

Jean Louis Kraus

Laboratoire de Chimie Organique Biologique, Université d'Avignon, Faculté des Sciences,
33, rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France

Reçu le 27 Février 1985

Dans le but d'étudier le phénomène de clustérisation des récepteurs membranaires, nous rapportons la synthèse de nouveaux dérivés tétraazacycloalkanes substitués par l'intermédiaire d'intercalateurs à des peptides (*N*-formyl-Met-Leu-Phe) biologiquement actifs.

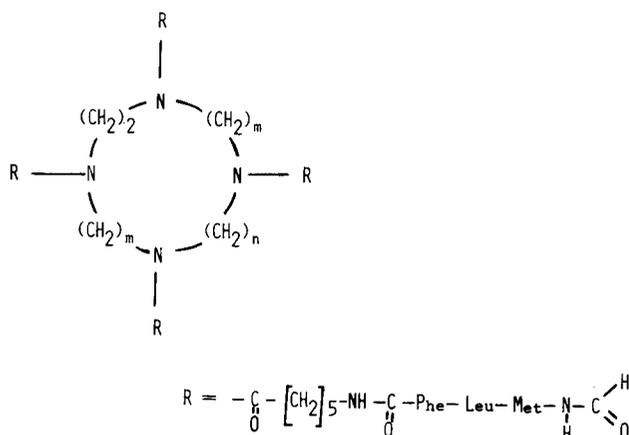
J. Heterocyclic Chem., **22**, 1307 (1985).

L'idée de la synthèse d'azamacrocycles polyfonctionnalisés par des peptides biologiquement actifs est née de l'observation selon laquelle le greffage de deux ou plusieurs entités pharmacophores sur une structure chimique judicieusement sélectionnée conduisait à une potentialisation très sensible des effets biologiques observés; potentialisation qui n'avait rien de commun avec une simple additivité des effets dus à l'activité intrinsèque de chaque pharmacophore présent. La pluralité des interactions pharmacophores - sites actifs entraîne des modifications des propriétés physico-chimiques des membranes par "clustérisation" ou microaggrégation des récepteurs. Ce phénomène serait à l'origine de l'amplification des effets biologiques observés. Les exemples rapportés dans la littérature scientifique, trop nombreux pour être discutés dans cet article, sont répertoriés sous les références numérotées de 2 à 15.

Notre intérêt en tant que chimiste bio-organicien était de construire un modèle chimique susceptible de mettre en évidence ce phénomène d'amplification des performances biologiques par clustérisation des récepteurs membranaires externes. Notre projet fut de greffer sur un support hétérocyclique du type polyazacyclane plusieurs entités peptidiques du type *N*-formyl-Méthionine-Leucine-Phénylalanine (f-Met-Leu-Phe) par l'intermédiaire d'un spacer ou intercalateur (schéma 1). En effet, ce petit peptide à terminaison *N*-formylée possède des propriétés chimiotactiques reconnues [16] et induit le phénomène de phagocytose par relâchement d'enzymes lysosomales. La raison du choix du support du type polyazacyclane résulte du fait que, sur le plan de la synthèse organique, ce support, d'une part offrait des possibilités de modification structurale (taille du macrocycle, variation du nombre d'hétéroatomes dans le cycle) et d'autre part par la présence de plusieurs fonctions amines secondaires, ce support permettait des réactions de substitution aisées entre le macrocycle et l'intercalateur. L'intercalation d'une chaîne carbonée entre le macrocycle et le ligand pharmacophore a pour objet de donner à la macromolécule résultante une plus grande flexibilité. L'agent intercalant choisi n'est autre qu'un ϵ -aminoacide, dont les deux fonctions termi-

nales, amine et acide, sont utilisées dans les réactions de greffage (schéma 1).

Schéma 1



La synthèse des dérivés tétraazacycloalkanes tétrasubstitués par des entités peptidiques (schéma 1) a été réalisée à partir d'un schéma réactionnel qui nécessite l'obtention de deux séries de composés intermédiaires. Les premiers intermédiaires sont les dérivés du type **2** (**2a,b,c**) qui résultent de la condensation de l'acide ϵ -aminocaproïque protégé sur les supports hétérocycliques tétraazacycloalkane, par l'intermédiaire de l'anhydride symétrique de cet aminoacide (schéma 2).

