

## PREPARATION DE

L'ACIDE méso DIAMINO-2,6 HEPTANE-DIOÏQUE-1,7- $[^3\text{H-3,4,5}]$   
 (méso-DIAMINO PIMELIQUE- $[^3\text{H-3,4,5}]$ )

D. SCHOTT, B. ROUSSEAU, J.P. BEAUCOURT, J.P. LELLOUCHE, L. PICHAT  
 Service des Molécules Marquées (Bâtiment 47)  
 CEN-SACLAY 91191 GIF-SUR-YVETTE CEDEX

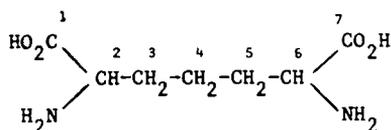
SUMMARY

Meso 2,6-diamino  $[^3\text{H-3,4,5}]$  1,7-heptanedioic acid- (meso  $[^3\text{H-3,4,5}]$  DAP) specific activity 30 Ci/mM was obtained by catalytic dehydrohalogenation of meso 3-chloro and 4-chloro DAP. LL, DD and meso DAP were analytically separated by cellulose thin layer chromatography (methanol-water-7 : 3).

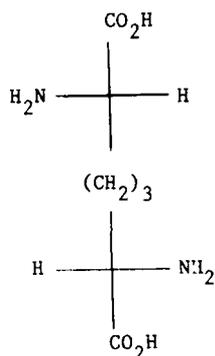
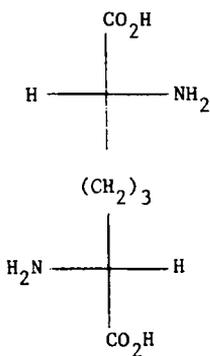
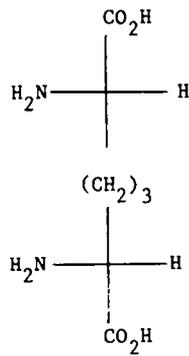
KEYWORDS

- \* meso 2,6-diamino 1,7-heptanedioic acid- $[^3\text{H-3,4,5}]$ .
- \* Meso 4-chloro DAP
- \* Meso 5-chloro DAP
- \* Catalytic dehydrohalogenation
- \* Cellulose thin layer chromatography

L'acide diamino-2,6 heptanedioïque-1,7 (DAP ; I) est un amino-acide naturel non protéinique de structure :

