

**SYNTHESE DE DERIVES TRITIÉS DU PEPTIDE NATRIURETIQUE
AURICULAIRE (ANF) ET MISE EN EVIDENCE DE LA FORMATION
D'UN DERIVE LINEAIRE BIOLOGIQUEMENT ACTIF**

P. PHAM, A. MOUSTIER, B. ROUSSEAU, J.P. BEAUCOURT

Service des Molécules Marquées
CEN-SACLAY
91191 GIF-SUR-YVETTE CEDEX FRANCE

Summary : Synthesis of tritium labelled ANF derivatives and characterization of a tritiated biologically active linear peptide by-product.

Syntheses and analyses of three tritiated rat atrial natriuretic peptides (ANF) derivatives : (4-³H-Phe⁸)ANF, (4-³H-Phe²⁶)ANF, (4-³H-Phe⁸, 3,5-³H₂-Tyr²⁸)ANF are described. These biologically active peptides were obtained by catalytic dehalogenation of iodinated precursors in the presence of tritium gas and Pd catalysts and exhibited high specific radioactivity (20-55 Ci/mmol, 740-2035 GBq/mmol).

A radioactive by-product isolated by HPLC was characterized as a modified linear analogue of ANF(1-28) : ³H-(Ala^{7,23})ANF and was biologically active.

Résumé :

Trois dérivés tritiés de l'ANF (1-28) de rat : (³H-4-Phe⁸)ANF, (³H-4-Phe²⁶)ANF et (³H-4-Phe⁸,³H₂-3,5-Tyr²⁸)ANF ont été obtenus à partir de précurseurs halogénés. Les activités biologiques sont conservées et les activités spécifiques obtenues sont de l'ordre de 20 Ci/mMole (740 GBq/mMole) et 55 Ci/mMole (2035 GBq/mMole) respectivement pour les peptides mono- et tri-tritiés.

Au cours de la synthèse, il y a formation de l'analogue linéaire radioactif (Ala^{7,23})ANF biologiquement actif.

Key words : Atrial natriuretic peptide (ANF) ; linear ANF derivative ; tritium labelling ; reverse-phase HPLC.

INTRODUCTION

La forme moléculaire majeure circulante des peptides natriurétiques auriculaires est un peptide de 28 résidus comprenant un pont disulfure Cys⁷-Cys²³. Ce peptide appelé ANF présente une structure similaire chez le rat et chez l'homme où un seul aminoacide Met remplace le 12^e résidu Ile (1-4).

ANF de rat :

H-Ser¹-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys⁷-Phe⁸-Gly-Gly-Arg-Ile¹²-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys²³-Asn-Ser-Phe²⁶-Arg-Tyr²⁸-OH.

Les effets biologiques de l'ANF, similaires chez les deux espèces sont nombreux et variés : natriurétiques, diurétiques, vasorelaxants ou encore hypotensifs (1-5). La stimulation de la sécrétion du GMP cyclique par l'ANF semble jouer un rôle important (4,6,7), mais le mécanisme d'action des effets biologiques observés reste à élucider.

La mise en évidence des récepteurs de l'ANF ainsi que certaines études de liaisons hormone-récepteur ont pu être réalisées avec de l'ANF marqué à l'iode 125 (8-11). Cependant ce dérivé présente deux inconvénients majeurs :

1- La présence de l'atome d'iode, encombrant et très polaire, au sein de la molécule d'hormone peut fausser les résultats de liaison aux récepteurs.

2- Le marquage est limité à la Tyrosine²⁸ de l'extrémité C terminale, résidu qui est absent chez d'autres peptides natriurétiques plus courts tels que les atriopeptins I et II (12).

Dans le but d'obtenir un dérivé radioactif de l'ANF, de structure inchangée et d'activité spécifique élevée, nous sommes proposés de synthétiser le peptide tri-tritié (³H-4-Phe⁸, ³H₂-3,5-Tyr²⁸)ANF. Deux autres peptides utiles notamment à l'étude du métabolisme de l'ANF ont également été synthétisés : (³H-4-Phe⁸)ANF et (³H-4-Phe²⁶)ANF.