Plusieurs tentatives ont été effectuées soit par condensation directe de l'acide ϵ -aminocaproïque en présence de l'agent couplant dicyclohexylcarbodiimide dans le chlorure de méthylène ou le *N,N*-diméthylformamide, soit par condensation directe de l'anhydride mixte, obtenu par couplage de l'acide ϵ -aminocaproïque protégé avec le chloroformate d'éthyle. Dans chacune de ces tentatives, les rendements en produits **2** étaient faibles, et des mélanges de produits non tétrasubstitués étaient obtenus. Pour ces raisons, nous avons opté pour la méthode qui consiste à condenser l'anhydride symétrique de l'acide ϵ -aminocaproïque sur le squelette tétraazacycloalkane dans le diméthylformamide, en présence d'une quantité cataly-

Schéma 2

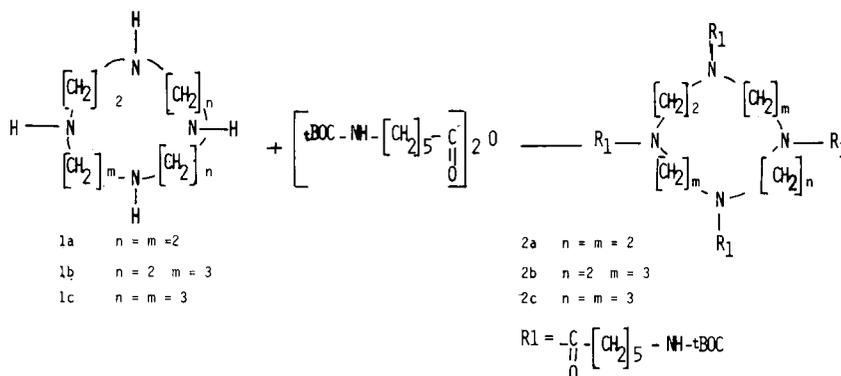
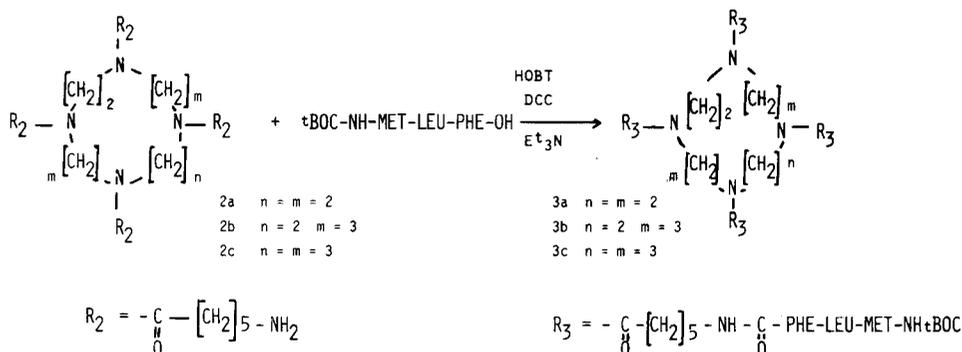


Schéma 3



tique de para-diméthylaminopyridine [17]. Cette dernière méthode conduisait aux dérivés tétraazacycloalkylamides **2** avec des rendements variants entre 50-80% selon les cas.