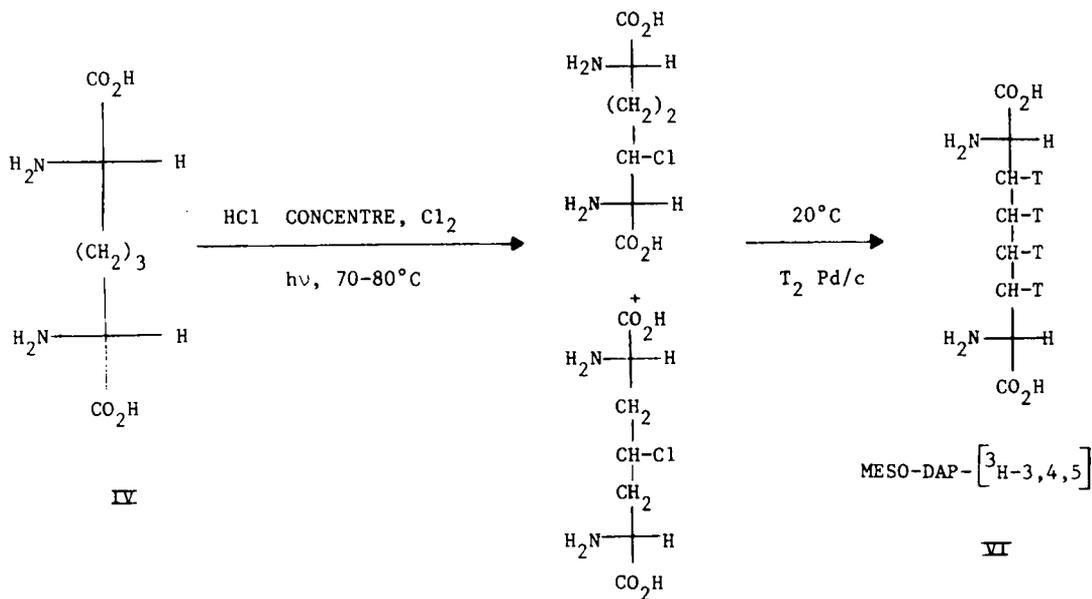


Les deux carbones asymétriques C2 et C6 impliquent l'existence de deux formes optiquement actives : le LL-DAP (II), le DD-DAP (III) et d'une forme optiquement inactive : le méso-DAP (IV).

(2S, 6S) DAP  
LL-DAPII(2R, 6R) DAP  
DD-DAPIII(2S, 6R) DAP  
més-DAPIVest optiquement  
inactif par  
compensation  
interne

Le LL-DAP (II) et le més-DAP (IV) présentent un intérêt biologique. Les hydrolysats des parois peptidiques de nombreuses bactéries contiennent très fréquemment du més-DAP (1) ainsi que du LL-DAP (1), très rarement du DD-DAP (2).

D'autre part, le més-DAP et le LL-DAP sont des précurseurs dans la biosynthèse de la L-lysine chez les bactéries (3). Nous avons préparé le més-DAP-<sup>3</sup>H (VI) à forte activité spécifique selon le schéma :



Selon ce schéma, HANUŠ et VEREŠ (5) ont déjà obtenu du DAP- $^{[3}\text{H-4]}$  mais avec une activité spécifique inférieure à 1 Ci/mM et sous forme d'un mélange (1 : 1 : 2) de LL-, DD- et méso-DAP- $^{[3}\text{H-4]}$  ce qui limite fortement l'intérêt biologique du produit obtenu.

Nous avons apporté diverses modifications qui nous ont permis d'avoir une A.S. de 30 Ci/mM et de disposer du diastéréoisomère méso VI pur qui n'était pas décrit dans la littérature.

Nous avons utilisé la technique de chloration directe du DAP par réaction radicalaire dans un milieu acide minéral fort (4). Dans ces conditions, nous n'avons pas retrouvé la sélectivité rapportée par HANUŠ et collaborateurs pour le méso-DAP (IV). En effet, nous avons obtenu un mélange V de chloro-3 DAP (70%) et de chloro-4 DAP (30% ; dosage effectué par RMN- $^1\text{H}$ ).

La réduction de V par le tritium sous pression atmosphérique en présence de charbon palladié à 10% conduit après purification, au méso-DAP- $^{[3}\text{H-3,4,5]}$  avec un rendement radioactif de 50%. Les positions et les pourcentages du marquage sont déterminés par RMN- $^3\text{H}$ .

D'après (6), il est possible de séparer le LL-DAP du mélange (méso + DD)-DAP. Ce mélange, après dérivatisation sous forme de composés dinitrophénylés ou didansylés, peut alors être résolu selon (7) et (8).

Nous avons mis au point la séparation des trois diastéréoisomères LL, DD et méso-DAP par CCM sur cellulose MERCK F<sub>254</sub> solvant méthanol-eau (7-3). La comparaison avec des témoins authentiques permet l'identification des composés. Ce contrôle chromatographique indique un pourcentage de méso-DAP tritié proche de 100%.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### 1 - CHLORO MESO DAP V

1,32 g (4,43 mM) de méso DAP\* dichlorhydrate sont dissous dans 7 ml d'HCl concentré placés dans un tube de quartz. Le milieu est saturé en Cl<sub>2</sub> et irradié pendant 18 heures à l'aide d'une lampe basse pression HANOVIA (100W). Le précipité obtenu brisé à