Au cours de la synthèse de ces peptides tritiés, il se forme un dérivé radioactif qui peut devenir le produit majeur de la réaction selon les conditions de réduction catalytique utilisées. La purification de ce produit et ses analyses physicochimiques ont permis de l'identifier comme le dérivé linéaire : ³H-(Ala⁷,23)ANF. Ce peptide conserve partiellement

l'activité biologique de l'ANF suggérant ainsi que la présence d'une forme cyclique et/ou des deux atomes de soufre n'est pas indispensable à l'activité de stimulation du GMP cyclique des cellules glomérulaires épithéliales.

RESULTATS ET DISCUSSION

Tritiation de précurseurs iodés de l'ANF

Les essais de tritiation des 3 précurseurs iodés : (I-4-Phe⁸)-ANF, (I-4-Phe²⁶)ANF et (I-4-Phe⁸, I₂-3,5-Tyr²⁸)ANF en utilisant des conditions classiques de réduction catalytique (tampon phosphate 0,05M, pH 7,5, PdO, tritium gaz, 2 heures à température ambiante, pression atmosphérique) ont conduit à des rendements très faibles en ANF tritié (environ 1%).

Nous avons alors examiné l'influence du catalyseur, du pH et du temps de réaction sur le rendement final en ANF tritié. Les résultats obtenus sont similaires pour les trois précurseurs.

a) Influence du pH

La valeur du pH optimum est de 7,5 environ. Pour des valeurs supérieures à 8,5 on observe une précipitation de l'ANF. On sait d'autre part que des valeurs de pH inférieures à 5,5 favorisent la coupure du pont disulfure en présence de catalyseurs palladiés (13).

b) Influence du catalyseur

Nous avons testé les catalyseurs couramment utilisés pour la réduction catalytique d'iodures aromatiques (13-15) : oxyde de palladium PdO, palladium sur carbonate de calcium Pd/CaCO₃ à 5%, palladium sur alumine Pd/Al₂O₃ à 5 et 10% .

Avec l'oxyde de palladium, on obtient seulement 1,1% de précurseur réduit en ANF après 2 heures. De plus, l'oxyde de palladium PdO semble favoriser la dégradation de l'ANF tritié en impuretés polaires non identifiées. Par contre, avec le palladium à 10% sur alumine on obtient 52% de précurseur transformé après 15 minutes.

c) Influence du temps de réaction

Le temps de la réaction de tritiation est le paramètre le plus important pour le rendement en ANF tritié. Une durée de 15 minutes (catalyseur : Pd/Al₂O₃ 10%) donne les meilleurs résultats (Tableau I).

Tableau I :

Temps de réaction	ANF tritié (%)	Analogue (Ala ^{7,23})ANF-3H (%)	Précurseur iodé non réduit (%)
15 minutes	52	11	25
2 heures	6	16	10
4 heures	5	15	2

Avec un temps de réaction de 15 minutes, il reste encore 25% de précurseur iodé non réduit. L'augmentation du temps de réaction permet de réduire cette quantité ; par contre elle entraîne une dégradation importante de l'ANF tritié en impuretés polaires non identifiées. Avec le catalyseur Pd/Al₂O₃ 5%, le pourcentage d'ANF tritié passe dans les mêmes conditions de 45 à 5%.

Purification de l'ANF tritié

Les conditions d'analyse et de purification par chromatographie liquide haute performance (CLHP) décrites dans la littérature (16-19) (gradient de solvants : acétonitrile-acide trifluoroacétique) n'ont pas donné satisfaction pour les faibles quantités d'ANF tritié obtenues (<0,05 nM). Nous avons amélioré ces résultats en faisant varier les pourcentages d'acétonitrile, la force ionique et le pH du tampon et en utilisant un tampon triéthylamine-phosphate (TEAP) au lieu d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA).

La meilleure résolution a été obtenue en utilisant les conditions suivantes :

- prépurification du mélange brut de tritiation (après élimination des labiles) par passage sur une cartouche Sep-Pak C-18.

- colonne ODS-300Å (5µ) éluée en isocratique par le mélange de solvants (acétonitrile - tampon TEAP pH 2,3 à 2,6, force ionique 0,15 à 0,5M) / (18 - 82).

Dans ces conditions (Figure 1), nous avons séparé correctement l'ANF tritié de son précurseur halogéné et de l'analogue linéaire (Ala^{7,23})ANF (Temps de rétention respectifs : 21, 40 et 26 minutes).

