

SYNTHÈSE DE LA DL-LYSINE MARQUÉE SELECTIVEMENT PAR L'AZOTE 15 EN α OU EN ϵ ET SON DEDOUBLEMENT.

J. et Ch. Mizon.

Laboratoire de Biochimie, U.E.R. de Pharmacie, rue du
Professeur Laguesse, 59045 LILLE Cedex.

Received on December 20th 1973.

RESUME

Les auteurs décrivent les améliorations qu'ils ont apportées aux procédés déjà connus de synthèse de la DL-lysine, marquée à 1^{15}N en α ou en ϵ . La bis $\text{N } \alpha \text{ N } \epsilon$ -chloracétyl lysine, nécessaire pour réaliser le dédoublement de la DL lysine sous l'action de l'acyclase est préparée avec un bon rendement à l'aide du chloracétate de paranitrophényle.

SUMMARY

An improved method is described for synthesizing DL-lysine, ^{15}N labelled on α or ϵ . The paranitrophenylchloracetate was used in lieu of chloracetylchloride for synthesizing the bis $\text{N } \alpha \text{ N } \epsilon$ -chloracetyl lysine, which was subjected to the action of hog kidney acylase. L-lysine was thus obtained.

Devant utiliser pour nos expérimentations métaboliques des quantités relativement importantes de lysine marquée sur l'un ou l'autre de ses atomes d'azote, nous avons été amenés à préparer chacun de ces produits en reprenant des procédés de synthèse tout à fait classiques. Il s'est cependant révélé utile d'apporter aux modes opératoires qui étaient décrits, certaines précisions ou modifications, ce qui motive la présente note.

Ces adaptations concernent essentiellement les conditions de condensation de la phtalimide ^{15}N avec l' α bromo ϵ benzoyl amino caproate d'éthyle dans le procédé A (préparation de la DL-lysine α ^{15}N) et avec la bromobutyl-hydantoïne dans le procédé B (préparation de la DL-lysine ϵ ^{15}N). Les protocoles choisis permettent d'introduire l'azote marqué dans les tout derniers stades de la préparation.

Le dédoublement de la DL-lysine en ses deux isomères optiques est réalisé classiquement par action de l'acylase de rein de porc sur la bis N α N ϵ -chloracétyl lysine, selon GREENSTEIN (1-2). Cependant, à l'échelle de préparation où nous nous plaçons, la synthèse de cette dernière par action du chlorure de chloracétyle, décrite comme satisfaisante avec une mole de monochlorhydrate de DL-lysine (182,5 g) s'est révélée difficile à appliquer. L'utilisation du chloracétate de paranitrophényle, selon la méthode décrite par WARREN et al. (3) pour l'acide α aminoacétique, permet d'obtenir aisément la bis N α N ϵ -chloracétyl lysine avec un bon rendement.

Afin d'éviter de multiples recherches bibliographiques à ceux qui mettraient en oeuvre ces procédés, nous rappelons ci-après nos différents essais, ainsi que la totalité des modes opératoires depuis les matières premières commerciales dans la partie expérimentale.

Nous avons d'abord essayé de préparer le DL-lysine α ^{15}N , en condensant le phtalimidomalonate d'éthyle sodé marqué (4) avec la 4 iodobutylphtalimide, selon ARNSTEIN (5), puis avec la 4 bromobutylphtalimide, plus stable et plus facilement accessible, préparée par la méthode utilisée par DRAKE pour obtenir la bromoéthylphtalimide (6). Cependant, après l'incorporation de l' ^{15}N , plusieurs étapes sont encore nécessaires pour obtenir la lysine, et le rendement par

rapport au produit marqué de départ, la phthalimide¹⁵N, en est forcément diminué. De plus, la lysine obtenue est souillée par la présence de glycolle, produit d'hydrolyse du phthalimidomalonate d'éthyle sodé n'ayant pas réagi.

Nous avons utilisé la technique proposée initialement par BRAUN (7) et reprise par différents auteurs (8-9), qui consiste à préparer l' α -bromo ϵ -benzoylaminoacaproate d'éthyle, à partir de la cyclohexanone (schéma 1). Nous présentons les modalités opératoires qui nous ont permis de réaliser la condensation avec la phthalimide, dans de bonnes conditions. Le rendement de cette technique ainsi modifiée et sa facilité d'exécution se comparent favorablement aux procédés décrits par ailleurs (10).