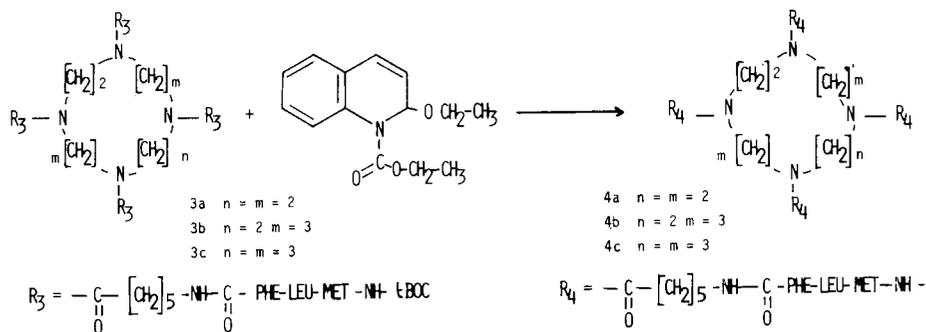
La seconde série d'intermédiaires tétraazacycloalkyltétrapeptides **3** a été obtenue selon les méthodes classiques utilisées dans la chimie des peptides [18,19,20]. Après déprotection en milieu basique de la fonction ester méthylique du résidu Phénylalanine terminal, le peptide résultant est condensé sur les intermédiaires tétraazacycloalkylamides **2** déprotégés du groupement tertibutoxycarbonyl à l'aide d'acide formique. Cette condensation s'effectue à 0° dans le diméthylformamide. Le peptide déprotégé est mis en présence de 4,4 équivalents d'hydroxy-1 benzotriazole et de 4,4 équivalents de dicyclocarbodiimide, puis on additionne l'intermédiaire **2** déprotégé dissous dans le diméthylformamide (schéma 3). Après une étape de purification par chromatographie flash, les dérivés tétraazacycloalkyltétrapeptides **3** sont obtenus avec des rendements de l'ordre de 50 à 70%.

Les composés tétramères cycliques peptidiques finaux **4**, ont été obtenus à partir d'une réaction de N-formylation originale que nous avons récemment publiée [21]. Cette méthode par rapport aux méthodes connues de formylation [22,23,24,25,26,27] présentait, dans le cas bien spécifique des composés macrocycliques, l'avantage d'être une

“one pot reaction”, facile à mettre en oeuvre et conduisait à d'excellents rendements. Après déprotection du résidu méthionine terminal des composés **3**, on additionne directement sur le composé déprotégé 1,1 équivalent de N-éthoxycarbonyl, éthoxy-2 dihydroquinoline-1,2 dans le chloroforme (schéma 4). Les dérivés N-formylés résultants **4** sont facilement isolés.

Ces dérivés macrocycliques tétrapeptidiques du type **4** ont été étudiés du point de vue de leur propriétés chimio-tactiques [28,29,30,31,32] et de leur aptitude à provoquer le relâchement des enzymes lysosomales [33]. Les résultats préliminaires obtenus tendent à démontrer que le relâchement des enzymes lysosomales, induit par les dérivés tétraazacycloalkanes substitués par des entités peptidiques, est jusqu'à mille fois supérieur à celui provoqué par le seul tripeptide de référence f-Met-Leu-Phe-OCH₃. Ce résultat est d'autant plus encourageant que par exemple le composé **4b** à la concentration 10⁻¹⁰M possède une activité de 50% par rapport au témoin, alors qu'à la concentration de 10⁻⁸M, l'effet du dérivé de référence est quasiment nul. Ces résultats biologiques feront l'objet d'une publication complète dans une revue spécialisée adéquate, mais on peut penser que la modification des paramètres structuraux (taille du macrocycle, nombre d'atomes d'azote susceptibles de recevoir une substitution, longueur de l'agent intercalant) laisse augurer des possibilités de

Schéma 4



potentialisation des propriétés biologiques. Ce type de modèle pourrait alors constituer un outil précieux pour l'étude des récepteurs externes des membranes cellulaires.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les solvants utilisés lors des synthèses des tétraazacycloalkanes substitués étaient de qualité spectroscopique. Le tétrahydrofurane est obtenu après distillation en présence de sodium et de benzophénone. La triéthylamine est purifiée par distillation sur oxyde de baryum. Les divers autres solvants sont séchés sur tamis moléculaire. Tous les acides aminés utilisés sont de configuration L et provenaient des manufacturiers suivants: Aldrich, Sigma et Bachem ou Chemalog pour les acides aminés *t*-BOC protégés.