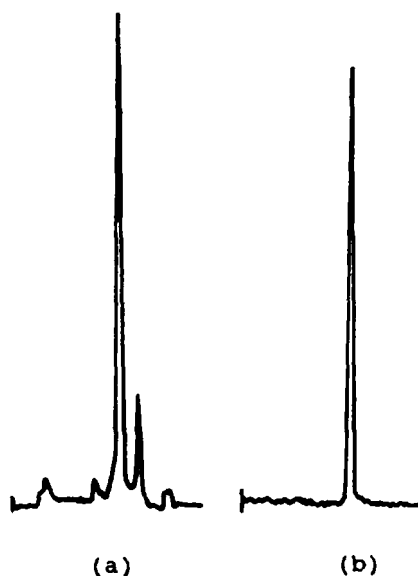


Figure 1 : CLHP analytique sur colonne Nucléosil ODS 5 μ , 300 \AA , élution isocratique (débit 0,7 ml/min) par le mélange (18-82) d'acétonile- tampon TEAP 0,5M, pH 2,45 :
 a / Produit brut après tritiation et après passage sur Sep-Pak
 b / (³H-4-Phe²⁶)ANF(1-28) obtenu après purification sur colonne CLHP semi-préparative (7x300mm, 5 μ , 300 \AA).

Caractérisation de l'analogue linéaire (Ala^{7,23})ANF tritié

Ce composé radioactif, non attendu, se forme indépendamment du précurseur utilisé : (I-4-Phe⁸)ANF, (I-4-Phe²⁶)ANF ou (I-4-Phe⁸, I₂-3,5-Tyr²⁸)ANF. La RMN du tritium réalisée sur les trois échantillons respectifs indique que le marquage a lieu sur les positions attendues : ³H-4-Phe²⁶, ³H-4-Phe⁸ et ³H-4-Phe⁸, ³H-3,5-Tyr²⁸ mais aussi dans la région des méthyles (CH₃-, δ = 1,8 ppm) (figure 2).

Son traitement par le dithiothréitol ou le dithioérythritol, réactifs connus pour leur action réductrice des ponts disulfures (20), ne conduit à aucune réaction alors que l'ANF, traité par ces réactifs, se transforme en un nouveau produit (supposé l'analogue ANF-SH) différent de l'analogue étudié. Ce dernier ne possède donc plus de pont disulfure.

Les spectres de masse (méthode Fast Atom Bombardment) obtenus montrent un pic moléculaire majoritaire vers 3000 (MH⁺)

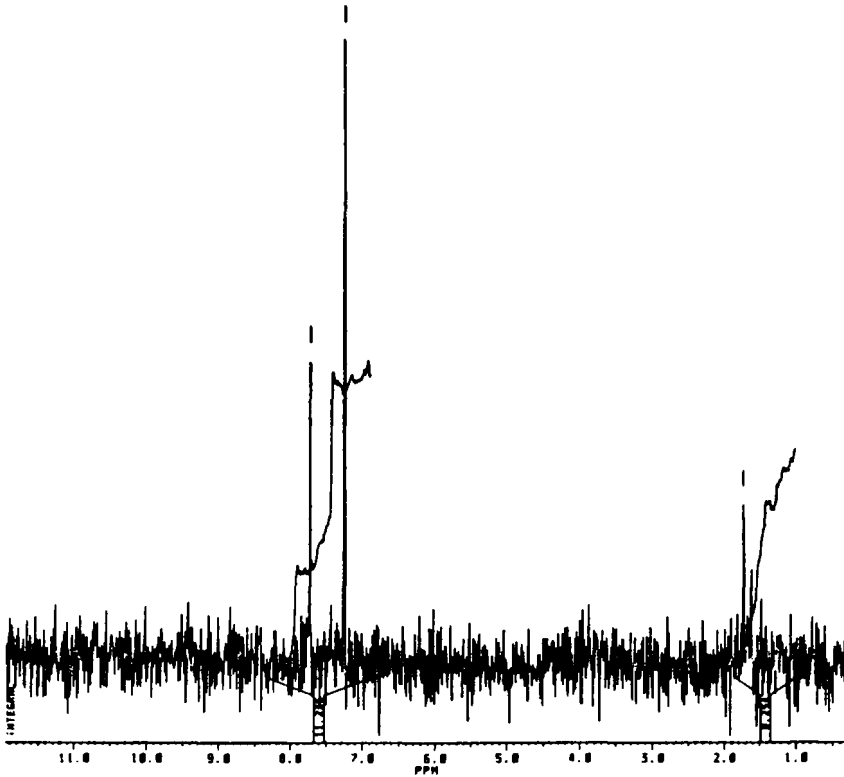


Figure 2 : RMN du tritium (320 MHz) du dérivé linéaire $3\text{H}-(\text{Ala}^{7,23})\text{ANF}$.

pour un produit non radioactif (réduction de précurseur par l'hydrogène). Cette masse correspond à une molécule d'ANF sans les deux atomes de soufre.