---

\* Le méso-DAP dichlorhydrate ( $\alpha_D^{20} = 0,2$  C = 0,97 dans HClN, traces de L-lysine) ainsi que les témoins de LL, et DD-DAP nous ont été aimablement fournis par Monsieur VAN HEIJENOORT, Institut de Biochimie, Université de PARIS-SUD - ORSAY.

la baguette de verre est remis en suspension dans HCl concentré pendant 10 mn, puis, filtré sur verre fritté n°4. Les cristaux qui se colorent rapidement sont lavés par 4 ml d'éthanol, 2 x 4 ml d'éther puis séchés sous 0,1 mm Hg pendant 36 heures en dessiccateur.

On obtient 400 mg de V dichlorhydrate ;  $R^{dt} = 30\%$ .

### ANALYSES

Chromatographies sur couche mince de cellulose MERCK  
F<sub>254</sub>.

RMN-<sup>3</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub> ; référence TMS) :

$\delta = 2,25$  ppm (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-);  $\delta = 3,60$  ppm

(m, 2H, -CH<sub>2</sub>-<sup>CO<sub>2</sub>H</sup> ;  $\delta = 4,1$  ppm (m, 1H, >CH-Cl) ;  
NH<sub>2</sub>)

$\delta = 7,3$  ppm (s, 8H échangeables dans D<sub>2</sub>O).

AUTO-ANALYSEUR D'AMINO-ACIDES (LIQUIMAT II KONTRON ANALYTIC).

V est élué sur une colonne de résine sulfonique 7 $\mu$  DURRUM CHROMATOGRAPHY DC-6A (DURRUM CHEMICAL CORPORATION CALIFORNIA) l = 260 mm,  $\varnothing = 4$  mm avec un débit de 24 ml/h. L'éluant est un système de 3 tampons DURRUM PICO-BUFFER. V est détecté par fluorimétrie après dérivatisation avec l'orthophtalaldéhyde.

T<sub>R</sub> = 1555 s.

2 - méso-DAP-<sup>[<sup>3</sup>H-3,4,5]</sup> VI

12 mg de V sont réduits par le tritium gazeux en présence de 41 mg de charbon palladié à 10% (ENGELHARD). Après neutralisation du milieu et filtration sur filtre MILLIPORE TEFLON LS 5 $\mu$ , on évapore puis porte VI sur une colonne de DOWEX 50W12 (forme <sup>+</sup>H) éluee successivement à l'eau et avec HCl 3N.

La purification est achevée par chromatographie préparative sur papier SCHLEICHER et SCHULL n° 2316 lavé (éluant : méthanol-eau-pyridine 80-20-4). Après découpe et élution de la bande radioactive à l'eau, on recueille 800 mCi de VI. Le rendement radioactif est de 50%.

### ANALYSES

Chromatographies sur couches minces de cellulose MERCK  
F<sub>254</sub>. VI est homogène dans les solvants :

1. méthanol-eau 7-3 ( $R_F = 0,29$ )
2. n-butanol-acide acétique-eau 50-25-25 ( $R_F = 0,10$ )

AUTO-ANALYSEUR D'AMINO-ACIDES

Dans les conditions décrites précédemment, VI a un temps de rétention de 3540 s. La pureté radiochimique est de 97,5%, l'activité spécifique de 32,7 Ci/mM.

