

EMPLOI D'UN NOUVEAU MAILLON BROMACETAMIDO COMME SYSTEME D'ANCRAGE
REVERSIBLE EN SYNTHÈSE PEPTIDIQUE SUR RESINE POLYACRYLIQUE

F. Baleux, J. Daunis* et R. Jacquier

Unité Associée au CNRS n° 468 - Place E. Bataillon - 34060 Montpellier Cedex-France

B. Calas

Equipe de Recherche Associée au CNRS n° 140 - Place E. Bataillon-34060 Montpellier Cedex-France

Abstract : *The bromacetamido group, allowing the reversible anchoring of the first amino acid by an ester bound deriving from a glycolic amide, fits the conditions required by solid-phase synthesis on polyacrylic resins. Final cleavage of the peptide from the support can be realised in smooth, quantitative and non racemizing conditions, allowing alternatively the isolation of a terminal acid, ester or amide function. Synthesis of the 1-14 residue of human angiotensinogen illustrates this new methodology.*

Dans un travail précédent nous avons décrit un polymère acrylique statistique tridimensionnel 1 obtenu par copolymérisation de la N-acrylyl pyrrolidine, de l'éthylènebis acrylamide et du N-acrylyl β -alaninate de méthyle ; nous avons ensuite étudié l'amidification par l'éthylènediamine en fonction du taux de fonctionnalisation en groupe ester et avons ainsi préparé des supports ¹ fonctionnalisés en NH₂ avec des taux allant jusqu'à 3 meq/g.

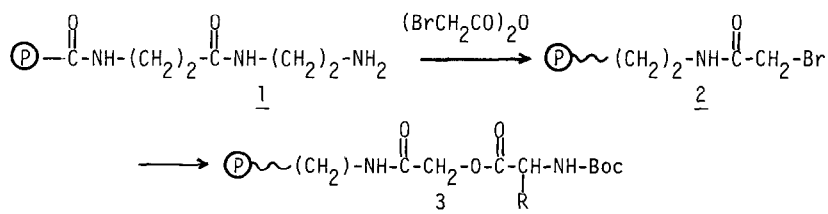
Nous avons maintenant établi que ce copolymère est un excellent support pour la synthèse peptidique en phase solide. Pour la résine polyacrylique de même type décrite par Sheppard², l'ancrage du premier acide aminé s'effectue par l'intermédiaire de différents maillons chlorométhylphényl acétamido ou propionamido³ ; les liaisons esters benzyliques formées présentent des stabilités variées vis à vis des réactifs acides ou nucléophiles⁴. Parmi les différentes résines de Sheppard actuellement commercialisées (Pepsyn) et ne différant entre elles que par la nature du maillon, le choix sera donc fonction de la stratégie (protection temporaire acido ou baso labile) et de la nature de la fonction terminale désirée (acide ou amide).

En phase solide, la situation idéale est celle d'un squelette polymérique entièrement solvaté et de chaînes peptidiques totalement dépliées et par suite fortement accessibles aux réactifs^{5,6}. Ces conditions, qui justifient l'emploi des supports polyacryliques⁷, ne sont toutefois pas totalement remplies avec la présence d'un maillon aromatique hydrophobe.

Nous avons donc envisagé d'utiliser un maillon hydrophile d'un type totalement nouveau, le maillon bromacétamido 2, qui devrait minimiser les interférences stériques et permettre d'améliorer les conditions de couplage, en particulier dans les solvants polaires.

Le premier acide aminé est donc fixé sur le support par l'intermédiaire d'une liaison ester

dérivant d'un amide glycolique 3. Nous avons établi que les propriétés de ce type de liaison sont entièrement compatibles avec les impératifs de la synthèse peptidique.



Un échantillon du support acrylique 1 réticulé à 6% et fonctionnalisé en NH_2 (0,52 meq/g), est placé dans un réacteur⁸ puis est lavé successivement par CH_2Cl_2 , TFA à 30 % dans CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 , DIPEA (diisopropylethylamine) à 10 % dans CH_2Cl_2 , DMF, puis mis en suspension pendant 15min dans une solution d'anhydride bromoacétique (3 équivalents) dans le DMF anhydre (test de Kaiser négatif), puis lavé avec DMF, CH_2Cl_2 , éther puis séché sous vide. Une partie aliquote de résine est hydrolysée pendant 10min par la soude 1N bouillante et le dosage selon Charpentier-Volhard des ions bromures libérés confirme que la réaction est quantitative. On agite ensuite 48h la résine avec le sel de césium d'un Boc(t-Butyloxycarbonyl)-acide aminé (5 équivalents) en solution dans le DMF ; après lavage par le DMF, traitement par TFA à 30 % dans CH_2Cl_2 pendant 30min, lavages par CH_2Cl_2 , neutralisation par DIPEA à 10 % dans CH_2Cl_2 , lavages par CH_2Cl_2 et l'éther, la résine est séchée sous vide. Le dosage des fonctions amines libérées soit par la méthode modifiée de Charpentier - Volhard⁹, soit par celle de Sarin-Merrifield¹⁰, montre que la substitution du brome par l'acide aminé est quantitative.