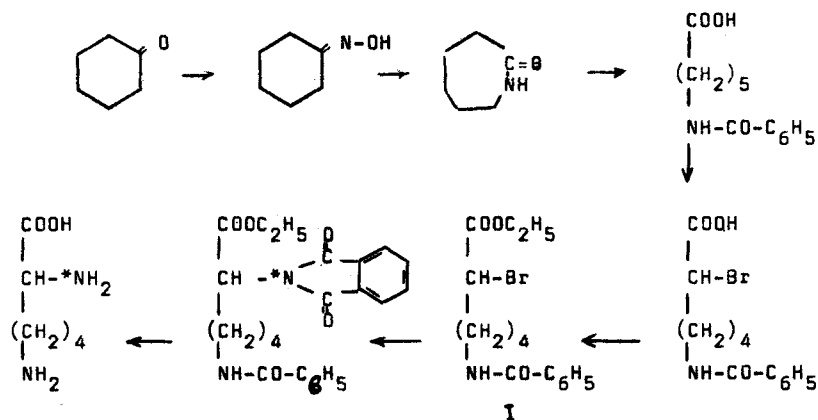


Schéma 1

De même, la DL-lysine ϵ ¹⁵N est fréquemment préparée par la condensation de la phthalimide avec le bromobutylphthalimidomalonate

d'éthyle (11). Cependant, ce dernier dérivé ne cristallisent pas, la condensation avec la phtalimide ^{15}N est pratiquée directement sur le produit brut. Appliqué à des quantités plus faibles de produit de départ (10), il devient nécessaire de purifier le bromobutylphtalimidomalonate d'éthyle puis le dichlorhydrate de lysine marquée par chromatographie.

Nous avons donc préféré condenser la phtalimide ^{15}N avec la bromobutylhydantoïne, préparée selon GAUDRY à partir du dihydropyrane (13) (schéma 2)

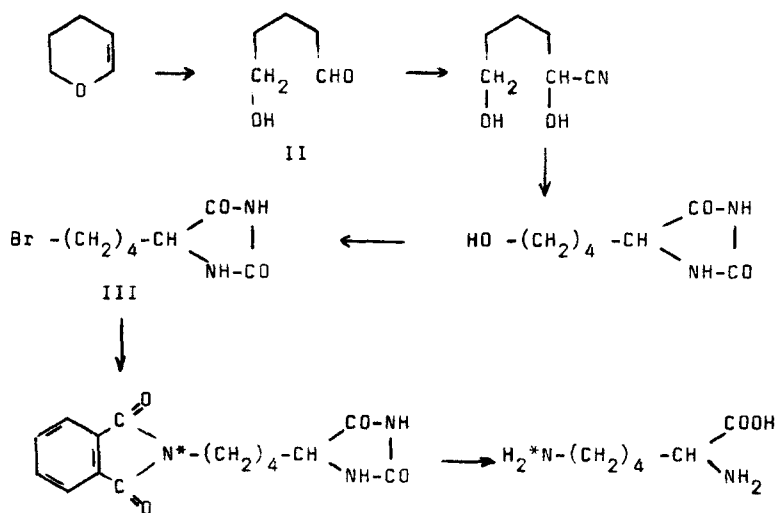


Schéma 2

La technique proposée ici, bien que nécessitant une hydrolyse sous pression par la baryte, permet de réaliser la condensation avec la phtalimide ^{15}N dans de meilleures conditions.

PARTIE EXPERIMENTALELYSINE α ¹⁵N : procédé A

La préparation de l' α bromo ϵ benzoylaminoacéproate d'éthyle (I) est classique (13).