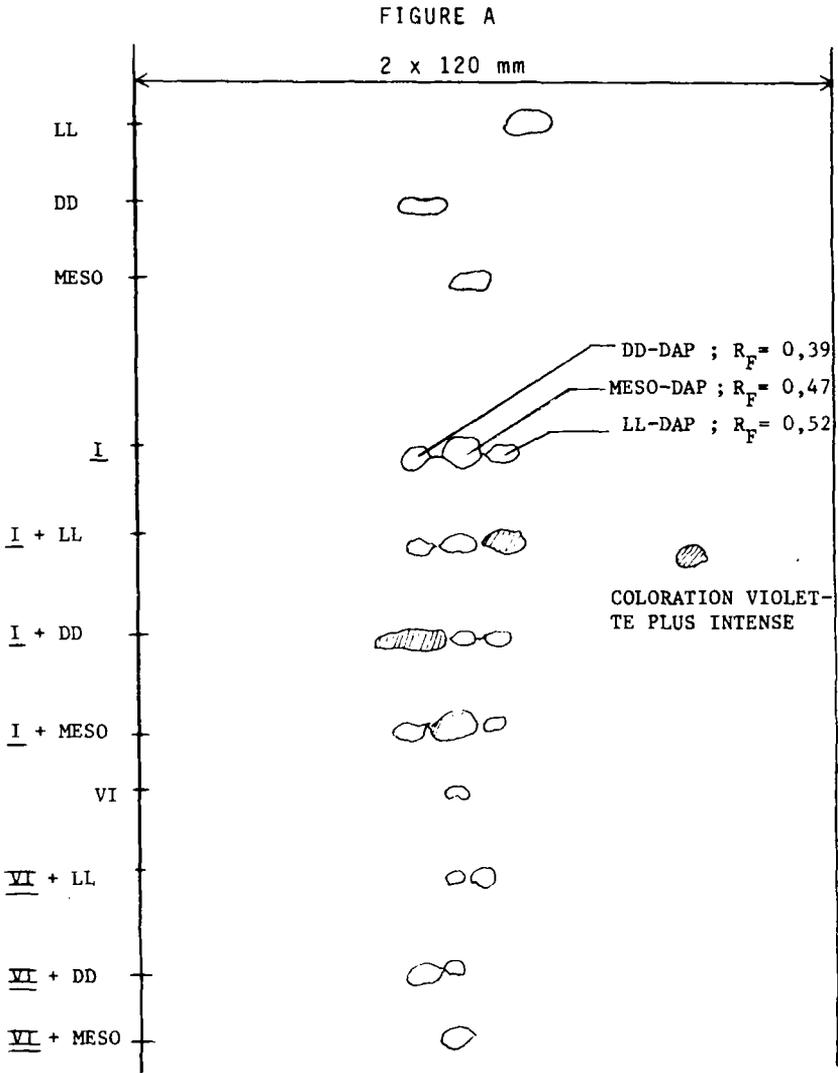
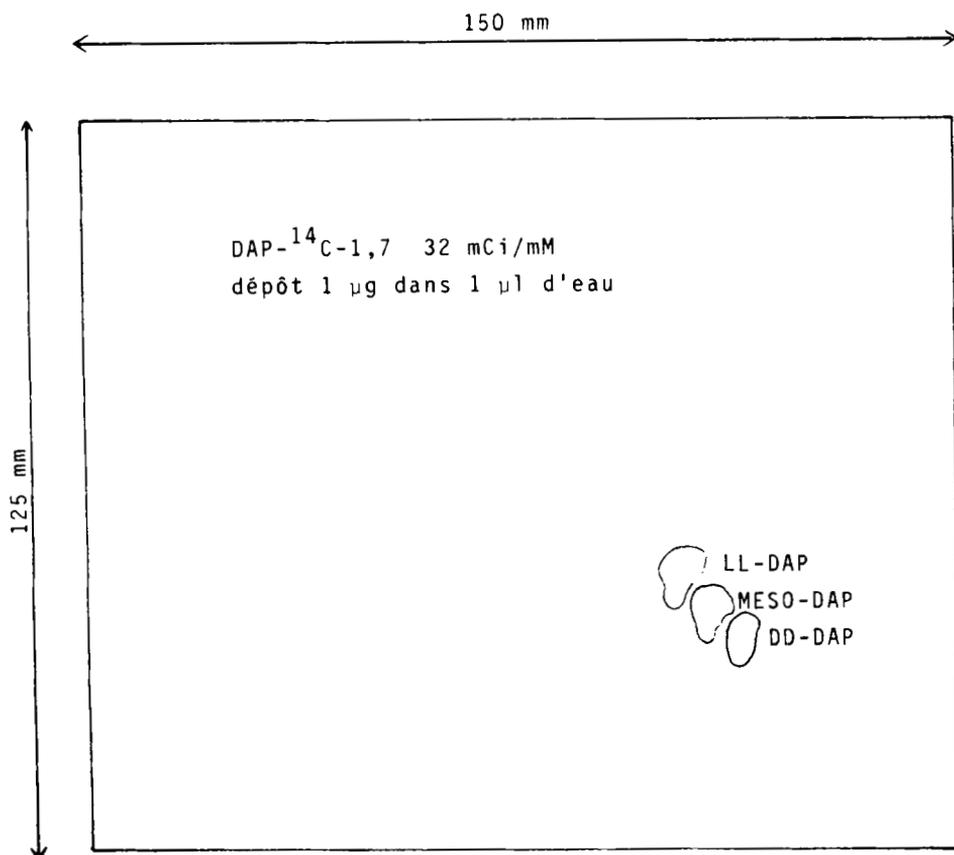


