

SYNTHESE, RESOLUTION OPTIQUE ET RADIOLYSE D'ACIDES AMINES A HAUTE ACTIVITE SPECIFIQUE : L-ORNITHINE (^3H -3,4,5,5), L-ARGININE (^3H -3,4,5,5), ACIDE DL-GLUTAMIQUE (^3H -3,4) ET ACIDE DL-GLUTAMIQUE (^3H -3,4,4).

D. EGO, J.P. BEAUCOURT

Service des Molécules Marquées

L. PICHAT (Directeur de Recherches)

CEN-SACLAY

91191-GIF-SUR-YVETTE-CEDEX FRANCE

=====

SUMMARY

Ethyl 2-acetylamino-2-carbethoxy-4-cyano-3-butene oate : 3 was prepared by condensation of *trans*-1-bromo-2-cyanoethylene : 2 with ethyl sodio acetamidomalonate. 3 was catalytically reduced with tritium followed by hydrolysis giving rise to (3,4,5,5- ^3H) DL ornithine 5 spec. act. 103 Ci/mM. L-ornithine 6 was isolated by preparative reversed phase HPLC on a chiral phase. From 5, (3,4,5,5- ^3H) DL arginine spec. activity : 90 Ci/mM was prepared by guanidation and the l (+) enantiomer isolated by preparative HPLC.

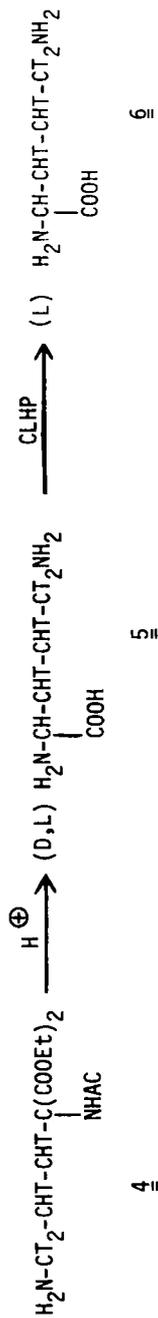
Selective catalytic tritiation of 3 in presence of tris (triphenylphosphine) Rh followed by hydrolysis gave [3,4- ^3H] DL-glutamic acid spec. activity 60 Ci/mM. [3,4,4- ^3H] DL-glutamic acid spec. activity 90 Ci/mM was also obtained by catalytic tritiation of compound 15 followed by hydrolysis. ^3H -NMR analyses were carried out in each case. Observations on the self radiolysis under various storage conditions are reported.

Key words : ^3H -NMR, amino acids

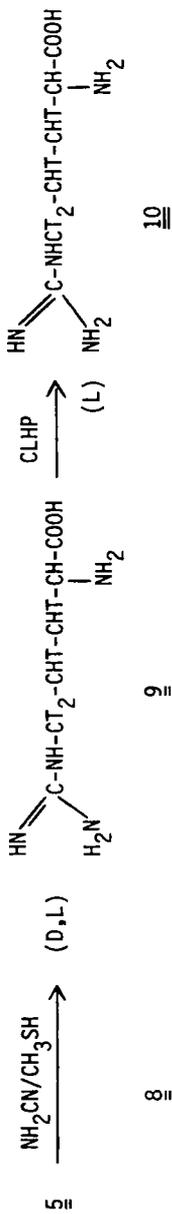
Dans une précédente publication (1), nous avons décrit l'obtention, la résolution et la conservation d'acides aminés marqués au tritium à forte activité spécifique : D,L-lysine (^3H), L-lysine (^3H), acide D- α -aminoadipique (^3H) ; acide γ -aminobutyrique ^3H . Compte tenu de l'importance de ce type de composés pour les recherches en biologie, nous avons préparé des acides aminés tri-