La *N*-éthoxycarbonyl, éthoxy-2 dihydroquinoline-1,2 est recristallisée dans l'éther anhydre avant emploi. Le réactif dicyclohexylcarbodiimide (Aldrich) est purifié par solubilisation dans l'éther anhydre et filtration pour éliminer le dicyclohexylurée. L'acide formique à 98% (BHD) est utilisé sans purification particulière dans les réactions de déprotection d'acides aminés. Les chromatographies analytiques sur couches minces sont réalisées sur des plaques de gel de silice Kieselgel 60 F254, 0,2 mm épaisseur (Merck) et sont révélées soit par évaporation à la ninhydrine soit par lampe ultra-violet (254 nm). Les chromatographies sur colonne de gel de silice (32-64 μ) sont réalisées à partir de la technique de Still [34]. Les points de fusion sont déterminés à partir d'un appareil type Buchi SMP-20 et ne sont pas corrigés. Les spectres infra-rouges sont enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer 297, les spectres de résonance magnétique nucléaire (rmn) sont enregistrés sur des spectromètres Varian T60A ou XL-200. Les déplacements chimiques sont exprimés en

Tableau I

Propriétés spectrales et caractéristiques physiques des composés du type 2

No.	Structures (RMN 60 MHz)	Rdt %	Rf solvant
2a	¹ H rmn (solvant deutériochloroforme) δ ppm/TMS 1,2-1,9 (m, Ha), 1,5 (s, Hb), 2,4 (t, Hc), 4,6-5,4 (m, He), 5,6-6,3 (m, Hf)	86	0,35, Hexane 4 Acétate d'éthyle 1
2b	¹ H rmn (solvant deutériochloroforme) δ ppm/TMS 1,0-2,0 (large, Ha), 1,5 (s, Hb), 2,4 (t, Hc), 3,2 (q, Hd), 4,4-4,8 (2t, He), 5,2-5,6 (m, He), 5,7-6,25 (m, Hf)	50	0,54, Hexane 3 Acétate d'éthyle 2
2c	¹ H rmn (solvant deutériochloroforme) δ ppm/TMS 1,2-1,9 (m, Ha), 1,5 (s, Hb), 2,4 (t, Hc), 3,2 (t, Hd), 4,6-5,4 (m, He), 5,6-6,3 (m, Hf)	55	0,60, Hexane 3 Acétate d'éthyle 2

Tableau II

Caractéristiques physiques et spectrales des composés du type 3

No.	Structure (RMN 200 MHz) Solvant deutériochloroforme δ ppm/TMS	Rdt %	Rf solvant
3a	0,90 (t, Ha), 1,42 (s, Hb), 1,05-2,05 (m, Hc), 2,1 (s, Hd), 2,3 (t, He), 2,55 (t, He), 3,1 (m, Hh), 4,25 (m, Hi), 4,42 (m, Hi), 4,5 et 5,61 (t, Hk), 4,75 (m, Hl), 5,4 (1H, NH), 6,48 (1H, NH), 6,95 (NH-Boc), 7,1 (1H, NH), 7,25 (s, Hm)	72	0,32 Chlorure de méthylène 3 Acétate d'éthyle 2
3b	0,89 (t, Ha), 1,42 (s, Hb), 1,05-2,05 (massif Hc), 2,09 (s, Hd), 2,31 (t, Hc), 2,54 (t, Hf), 3,05 (m, Hg), 3,16 (m, Hh), 4,27 (m, Hi), 4,40 (m, Hj), 4,57 et 4,59 (2t, Hk), 4,72 (m, Hl), 5,22 et 5,28 et 5,37 (m, Hm), 5,91 (Hm), 6,48 (NH), 5,44 (NH), 6,95 (d, NH-Boc), 7,25 (m, Hn)	81	0,32 Chlorure de méthylène 3 Acétate d'éthyle 2
3c	0,88 (t, Ha), 1,42 (s, Hb), 1,1-2,0 (massif Hc), 2,05 (s, Hd), 2,29 (t, He), 2,51 (t, Hf), 3,05 (m, Hg), 3,19 (m, Hh), 4,39 (m, Hi), 4,55 et 4,58 (2t, Hj), 4,52 (m, Hk), 4,77 (m, Hl), 5,20-5,35 (m, H), 5,57 (d, NH-Boc), 5,91 (m, Hm), 6,72 (m, NH), 7,17 (m, NH), 7,22 (m, Hn), 7,46 (m, NH)	58	0,30 Chlorure de méthylène 3 Acétate d'éthyle 2

