradient d'acétate d'ammonium de mho 0,6 à mho 0,7, pH 4, avec un appareil LKB ultrograd 11300.

6. *Activité immunologique*: notre thyrocalcitonine synthétique est identique du point de vue immunologique à la thyrocalcitonine humaine extractive [1] et à l'hormone préparée par la méthode classique [9].

7. *Activité biologique*: Le dosage effectué en quatre points chez le Rat indique une activité équivalente à 50 unités MRC/mg, le produit de référence étant l'étalon MRC de calcitonine humaine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. Milhaud, M. Tubiana, C. Parmentier & G. Coutris, C. r. hebd. Séances Acad. Sci., D, 266, 608 (1968).
- [2] R. Neher, B. Riniker, W. Rittel & H. Zuber, Helv. 51, 1900 (1968).
- [3] P. Rivaille & G. Milhaud, Helv. 54, 355 (1971).
- [4] P. Rivaille, A. Robinson, M. Kamen & G. Milhaud, Helv. 54, 2772 (1971).
- [5] P. G. Pietta & G. R. Marshall, Chem. Commun. 1970, 650.
- [6] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger & P. I. Cook, Analyt. Biochemistry 34, 595 (1970).
- [7] F. C. Westall & A. B. Robinson, J. org. Chemistry 35, 2842 (1970).
- [8] E. Schnabel, Liebig's Ann. Chem. 702, 188 (1967).
- [9] P. Sieber, B. Riniker, M. Brugger, B. Kamber & W. Rittel, Helv. 53, 2135 (1970).