Précurseur	Catalyseur	Solvant	Temps	Act. Tot.	6		12	
					%	A.S.	%	A.S.
<u>3</u> (5 mg)	Pd/C 10% (5 mg)	Isopropanol : 1 ml CH ₃ COOH : 0,5 ml	2 heures	60 mCi	0%	-		
<u>3</u> (8 mg)	Ni Raney	Isopropanol : 1 ml KOH : 1,5 mg dans 0,5 ml méthanol	18 heures	160 mCi	8%	103 Ci/mM	17%	
<u>3</u> (8 mg)	Pt/SiO ₂ (8 mg)	Anhydride acétique : 1 ml	10 heures	440 mCi	90%	55 Ci/mM	10%	
<u>3</u> (6 mg)	PdO/BaSO ₄ (6 mg)	0,05 ml eau+0,05 ml d'acide phosphorique 0,7 ml ac. trifluoro- acétique 0,8 ml méthanol	1 heure	1300 mCi	80%	72 Ci/mM	20%	
<u>3</u> (7 mg)	Pd/C 10% (7 mg)	Méthanol : 1 ml Acide trifluoroacé- tique : 0,1 ml	2 heures	1400 mCi	97%	102 Ci/mM	3%	
<u>3</u> (7 mg)	Cl $\left[\left(C_6H_5 \right)_3 PRh \right]_3$ (20 mg)	Benzène : 1 ml	18 heures	1400 mCi	0%		100%	60 Ci/mM

TABLEAU N°1 : Saturation catalytique par le tritium gaz du nitrile 3



SCHEMA 1



SCHEMA 2

tiés : acide DL-glutamique (^3H), L-ornithine, L-Arginine (^3H -3,4,5,5) à très hautes activités spécifiques.

La résolution des composés racémiques a été réalisée par voie enzymatique ou par une méthode de chromatographie liquide haute pression utilisant un polymère chiral comme phase stationnaire.

1) L-Ornithine (^3H -3,4,5,5) (6) (Schéma 1)

Les synthèses d'ornithine tritiée publiées à ce jour conduisent à des activités spécifiques inférieures à 15 Ci/mM (2-5). Le précurseur 3 que nous avons synthétisé permet la fixation théorique de 4 atomes de tritium, et donc une activité spécifique théorique de 120 Ci/mM.

Les nitriles α -acétyléniques donnent lieu à des réactions d'addition nucléophile, et en particulier à l'addition trans d'acide bromhydrique sur la triple liaison (6-8). Ainsi l'addition de HBr sur le nitrile propiolique 1 conduit au bromo-1 cyano-2 éthylène 2 qui, après réaction sur 1e sodioacétamidomalonate d'éthyle, fournit le malonate 3. Ce dernier peut être réduit en 4 par le tritium en présence de différents catalyseurs et dans différents solvants (tableau 1). Certains catalyseurs (Ni Raney) conduisent à des réactions lentes et à de faibles rendements. Les réductions menées en milieu acide (Pt/SiO₂ dans l'anhydride acétique, PdO/ BaSO₄ dans l'acide trifluoroacétique) donnent lieu à des réactions d'échange et à une diminution de l'activité spécifique.

L'hydrolyse du malonate 4 en milieu acide fournit quantitativement la DL-ornithine 5. La RMN- ^3H permet de déterminer les positions du marquage par le tritium en fonction du catalyseur utilisé lors de la réduction (tableau 2). L'essai n°2 qui conduit aux meilleurs résultats (Pd/C 10%) se caractérise par une répartition sensiblement égale du tritium sur les positions 3,4 (48%) et 5 (52%).

L'essai n°3 a consisté en une réduction en deux temps de 3 réduction de la double liaison en présence de chlorure de tris (triphenylphosphine) rhodium, puis réduction de la fonction nitrile en présence de Pd/C (10%). Dans ce cas, l'activité spécifique (85 Ci/mM) est inférieure à celle de réduction directe par le Pd/C 10% (103 Ci/mM). De plus, la totalité du tritium est située sur les positions 3 et 4 (0% en position 5).