Tableau III

Caractéristiques physiques et spectrales des composés du type 4

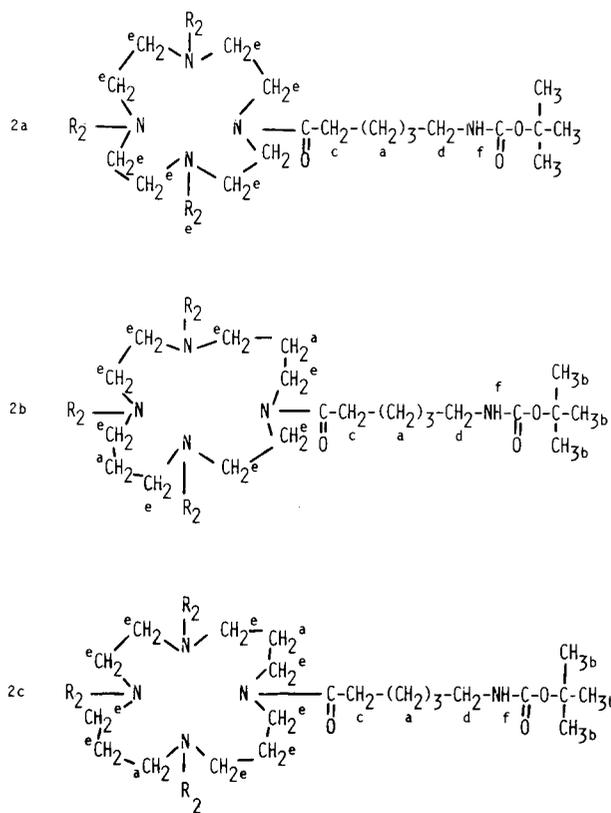
No.	Rdt %	Point fusion °C	Rf solvant		Analyse %			IR cm ⁻¹
					Calculé/Trouvé	C	H	
4a	76	121-122	0,12	C ₁₁₆ H ₁₇₆ N ₂₀ O ₂₀ S ₄	60,60	7,72	12,18	3260, 3060, 2920, 1730, 1620
			Méthanol 1 Chloroforme 9		60,55	7,70	11,92	
4b	72	174-175	0,14	C ₁₁₈ H ₁₈₀ N ₂₀ O ₂₀ S ₄	60,90	7,79	12,04	3280, 3060, 2920, 2850, 1730, 1630
			Méthanol 0,5 Chloroforme 9,5		60,69	7,73	11,85	
4c	65	178-180	0,15	C ₁₁₉ H ₁₈₂ N ₂₀ O ₂₀ S ₄	61,05	7,84	11,97	3260, 3060, 2920, 1730, 1730, 1620
			Méthanol 0,5 Chloroforme 9,5		60,95	7,94	11,93	

Tableau IV

Caractéristiques RMN des composés du type 4

4a	0,87 (t, Ha), 1,1-2,0 (m, Hb), 2,09 (s, Hc), 2,29 (t, Hd), 2,57 (t, He), 3,06 (m, Hf), 3,15 (m, Hg), 4,55 (2t, Hh), 4,46 (m, Hi), 4,66 (m, Hh), 4,97 (m, Hk), 5,05 et 5,26 et 5,35 (3t, Hh), 6,33 (m, NH), 7,20 (m, Hl), 7,46 (m, NH), 7,78 (m, NH), 8,22 (d, Hm), 8,41 (m, NH)
4b	0,88 (t, Ha), 1,1-2,13 (m, Hb), 2,03 (s, Hc), 2,29 (t, Hd), 2,46 (t, He), 3,06 (m, Hf), 3,14 (m, Hg), 4,57 (2t, Hh), 4,90 (m, Hi), 4,93 (m, Hj), 5,21 et 5,26 et 5,35 (m, Hh), 5,9 (m, Hk), 7,03 (NH), 7,21 (m, Hl), 7,90 (m, NH), 8,10 (NH), 8,22 (d, Hm), 8,41 (NH)
4c	0,88 (t, Ha), 1,1-2,23 (m, Hb), 2,03 (s, Hc), 2,30 (t, Hd), 2,48 (t, He), 3,06 (m, Hf), 3,12 (m, Hg), 4,57-4,59 (2t, Hj), 4,9-5,2 (m, Hi, Hk, Hl), 5,20 et 5,27 et 5,36 (m, Hj), 5,93 (m, Hn), 7,21 (m, Ho), 7,60 (NH), 8,25 (Hq), 8,35 (NH), 8,71 (2NH)

Schéma 5



ppm à partir des références indiquées. Les analyses élémentaires des composés finaux ont été faites par la compagnie Guelph Laboratories, Ontario, Canada.