Après hydrolyse acide (21), l'analyse d'acides aminés (22) donne les renseignements suivants :

- absence de résidu cystéine
- présence de trois résidus Ala alors que l'ANF n'en possède qu'un seul.
- présence de tous les autres résidus de l'ANF, dans un rapport identique à l'ANF.

L'ensemble de ces résultats permet d'identifier le produit radioactif comme l'analogue linéaire $(\text{Ala}^{7,23})\text{ANF}$ de structure :

$\text{H-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-}\underline{\text{Ala}}\text{-Phe-Gly-Gly-Arg-Ile-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-}\underline{\text{Ala}}\text{-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH}$.

Des résultats préliminaires (23) indiquent que ce composé serait un agoniste partiel de l'ANF pour la stimulation du GMP cyclique par les cellules épithéliales de glomérules humaines (effet agoniste à des concentrations supérieures à 10^{-7} M et effet inhibiteur à des concentrations inférieures à 10^{-8} M). Il présente de plus une bonne affinité pour les cellules glomérulaires de culture étudiées.

Il semblerait donc que la présence du pont disulfure S⁷-S²³ ne soit pas indispensable à l'activité biologique de l'ANF.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel

L'ANF de rat (1-28) de référence provient de NOVABIOCHEM (SUISSE) ou de UCB (BELGIQUE), les précurseurs iodés sont de chez UCB.

L'analyse d'acides aminés est réalisée à l'aide d'appareils automatisés d'analyse LKB 4000 (utilisant 5 nanomoles par analyse, couplage à la ninhydrine, détection UV-Vis) ou Biotronik (utilisant environ 0,5nMole, couplage post-colonne au dialdéhyde phtalique (OPA), détection par fluorescence).

La radioactivité totale d'une solution est mesurée à l'aide d'un appareil LKB (1211 Rack Beta).

La concentration des peptides tritiés est déterminée soit par EIA (Enzyme immunoassay) soit par CLHP.

Dans le premier cas, il faut d'abord s'assurer de la pureté du produit car en utilisant un anticorps commercial, selon la méthode décrite (24), on mesure aussi bien la quantité d'ANF que de ses précurseurs iodés. Le manque de sélectivité des anticorps polyclonaux actuellement disponibles a déjà été souligné (25). Dans le second cas en utilisant un détecteur d'absorption à barrette de diodes, du type "LKB 2140 rapid spectral detector", un microordinateur (IBM) et un logiciel (NELSON) on arrive à déterminer très précisément la concentration du peptide après avoir tracé la courbe d'étalonnage.

Mode opératoire

(³H-4-Phe⁸)ANF(1-28) :

On pèse 3,2mg (1,0 μMole) de [¹-4-Phe²⁸]ANF dans un tube

"minisorb" encastré dans un réacteur en verre et on dissout le peptide dans 1 ml de tampon phosphate 0,004M, pH7,5 préalablement dégazé. Après congélation de la solution on ajoute 10mg de Pd/Al₂O₃ 10% et après dégazage de la rampe on introduit du tritium gaz (25 Ci, 925 GBq) pendant 20 minutes (agitation magnétique, P=latm, T=21°C). On arrête ensuite l'agitation, congèle la solution avec de l'azote liquide et enlève l'excès de tritium par évacuation sous vide.

Après réchauffement à 20°C, la suspension est centrifugée à 5.000 t/mn pendant 20 minutes. Le surnageant est transféré dans un ballon conique silanisé et le précipité est lavé par deux extractions (2x1ml) avec du tampon précédent. Après élimination des labiles par concentration à sec on récupère alors 7,5 mCi (277 MBq) de la solution aqueuse. L'extraction par 2x1ml d'acide acétique 2,5% permet de récupérer encore 2,2 mCi (81 MBq) de produit brut.

L'analyse par CLHP (dans les conditions de la Fig.1) montre que l'on a obtenu au total 52% d'ANF tritié et environ 11% de l'analogue linéaire (Ala^{7,23})ANF, le reste étant du précurseur qui n'a pas réagi (25%) et des produits dégradés.