La résolution du composé racémique 5 en L-ornithine (^3H -3,4,5,5) est réalisée par C.L.H.P. sur un support chiral constitué d'une silice C18 sur laquelle est absorbé un copolymère acrylamide/PEPRO (pyridine-éthylproline) ; la phase est ensuite complexée par des ions Cu⁺⁺ et l'éluion est réalisée par une solution de KNO₃ 0,02M. Ce support nous a été fourni par MM. AUDEBERT et CHARMOT*. La sélectivité de la séparation chromatographique des isomères est de 0,27.

Essai	Catalyseur	Position 2	Positions 3-4	Position 5
1	Pt/SiO ₂	0 %	62 %	38 %
2	Pd/C 10%	0 %	48 %	52 %
3	1) Cl [(C ₆ H ₅) ₃ P Rh] ₃ 2) Pd/C 10% CF ₃ COOH	0 %	100 %	0 %
4	Ni Raney	7 %	41 %	52 %
5	PdO/BaSO ₄		63 %	37 %

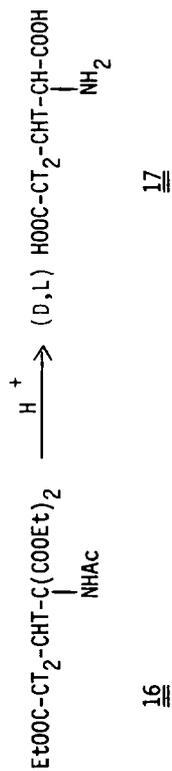
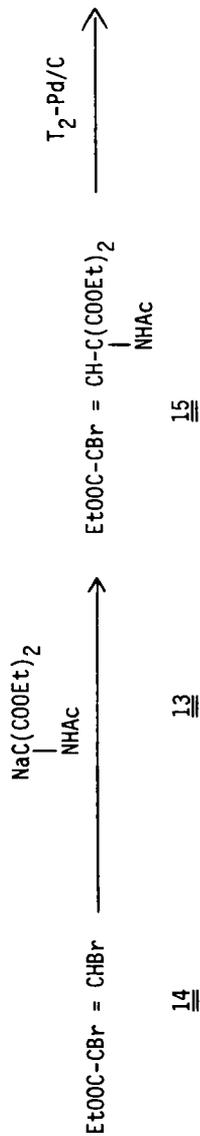
Tableau 2 : Distribution du tritium sur l'ornithine (³H) 6 selon le catalyseur utilisé.

La L-ornithine (³H-3,4,5,5) obtenue par cette méthode a une activité spécifique de 103 Ci/mM, et est radiochimiquement et optiquement pure.

2) L-Arginine (³H-3,4,5,5) 10 (Schéma 2)

L'arginine étant généralement obtenue par guanidation de l'ornithine, les activités spécifiques décrites dans la littérature sont celles obtenues lors de la préparation de la L-ornithine (³H) : 15 Ci/mM.

En traitant la D,L-ornithine (³H-3,4,5,5) 5 (activité spécifique : 103 Ci/mM) par la cyanamide 8 en solution aqueuse saturée par le méthylmercaptan (9), la D,L-arginine (³H-3,4,5,5) 9 est obtenue avec un rendement de 80% et une activité spécifique de 90 Ci/mM. La résolution de 9 est obtenue par C.L.H.P. sur support chiral de silice C18 greffé par un copolymère acrylamide/PEPRO (pyridine éthylpyridine) et complexation de la phase par des ions Cu⁺⁺. Le coefficient de sélectivité est de 0,34, ce qui permet d'obtenir la L-arginine (³H-3,4,5,5) d'activité spécifique : 90 Ci/mM 10 radiochimiquement et optiquement pure. La répartition du tritium a été déterminée par RMN-³H : 78% sur les positions 3 et 4, 22% sur la position 5.

SCHEMA 3
=====SCHEMA 4
=====

3) Acide DL-Glutamique (^3H -3,4) 12 (Schéma 3)

Plusieurs synthèses de l'acide DL-glutamique marqué au tritium sont rapportées dans la littérature. Il s'agit soit de réactions d'échange (10-12) conduisant à des activités spécifiques faibles soit de réactions de réduction de composés halogénés (13) ou éthyléniques (14) pouvant conduire à des activités spécifiques de 60 Ci/mM.