FIGURE B



RMNN-<sup>3</sup>H (D<sub>2</sub>O ; référence TMS)

δ = 1,3 ppm 54% position 4

δ = 1,6 ppm 43% position 3 et 5

### DAP I 3 - RESOLUTION CHROMATOGRAPHIQUE DES DIASTEREOISOMERES DU

Nous avons utilisé des feuilles de cellulose MERCK F<sub>254</sub> (20 cm x 20 cm ; épaisseur 0,1 mm) et le mélange méthanol-eau (7-3) pour le développement.

La cuve est équilibrée pendant 30 mn avant utilisation. Une simple migration ne permet aucune résolution de I ; par contre un double développement (2 x 120 mm ; figure A) ou un développement en deux dimensions (150 mm x 125 mm ; figure B) permet de résoudre I

en 3 amino-acides que nous avons identifiés par superposition avec des témoins authentiques de LL, DD et méso-DAP\*.

La résolution de I dépend fortement de la quantité de DAP I déposé sur la feuille (1 mg maximum dans 0,5 µl d'eau) et de la taille du dépôt ( $\phi$  = 1 mm maximum). Les amino-acides sont révélés à la ninhydrine et par autoradiographie sur film KODAK KORIDEX dans le cas de VI.

#### BIBLIOGRAPHIE

- (1) E. WORK, Biochem. J., 49, 17 (1951)  
D.S. HOARE et E. WORK, Biochem. J., 61, 562 (1955).  
D.S. HOARE et E. WORK, Biochem. J., 65, 441 (1957).
- (2) E. BRICAS, J.M. GHUYSEN et P. DELEZE, Biochemistry, 6, 2598 (1967).
- (3) B.D. DAVIS, Nature, 169, 534 (1952).  
D.L. DEWEY et E. WORK, Nature, 169, 533 (1952).
- (4) J. HANUŠ, J. TOLMAN et K. VEREŠ, Collection Czechoslov. Chem. Commun., 38, 1212 (1973).
- (5) J. HANUŠ et K. VEREŠ, J. Labelled Compounds, VII, n°4, 425 (1971).
- (6) L.E. RHULAND, E. WORK, R.F. DENMAN et D.S. HOARE, J. Amer. Chem. Soc., 77, 4844 (1955).
- (7) D. JUSIČ, C. ROY, A.J. SCHOCHER et R.W. WATSON, Can. J. Chem., 41 (10), 2715 (1963).
- (8) A. CHIMIĄK et T. POLONSKY, J. Chromatography, 115, 635 (1975).