Après passage sur une cartouche Sep Pak C-18 (prélavée avec de l'acétonitrile puis de l'eau) puis deux purifications par CLHP sur colonne Nucléosil 5µ, 300 Å, (7 x 300)mm, élution isocratique 1,5 ml/min avec le mélange (acétonitrile-tampon TEAP 0,5M, pH 2,5) / (17-83) on obtient une solution d'ANF pure que l'on dessale en traitant sur Sep Pak comme précédemment. La solution finale obtenue (dans l'acide acétique 0,05M) est distribuée dans des cryotubes que l'on garde dans l'azote liquide. Rendement 3,44 mCi (127 MBq), 13,8% par rapport au précurseur utilisé. Activité spécifique 20 Ci/mMole (740 GBq/mMole). CLHP (colonne 4 x 300mm Nucléosil 5µ, 300 Å, élution isocratique : acétonitrile 78% dans TEAP 0,5M, pH 2,4) : un seul pic avec un temps de rétention (Tr) de 18,8 minutes (pureté supérieure à 99%).

(3H-4-Phe²⁶)ANF(1-28) :

On dissout 2 mg (0,5 µMole) de (I-4-Phe²⁶)ANF(1-28) dans 0,8 ml de tampon phosphate 0,005M, pH 7,5 dégazé. Après congélation de la solution on ajoute 7,2 mg de Pd/Al₂O₃ 10%. La tritiation et la purification suivent le protocole précédent.

Activité totale du brut de synthèse : 8,2 mCi (303 MBq). L'analyse par CLHP montre que l'on obtient environ 51% d'ANF tritié, 7% d'analogue linéaire et 25% de précurseur.

Après purification par CLHP et déssalage on obtient 3,45 mCi (128 MBq) d'ANF tritié pur, soit un rendement de 25% par rapport au précurseur utilisé.

Activité spécifique : 21 Ci/mMole (777 GBq/mMole)

RMN du tritium : un seul pic à 7,69 ppm (singulet)

CLHP : un seul pic de Tr=18,8 min, identique à celui de l'ANF, pureté >99%.

(³H-4-Phe⁸,³H₂-3,5-Tyr²⁸)ANF (1-28) :

On solubilise 1,1mg(0,25 μMole) de (I-4-Phe⁸,I₂-3,5-Tyr²⁸) ANF dans 0,5 ml de tampon phosphate 0,004M, pH 7,5 dégazé. Après congélation, on ajoute 4,5 mg de Pd/Al₂O₃ 10%. Le même protocole que précédemment est suivi pour donner 9,9 mCi (366 MBq) de produit brut. L'analyse par CLHP montre que l'on obtient environ 30% d'ANF tritié seulement, et 16% d' analogue linéaire. Par contre, on observe non seulement la présence de précurseur tri-iodé mais également de dérivés mono- et di-iodés tritiés.

La purification par CLHP et le déssalage permettent d'obtenir 3,1 mCi (115 MBq) de produit tritié recherché avec une radioactivité spécifique de 57 Ci/mMole (2110 GBq/mMole).

RMN(³H) : δ = 7,72ppm, s, (Phe, 1T) ; δ = 7,25, s, (Tyr, 2T).

CLHP analytique : un seul pic, pureté ~ 99,8%.

(Ala^{7,23})ANF(1-28) :

Les analyses ont été réalisées sur un produit non radioactif (0,4 mg), obtenu comme décrit précédemment, par hydrogénation du précurseur (I-4-Phe²⁶)ANF(1-28).

- Spectromètre de masse (FAB)

MH⁺ : bande centrée à 3000

- Analyse d'acides aminés :

a) détection par fluorescence

	Arg	Asp	Ser	Glu	Gly	Ala	Ile	Leu	Tyr	Phe
ANF	5,16	1,86	4,60	1,00	4,98	1,06	1,86	1,97	0,97	1,94
Analogue	5,16	1,87	4,70	1,00	5,19	3,03	1,92	2,02	1,00	2,00

b) détection à la ninhydrine

	Arg	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Ile	Leu	Tyr	Phe	Arg
ANF	2,03	4,70	1,03	4,96	1,10	1,06	1,90	2,00	0,97	1,96	5,16
Analogue	1,94	4,77	1,20	4,84	2,90	0	1,83	2,00	0,98	1,96	5,04

Remerciements :

Nous remercions vivement le Dr. D. BLANOT de l'Université PARIS-SUD, Institut de Biochimie, ORSAY, ainsi que Madame O. LEBOURGUAIS du Service de Biochimie, CEN-Saclay.