Nous avons utilisé le précurseur éthylénique 3 déjà utilisé lors de la synthèse de la L-ornithine (^3H -3,4,5,5) 6 pour obtenir l'acide DL-glutamique (^3H -3,4) 12 après une simple réduction de la double liaison par le tritium en présence de chlorure de tris (triphenyl phosphine) rhodium et hydrolyse du groupement nitrile par HCl aqueux. Ce catalyseur (P^3P)₃RhCl réduit en effet sélectivement les doubles liaisons sans réduire les fonctions nitriles.

Après purification sur colonne échangeuse Dowex 50W X12 puis sur papier Schleicher Schull n° 2316, l'acide 17 est obtenu radiochimiquement pur avec une activité spécifique de 60 Ci/mM (tableau 1). Le tritium est réparti également sur les positions 3 et 4, comme le montre le spectre de RMN- ^3H .

4) Acide DL-glutamique (^3H -3,4,4) (17) (Schéma 4)

La synthèse de l'acide DL-glutamique marqué au tritium sur les positions 3 et 4 avec une activité spécifique de 90 Ci/mM nous a été inspirée par les travaux de KISHIDA (15) qui a décrit l'obtention du dérivé bromo vinylique 15 par condensation de l' α,β di-bromoacrylate d'éthyle 14 sur l'acétamido malonate d'éthyle 13. Le malonate 15 constitue un précurseur intéressant de l'acide D,L-glutamique (^3H). La réduction de 15 par le tritium gaz en présence de Pd/C à 10% fournit en effet après hydrolyse l'acide DL-glutamique (^3H -3,4,4) 17 avec une activité spécifique de 90 Ci/mM et la répartition suivante du tritium : 41% en position 3, 52% en position 4 et 6% en position 2 (RMN- ^3H).

5) Essais de conservation de l'acide DL-glutamique 12 et de la L-ornithine 6 à très haute activité spécifique.

Ces composés ont été conservés après purification en solution stérile, après filtration sur filtre Millipore sous UV, à une concentration variant de 1,0 à 2 mCi/ml soit en flacon type pénicilline (conservation à + 4°C), soit en ampoule scellée sous vide (conservation à - 196°C). Nous avons comparé divers systèmes de conservation : solution aqueuse à + 4°C (A), solution aqueuse avec 2% d'éthanol à + 4°C (B) et solution aqueuse à -196°C (C). La température de conservation et la présence d'éthanol ne semblent pas jouer un rôle déterminant. La méthode de purification utilisée, a,

Tableau 3 : Essais de conservation des aminoacides 12 et 16

	Mode de Stockage	Mode de Purification	Pureté radiochimique après stockage %		
			1 mois	3 mois	7 mois
Acide DL-Glutamique (³ H-3,4) 12 (90 Ci/mM)	A	Dowex	99	65	-
	B	Dowex	98	-	-
	C	Dowex	97	70	-
	A	Dowex + papier	99	98	96
	B	Dowex + papier	99	98	96
	C	Dowex + papier	99	98	97
	A	Dowex	99	98	-
	C	Dowex	99	99	-
	A	Papier	97	96	-
L-Ornithine (³ H-3,4,5,5) 6 (102 Ci/mM)	C	Papier	98	97	-
	A	Dowex + papier	99	99	-
	C	Dowex + papier	99	99	-
	C	Dowex + papier	99	99	-

par contre, une influence sur la stabilité de 12 et de 6. Pour l'ornithine 6 des purifications sur Dowex ou par chromatographie préparative sur papier semblent suffisantes. Par contre, pour l'acide glutamique 12, ce type de purification entraîne une dégradation de 30% en trois mois, alors qu'une double purification sur Dowex et par chromatographie préparative papier, permet une bonne conservation (2% de dégradation en 7 mois). Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.

PARTIE EXPERIMENTALE

trans-Bromo-1 cyano-2 éthylène : 2

40 mM (2,04 g) de propiononitrile 1 sont traitées par HBr 48% à 100°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, extraction au chloroforme, évaporation et distillation ($E_{760} = 143^{\circ}\text{C}-145^{\circ}\text{C}$), on obtient 2 avec un rendement de 90%.