Tétraazacycloalkanes **1a,b,c**.

La synthèse des trois macrocycles 1,4,7,10-tétraazacyclododécane **1a**, 1,4,8,12-tétraazacyclopentadécane **1b**, et 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane **1c** a été réalisée selon des techniques expérimentales décrites par Richman [35] et Raymond [36].

Tétraazacycloalkylamides **2a,b,c** (méthode générale).

L'anhydride symétrique (4,4 équivalents) de l'acide ϵ -aminocaproïque *N*-*t*-BOC protégé, sont additionnés à température ambiante à 1 équivalent de tétraazacycloalkane dans le diméthylformamide, en présence d'une quantité catalytique (15 mg) de *para-N,N*-diméthylaminopyridine. Après 24 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous vide, et le résidu est immédiatement chromatographié sur colonne par la technique flash, l'éluant étant un mélange Acétate d'éthyle 2 hexane 3. Dans le tableau I sont rassemblés les paramètres rmn, rendements, et les Rf des composés **2a,b,c** dont les formules structurales sont représentées sur le schéma V (ces composés se présentent sous forme de solides amorphes, difficilement cristallisables, et immédiatement utilisés).

Tétraazacycloalkyltérapeptides protégés **3a,b,c** (méthode générale).

t-BOC-NH-Met-Leu-Phe-OH (4,4 équivalents) (préparé à partir des méthodes classiques décrites dans la littérature); 4,4 équivalents d'hydroxy-1-benzotriazole dissous dans du diméthylformamide anhydre sont additionnés à 0° à une solution constituée de 4,4 équivalents de dicyclohexylcarbodiimide et de 4,4 équivalents de triéthylamine. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 3 heures. On note la précipitation de dicyclohexylurée. A ce mélange, on additionne lentement 1 équivalent de dérivé tétraazacycloalkylamide **2** (la fonction aminée ayant été préalablement déprotégée par l'acide formique) dissous dans le diméthylformamide. La solution résultante est gardée 2 heures sous agitation à 0°, puis une nuit à température ambiante. Après filtration du dicyclohexylurée formé, le diméthylformamide est évaporé par distillation sous