8,25 g de I (25 mM) sont dissous dans 50 ml de DMF. Ajouter alors 3,7 g de phtalimide potassée (20 mM) et chauffer 90 minutes à 90°C, sous agitation. Diluer la suspension obtenue avec 50 ml de chloroforme et verser dans 120 ml d'eau. Séparer la phase organique et extraire à nouveau avec deux fois 20 ml de chloroforme. Les solutions organiques réunies sont lavées avec 20 ml de soude N/10, puis 20 ml d'eau, séchées sur sulfate de sodium sec et évaporées à siccité sous pression réduite. Le résidu est directement hydrolysé par chauffage de 24 heures à reflux dans le mélange HCl concentré 40 ml-acide acétique 20 ml. Après cristallisation à froid de l'acide phtalique, celui-ci est éliminé par filtration et la solution résiduelle est évaporée à sec, sous pression réduite, avec reprise par l'eau plusieurs fois pour éliminer l'acide chlorhydrique en excès. Le résidu, redissous dans 40 ml d'eau, réessoré si besoin est, pour éliminer l'acide phtalique restant, est amené à pH 5 par addition de pyridine, puis la solution obtenue est diluée par 4 fois son volume d'éthanol. Le monochlorhydrate de lysine commence immédiatement à cristalliser. Il est essoré après 24 heures à +4°C, lavé à l'éthanol absolu et séché. Il est recristallisé dans le mélange éthanol-eau (8-1).

PF : 258-260°C. % N théorique : 15,33

 % N pratique : 15,01

Rendement (après une recristallisation) par rapport à la phtalimide potassée: 2,7 g., soit 73 p.100.

La pureté a été contrôlée par électrophorèse sur papier WHATMAN n° 3, en tampon pyridine-acétique de pH 3 (90 minutes à 2500 v) et en chromatographie bidimensionnelle dans le système butanol-phénol. Révélation à la ninhydrine.

LYSINE ϵ 15 N : procédé B

La δ hydroxyvaléraldéhyde (II) est obtenue à partir du dihydropyrane (14). Elle n'est pas isolée et après neutralisation par la soude, de la solution aqueuse obtenue, elle est condensée directement avec le bisulfite de sodium et traitée de manière à obtenir la δ hydroxybutylhydantoïne, puis la δ bromobutylhydantoïne (III) selon GAUDRY (13).

9,4 g de III (40 mM) dissous dans 75 ml de DMF sont chauffés 90 minutes à 90°C sous agitation, après addition de 6,2 g de phthalimide potassée (33 mM).

La DMF est évaporée sous pression réduite et le résidu est épuisé par 3 fois 30 ml d'eau. Les extraits aqueux sont lavés deux fois avec du chloroforme puis la couche organique est ajoutée au résidu de condensation. Après évaporation à siccité, sous pression réduite, la masse pâteuse obtenue est hydrolysée à l'autoclave une heure à 160°C par la baryte (31 g d'octohydrate dans 170 ml d'eau). Après refroidissement de la bombe, on ajoute 12 g de carbonate d'ammonium et on essore. La solution obtenue est évaporée à sec et le résidu hydrolysé par ébullition 24 heures dans le mélange HCl concentré (100 ml)-acide acétique concentré (50 ml). La lysine est ensuite isolée comme précédemment.

PF : 258-261°C. % N théorique : 15,33

 % N pratique : 14,98

Rendement (après une recristallisation) par rapport à la phthalimide

potassée : 3,12 g (51 p.100).

La pureté a été contrôlée par électrophorèse sur papier WHATMAN n° 3, en tampon pyridine-acétique de pH 3 (90 minutes à 2500 v) et en chromatographie bidimensionnelle dans le système butanol-phénol Révélation à la ninhydrine.

DEDOUBLEMENT DU RACEMIQUE

Il est conduit selon la méthode de GREENSTEIN (1) à partir de la bis N α -N ϵ -chloracétyl lysine, elle-même obtenue par action du chloracétate de para nitrophényle. Ce dernier est préparé selon le procédé décrit par WARREN et al. (3)

2,36 g d'acide monochloracétique (25 mM) puis 4,18 g de para-nitrophénol (30 mM) sont dissous dans 75 ml d'acétate d'éthyle. A la solution ainsi obtenue et refroidie, sont ajoutés sous agitation 5,45 g de dicyclohexylcarbodiimide (25 mM) dissous dans 50 ml d'acétate d'éthyle. Un précipité blanc se forme presque immédiatement. L'agitation est continuée pendant 1 h30 à la température du laboratoire.