RMN- ^1H (CDCl_3) : $\delta = 6,4$ ppm (d, CH, 1H) ; 7,3 (d, CH-1H)
 SM : m/e (%) = 131 (1,6) - 133 (1,6) - $[\text{M}]^+$; 52 (4,2) $[\text{M}-\text{Br}]^+$
 IR : 725 cm^{-1} ($\nu_{\text{Csp}^2-\text{H}}$) - UV (méthanol) : 226 nm.

Acétylamino-2 carbéthoxy-2 cyano-4 butène-3 oate d'éthyle : 3

10 mM (1,31 g) de 2 dans 10 ml d'éthanol sont ajoutés à 0°C à une solution de dérivé sodé d'acétamido malonate d'éthyle (15 mM) dans l'éthanol. Après 2 heures d'agitation à + 5°C et une nuit à température ambiante, le solvant est évaporé et le résidu est purifié sur une colonne de gel de silice type "H" éluée par le mélange Hexane-Acétate d'Ethyle (50-50)-(Rdt = 70%).

RMN- ^1H (CDCl_3) : $\delta = 1,3$ ppm (t, CH_3 , 6H) ; 2,0 (s, CH_3CO , 3H) ; 4,5 (q, CH_2 , 4H) ; 6,5 (d, CH, 1H) ; 7,4 (d, CH, 1H) - SM : m/e (%) = 268 (1,4) $[\text{M}]^+$; 223 (0,5) $[\text{M}-\text{OEt}]^+$; 153 (6,7) ; 108 (2,7).

DL-Ornithine (^3H -3,4,5,5) 5

4 mg de 3 dans 1 ml de méthanol et 0,1 ml d'acide trifluoroacétique sont réduits par le tritium gaz en présence de 4 mg de Pd sur charbon à 10%. Après 2 heures d'agitation, le mélange réactionnel est filtré sur "Millipore" et évaporé à sec. Le résidu est hydrolysé par 2 ml de $\text{HCl}2\text{N}$ pendant 4 heures à reflux. Après évaporation, la DL-ornithine obtenue est purifiée par chromatographie liquide sur colonne de Dowex 50WX 12 forme H^+ (élution : gradient

de HCl 1N à HCl 4N) puis par chromatographie préparative sur papier Schleicher-Schull n° 2316 lavé (éluant : n-butanol-Acide Acétique-Eau : 20-10-10).

On obtient 1 Ci de 5 radiochimiquement pure avec une activité spécifique de 103 Ci/mM (autoanalyseur d'acides aminés)

RMN-³H (D₂O) : δ = 1,7 ppm à 2,2 ppm (45% de tritium en 3 et 4); 3,1 ppm (55% de tritium en 5).

L-Ornithine (³H-3,4,5,5) 6

Le racémique 5 est résolu par passage en C.L.H.P. sur une colonne (150 x 4,6 mm) de copolymère acrylamide/PEPRO (pyridine-éthyl-proline) absorbé sur silice et complexé par des ions cuivreux; l'élution est réalisée par une solution 0,02 M de KNO₃ (débit 2 ml/mm). Le coefficient de sélectivité est de 0,27.

DL-Arginine (³H-3,4,5) 9

1 mM (100 mCi) de DL-ornithine (³H-3,4,5,5) 5 sont solubilisés dans 2 ml d'eau. La solution est saturée à 0°C par un barbotage de méthylmercaptan et 1,5 mM de cyanamide 8 sont ajoutés. Après agitation pendant 7 heures à température ambiante et évaporation, le résidu est purifié et contrôlé dans les mêmes conditions que 5.

L-Arginine (³H-3,4,5,5) 10

La résolution du racémique 9 est réalisée dans des conditions identiques à celles de l'obtention de la L-ornithine : 6 avec un coefficient de sélectivité de 0,34.