Schéma 6

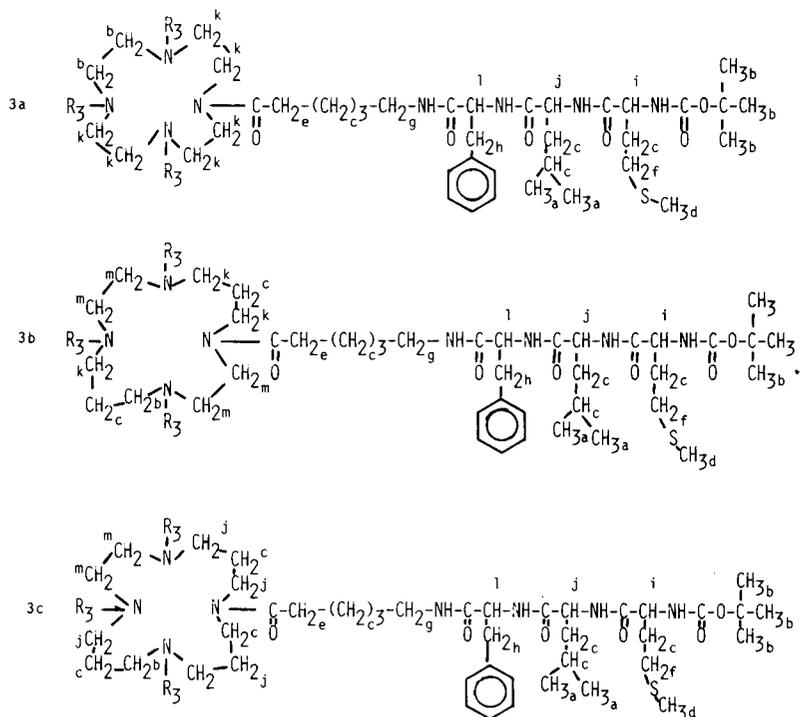
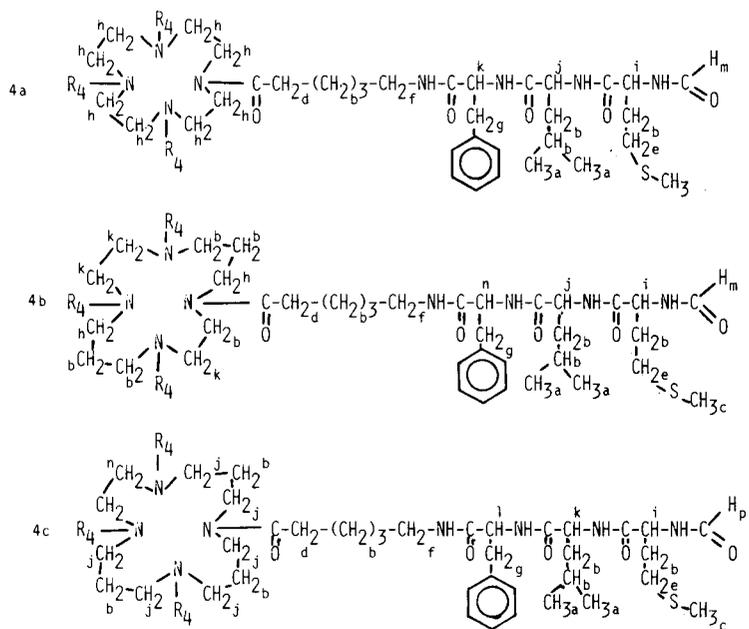


Schéma 7



vide poussé. Le composé résultant est immédiatement chromatographié sur colonne par la technique flash, en utilisant pour solvant un mélange acétate d'éthyle-chlorure de méthylène-3. Dans le tableau II sont rassemblés les différents paramètres spectroscopiques rmn, Rf, et rendements des composés **3a,b,c**, dont les formules structurales sont représentées sur le schéma 6.

Tétraazacycloalkyltétrapeptides N-formylés **4a,b,c** (méthode générale).

Un équivalent de tétraazacycloalkyltétrapeptide **3** est mis en solution dans l'acide formique à 98% sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. Après évaporation sous vide de l'acide formique, le résidu est azéotropé au toluène pour éliminer l'acide formique résiduel. Le pro-

duit résultant est ensuite dissous dans le chloroforme en présence de 7,2 équivalents de *N*-éthoxycarbonyl éthoxy-2 dihydroquinoline. La solution obtenue est agitée à température ambiante pendant 12 heures. Après évaporation du solvant, le produit désiré est obtenu. Dans les tableaux III et IV sont rassemblés les paramètres spectraux rmn, ir, et les caractéristiques physiques des composés **4a,b,c** correspondant aux formules structurales représentées sur le schéma 7.