On ajoute alors 0,25 ml d'acide acétique. Après élimination de l'uréide formé par filtration, la solution restante est concentrée sous pression réduite. Le chlorhydrate de para nitrophényle récupéré est recristallisé dans l'éthanol-acétique.

PF : 95-97°C

Rendement : 80 p.100 après une recristallisation

La bis N α -N ϵ -chloracétyl lysine est alors préparée. 1,37 g de DL-lysine (7,5 mM) sont dissous dans 15 ml de NaOH N. Ajouter 5 ml d'acétone, puis peu à peu et sous agitation une solution de 3,8 g de chloracétate de p.nitrophényle (18 mM) dans 15 ml d'acétone. On maintient le pH entre 10 et 11 par addition de lessive de soude pendant la durée de la réaction. L'agitation est poursuivie une

heure puis le pH est ajusté à 7 avec HCl N, et l'acétone est éliminée sous pression réduite.

La solution résiduelle, acidifiée à pH 5,5 est extraite par 5 fois 20 ml d'acétate d'éthyle qui entraîne le para nitrophénol. La phase aqueuse, ajustée à pH 1,25, au moyen d'HCl 6 N, est épuisée par l'acétate d'éthyle (7 fois 25 ml). L'extrait organique, séché sur sulfate de sodium, est évaporé sous pression réduite et le résidu trituré avec un peu d'ether anhydre. Après 24 heures à +4°C, le bis N α N ϵ -chloracétyl lysine qui a cristallisé, est essoré. PF : 84-90°C.

Rendement : 1,57 g, soit 70 p.100.

Le bis N α N ϵ -chloracétyl lysine est alors incubée, à pH 7, en présence d'acylase de rein de porc (L.LIGHT & Co.LTD, Colnbrook, England)

L'isolement de l' N ϵ -chloracétyl lysine puis son hydrolyse sont conduits comme décrits par GREENSTEIN.

Le pouvoir rotatoire du monochlorhydrate de L lysine obtenu a été vérifié, à l'aide d'un polarimètre PERKIN-ELMER 141, en solution dans l'acide chlorhydrique 5 N (0,43 p.1000) à la température du laboratoire (22-25°C), dans une cellule en quartz de 1 dm.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - GREENSTEIN J.P., BIRBAUM S.M. et OTEY M.C.
J.Am.Chem.Soc., 75, (1953), 1994-1995
- 2 - GREENSTEIN J.P. et WINITZ M.
Chemistry of the Amino Acids, Vol.III, chap.32,
2097-2124. (John Wiley & Sons, Inc.)

- 3 - WARREN S.C., NEWTON G.G.F. et ABRAHAM E.P.
Biochem.J., 103, (1967), 891-901
- 4 - DUNN M.S. et SMART B.W.
J.Biol.Chem., 89, (1930), 41-50
- 5 - ARNSTEIN H.R.V., HUNTER G.D., MUIR M.M. et NEUBERGER A.
J.Chem.Soc., 2, (1952), 1329-1334
- 6 - DRAKE N.L. et GARMAN J.A
J.Amer.Chem.Soc., 71, (1949), 2425-2427
- 7 - BRAUN
Ber., 42, (1909), 839
- 8 - ECK J.C. et MARVEL C.S.
J.Biol.Chem., 106, (1934), 387-391
- 9 - WEISSMAN N. et SCHOENHEIMER R.
J.Biol.Chem., 140, (1941), 779-795
- 10 - GROVE J.A., GILBERTSON T.J., HAMMERSTEDT R.H. et HENDERSON L.M
Biochem.Biophys.Acta, 184, (1969), 329-337
- 11 - FINK R.M., ENNS T., KIMBALL C.P., SILBERSTEIN H.E., BALE W.F.,
MADDEN S.C. et WHIPPLE G.H.
J.Exp.Med., 80, (1944), 455-475
- 12 - GAUDRY R.
Can.J.Res., 26, sec.B, 387-392
- 13 - Synthèses organiques, II, 30-33 (MASSON, Ed.)
- 14 - Organic Syntheses, coll.vol.III, 470
(WILEY & Sons, Ed.)

* Les auteurs remercient Monsieur le Professeur Ch.LESPAGNOL des précieux conseils qu'il a bien voulu leur prodiguer.