BIBLIOGRAPHIE

1. M. CANTIN, J. GENEST
Endocrine Rev., 6, 107-127 (1985)
2. A. J. DE BOLD
Science, 230, 767-770 (1985)
3. D. SCHWARTZ, D. M. GELLER, P. T. MANNING, N. R. SIEGEL
K.F. FOK, C.E. SMITH, P. NEEDLEMAN
Science 229, 397-400 (1985).
4. R.F. NUTT, D. F. VEBER
Endocrinol. Metabol. Clin. N. Am., 16, 19-41 (1987)
5. P. NEEDLEMAN and J.E. GREENWALD
New. Engl. J. Med., 314, 828-834 (1986).
6. N. ARDAILLOU, M.P. NIVEZ, R. ARDAILLOU
FEBS Lett., 204, 177-182 (1986).
7. B.J. BALLERMAN, B.M. BRENNER
Circ. Res., 58, 619-30 (1986)
8. M.A. NAPIER, R.L. VANDLEN, G. ALBERS-SCHONBERG, R.F. NUTT,
S. BRADY, T. LYLE, R. WINQUIST, E.P. FAISON, L.A. HEINEL,
E.H. BLAINE
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5946-5950 (1984)
9. A. De LEAN, J. GUTKOWSKA, N. McNICOLL, P.W. SCHILLER,
M. CANTIN, J. GENEST.
Life Sci., 35, 2311-2318 (1984).
10. Y. HIRATA, S. TAKATA, M. TOMITA, S. TAKAICHI
Biochem. Biophys. Res. Comm., 132, 976-984 (1985)
11. D.B. SCHENCK, L.K. JOHNSON, K. SCHWARTZ, H. SISTA,
R.M. SCARBOROUGH, J.A. LEWICKI
Biochem. Biophys. Res. Comm., 127, 433-442 (1985)

12. D.M. GELLER, M.G. CURRIE, K. WAKITANI, B.R. COLE,
S.P. ADAMS, K.F. FOK, N.R. SIEGEL, S.R. EUBANKS,
G.R. GALLUPPI, P. NEEDLEMAN
Biochem. Biophys. Res. Comm., 120, 333-338 (1984)
13. R.L. AUGUSTINE
" Catalytic Hydrogenation "
Marcel DEKKER Inc. (NEW-YORK) (1965)
14. M.H. CHARON, P. PHAM VAN CHUONG, B. PENKE, J.L. MORGAT,
M. DUBRASQUET, P. FROMAGEOT
J. Label. Comp. Radiopharm., XXI, 15-36 (1984)
15. R. GENET, J.L. MORGAT, P. FROMAGEOT
5ème réunion Peptides, LE TOUQUET 2-5/86/1986
16. T.G. FLYNN, M.L. De BOLD, A.J. De BOLD
Biochem. Biophys. Res. Comm., 117, 859-865 (1983)
17. J. GUTKOWSKA, G. THIBAULT, P. JANUSZEWICZ, M. CANTIN,
J. GENEST
Biochem. Biophys. Res. Comm., 122, 593-601 (1984)
18. K. KANGAWA, A. FUKUDA, I. KUBOTA, Y. HAYASH, H. MATSUO
Biochem. Biophys. Res. Comm., 121, 585-591 (1984)
19. C.C. GLEMBOTSKI, T.R. GIBSON
Biochem. Biophys. Res. Comm., 132, 1008-1017 (1985)
20. W.L. ZAHLER, W.W. CLELAND
J. Biol. Chem., 243, 716-719 (1968)
21. Z. GRZONKA, B. LAMMEK, D. GAZIS, I. L. SCHWARTZ
J. Med. Chem., 26, 1786-1787 (1983)
22. G. AUGER, D. BLANOT, J. VAN HEIJENOORT, C. NADAL,
M.F. GOURNAY.
Eur. J. Biochem., 133, 363-369 (1983)
23. R. ARDAILLOU
Résultats non publiés
24. L.L. Mc LAUGHLIN, Y. WEI, P.T. STOCKMANN, K.L. LEAHY,
P. NEEDLEMAN, J. GRASSI, P. PRADELLES
Biochem. Biophys. Res. Comm., 144, 469-476 (1987)
25. U. ACKERMANN
Clin. Chem., 32/2, 241-247 (1986)