BIBLIOGRAPHIE ET NOTES

- [1] Nous remercions le Professeur B. Belleau (Université McGill, Montréal, Canada) pour les pertinentes suggestions prodiguées au cours de ce travail. Ce travail a pu être réalisé dans le cadre du programme de coopération scientifique franco-québécois soutenu par le Ministère des Relations Extérieures que nous tenons à remercier.
- [2] J. Pitha, J. Milecki, T. Czajkowska et J. W. Kusiak, *J. Med. Chem.*, **26**, 7 (1983).
- [3] T. K. Chen, R. Fico et E. S. Canellakis, *J. Med. Chem.*, **21**, 868 (1978).
- [4] J. B. Lepecq, M. Lebreton, J. Barket et P. Rogues, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2915 (1975).
- [5] J. Pitha, *Eur. J. Biochem.*, **82**, 825 (1978).
- [6] N. A. Berger, K. Kocielek et J. Pitha, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 1234 (1979).
- [7] E. Hazum, K. J. Chang, H. J. Leighton, O. W. Lever et P. Cuatrecasas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 347 (1982).
- [8] M. S. Verlander, J. C. Venter, M. Goodman, N. O. Kaplan et B. Saks, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1009 (1976).
- [9] P. D. Stahl, J. S. Rodman, J. S. Miller et P. H. Schlesinger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 1399 (1978).
- [10] T. Kawasaki, R. Ethoh et I. Yamashina, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 1018 (1978).
- [11] R. Kornfeld et S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 217 (1976).
- [12] Y. C. Lee, *Carbohydr. Res.*, **67**, 509 (1978).
- [13] R. R. Martodam, D. Y. Twumasi, I. E. Liener, J. C. Powers, N. Nishino et G. Krejcarek, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 2128 (1979).
- [14] H. H. Ivey, J. Kattwinkel et S. Roth dans "Liposomes and Immunobiology", B. H. Tom et H. R. Six, eds, Elsevier/North Holland, New York, p 301 (1980).
- [15] R. Z. Dintzis, B. Vogelstein et H. M. Dintzis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **79**, 884 (1982).
- [16] Z. A. Tokes, K. K. Rogers et A. Rembaun, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **79**, 2026 (1982).
- [17] G. Höfle, W. Steglich et H. Vorbrüggen, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **17**, 569 (1978).
- [18] W. König et R. Geiger, *Chem. Ber.*, **103**, 788 (1970).
- [19] D. H. Rich, J. Singh dans "The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology", E. Gross et J. Meienhofer, eds, Academic Press, New York, p 242 (1979).
- [20] Y. S. Klausner et M. Bodansky, *Synthesis*, 453 (1972).
- [21] G. Lajoie et J. L. Kraus, *Peptides*, **5**, 653 (1984).
- [22] J. C. Sheehan et D. D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1154 (1958).
- [23] S. O. Thomas, *Tetrahedron Letters*, 335 (1967).
- [24] M. Waki et J. Meinhofer, *J. Org. Chem.*, **42**, 2019 (1977).
- [25] F. M. Chen et N. L. Benoiton, *Synthesis*, **9**, 709 (1979).
- [26] A. R. Day, N. Muthukumaraswamy et R. J. Freer, *Peptides*, **1**, 187 (1980).
- [27] J. Martinez et J. Laur, *Synthesis*, **11**, 979 (1982).
- [28] G. Y. Iyer, D. F. Islam et J. H. Quastel, *Nature*, **192**, 535 (1971).
- [29] E. Schiffman, B. A. Corcoran et S. Whal, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1059 (1975).
- [30] R. J. Freer, A. R. Day, J. A. Radding, E. Schiffmann, S. Aswanikumar, H. J. Showell et E. L. Becker, *Biochemistry*, **19**, 2404 (1980).
- [31] R. J. Freer, A. R. Day, N. Muthukumaraswamy, D. Pinon, A. Wu, H. J. Showell et E. L. Becker, *Biochemistry*, **21**, 257 (1982).
- [32] R. J. Freer, A. R. Day, H. J. Showell, E. Schiffmann et E. Gross, "Peptides", Proceed of the 6th American Peptide Symposium, E. Gross et J. Meinhofer, eds, Academic Press, New York, 1979, p 749.
- [33] H. S. Showell, R. J. Freer, G. H. Zigmund, E. Schiffmann, S. Aswanikumar, B. A. Corcoran et E. L. Becker, *J. Exp. Med.*, **143**, 1154 (1976).
- [34] W. C. Still, M. Kahn et A. Mitra, *J. Org. Chem.*, **43**, 2923 (1978).
- [35] J. E. Richman et T. L. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 2268 (1974).
- [36] W. L. Smith, J. D. Ekstrand et K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3539 (1978).

English Summary.

The synthesis of new cyclic tetramers of formylmethionyl-leucyl-phenylalanine amides from tetraazacycloalkanes incorporating a spacer arm is described. These new analogs were designed for their ability to release lysozyme from human neutrophils.