Acide DL-Glutamique (³H-3,4) 12

7 mg (0,038 mM) de 3 sont réduits par le tritium gaz en présence de 29 mg de chlorure de tris (triphénylphosphine rhodium) dans 1 ml de benzène pendant 18 heures à la température ambiante. Après filtration et évaporation, le résidu est repris par 20 ml d'HCl 4N et le mélange est chauffé à reflux durant trois heures. Après évaporation, le résidu est purifié par chromatographie liquide sur colonne de Dowex 50W X12 forme H⁺ (élution : gradient de H₂O à HCl 1,5N), puis par chromatographie préparative sur papier Schleicher-Schull n° 2316 lavé (éluant : n-Butanol-Acide Acétique-Eau : 20-10-10) pour fournir 1 Ci d'acide DL-glutamique (³H-3,4) (12) radiochimiquement pur (Activité spécifique : 60 Ci/mM mesurée à l'autoanalyseur d'acides aminés).

RMN-³H (D₂O) : δ = 1,9 ppm (50%-T₃) ; 2,1 (50%-T₄).

Acide DL-Glutamique (³H-3,4,4) 17

6 mg (0,015 mM) de 15 sont solubilisés dans 1 ml de méthanol et réduits par le tritium gaz en présence de 6 mg de Pd sur charbon (10%) et de 0,2 ml de NaOH 0,1N pendant une heure. Après filtration, évaporation, et hydrolyse durant deux heures par HCl 4N à reflux, le mélange est purifié dans les mêmes conditions que 12. L'activité spécifique déterminée par l'autoanalyseur d'acides aminés, est de 90 Ci/mM. La RMN du tritium dans D₂O indique la répartition suivante du marquage : 41% sur la position 3, 52% sur la position 4 et 6% sur la position 2.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) D. EGO, J.P. BEAUCOURT, L. PICHAT
J. Label. Comp. (1985).
- 2) E.A. EVANS
"Tritium and its compounds" Butterworths LONDON (1974).
- 3) L. BIRKOFER, K. HEMPEL, W. NOUVERTNE
Chem. Ber. 98, 3200 (1965).
- 4) S. THYA GARAJAN, I. MEZO, I. TEPLAN, J. MARTON
Acta Chem. Acad. Scient. Hung. 73 (1), 23 (1972).
- 5) H. HAVRANEK, I. MEZO.
Acta. Chem. Acta. Scient. Hung. 77 (2), 341 (1973).
- 6) E. WINTERFELDT
Angew. Chem. Internat. Ed. 6 (5), 423 (1967).
- 7) E. GRYSKIEWICZ-TROCHIMOWSKI, W. SCHMIDT, O. GRYSKIEWICZ-TROCHIMOWSKI.
Bull. Soc. Chim. F₁. 593 (1948).
- 8) I.V. SMIRNOV-ZAMKOV, G.A. PISKOVITINA
Ukrainsky. Chim. 2, 30, 1076 (1964).
- 9) KYOICHI, FUJII, SHIGEAKI
Synthesis of Amino Acids, Peptides and Proteins. 67, 10293 (1967).
- 10) J.M. PARMENTIER
J. Lab. Comp. 2, 367 (1966).
- 11) M. WENZEL, M. BRUHMULLER, K. ENGELS
J. Lab. Comp. 3, 234 (1967).

- 12) M.C. HOCHREITER, K.A. SCHELLENBERG
J. Lab. Comp. 5, 270 (1969).
- 13) M. AUDINOT, L. PICHAT
Résultats non publiés.
- 14) L. BIRKOFER, K. HEMPEL
Chem. Ber. 96, 1373 (1963).
- 15) Y. KISHIDA, N. NAKAMURA
Chem. Pharm. Bull. 17, 2424 (1969).

REMERCIEMENTS :

Nous tenons à remercier MM. AUDEBERT et CHARMOT du Laboratoire de Physico-Chimie Macromoléculaire de l'Université Pierre et Marie Curie de PARIS, qui nous ont aimablement fourni le support chiral pour C.L.H.P. et nous ont aidé de leurs conseils.