Trois échantillons de résine auxquels ont été fixés selon la méthode ci-dessus, respectivement Boc-Gly, Boc-Phe et Boc-Val, ont été utilisés pour tester la stabilité de la liaison ester vis à vis du TFA ; dans les conditions utilisées par Merrifield¹¹ (1min dans le TFA bouillant) la liaison ester Boc-Val- OCH_2 -polystyrène est clivée à 4,2 % alors qu'il y a en moyenne 0,03 % de perte en acide aminé lorsqu'on utilise le maillon "Pam"¹¹, l'un des plus résistants de ceux employés dans le groupe des résines polystyréniques⁴. Avec le maillon bromacétamido nous avons observé une perte moyenne faible (0,15 %) qui souligne sa bonne stabilité dans des conditions acides drastiques. Dans les conditions habituelles de clivage du groupe protecteur temporaire Boc, Sheppard observe une perte moyenne de 1,4 % par cycle synthétique avec le maillon p-hydroxyméthyl β -phénylpropionique lié à un support polyacrylique lors de l'action d'une solution de HCl 1N dans le dioxane² pendant 30min ; nous observons dans le cas du maillon bromacétamido une perte moyenne de 0,6 % seulement par traitement avec une solution de TFA à 30 % dans CH_2Cl_2 pendant 30min.

Nous avons ensuite contrôlé les qualités de ce maillon bromacétamido dans la synthèse du peptide test de Dorman-Merrifield : Leu-Ala-Gly-Val ; le premier acide aminé est fixé par l'intermédiaire de son sel de césium, les autres acides aminés sont couplés selon la méthode des anhydrides symétriques (un seul couplage de 15min, 3 équivalents en Boc-anhydride dans CH_2Cl_2) ; un dosage quantitatif¹⁰ des fonctions amines après chaque couplage montre que l'incorporation de chaque acide aminé a été totale. Le tétrapeptide N-protégé peut ensuite être clivé de son support selon trois méthodes :

a) par traitement 3h à température ambiante par 2 équivalents de soude 1N dans

iPrOH-H₂O(70/30), puis par AcOH jusqu'à pH 4, concentration et extraction par AcOEt, on isole le tétrapeptide N-Boc terminal qui est ensuite traité par TFA à 30 % dans CH₂Cl₂ pendant 30min ; après lyophilisation on isole le tétrapeptide dont les caractéristiques RMN, $[\alpha]_D$, Rf, sont identiques à celles données dans la littérature¹²⁻¹⁴.

b) par traitement pendant 24h à température ambiante par NEt₃ à 20 % dans CH₃OH sous N₂, on obtient le N-Boc tétrapeptide sous forme d'ester méthylique (CCM, silice Rf 0,41 éluant CHCl₃-MeOH 9/1).

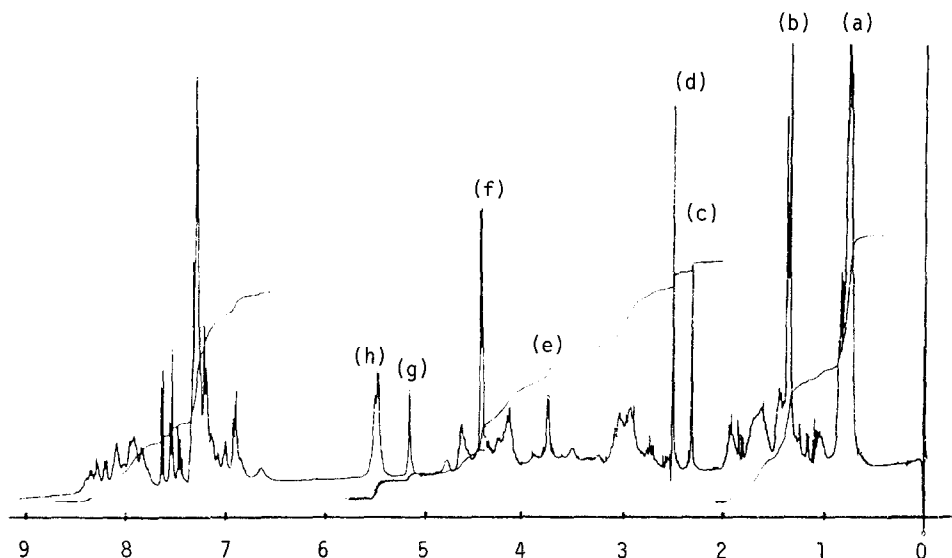
c) par traitement pendant 17h à température ambiante par CF₃CH₂OH saturé par NH₃ on obtient le N-Boc tétrapeptide sous forme d'amide terminal (CCM, silice Rf 0,83 éluant BuOH-AcOH-H₂O 4/1/1).

Dans tous les cas les spectres de RMN ¹H à 360 MHz, les analyses d'acides aminés des peptides bruts et les analyses par HPLC sur colonne Waters Novapak C 18, indiquent pour les produits bruts une pureté supérieure à 95 % sans que nous puissions déceler de racémisation ; le rendement, calculé par rapport à la teneur initiale en Br, est égal ou supérieur à 98 %. Le maillon polyvalent bromacétamido permet donc dans des conditions douces, non racémisantes et de manière pratiquement quantitative, d'obtenir au choix un acide, un ester ou un amide terminal.

Nous avons également préparé sur le même support avec son maillon bromacétamido, le résidu 1-14 de l'angiotensinogène humain de séquence : Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Gly ; le 14^{ème} acide aminé de ce peptide n'ayant pas encore été identifié¹⁵, nous l'avons par commodité remplacé par la glycine. Les fonctions latérales ont été respectivement protégées par les groupes benzyloxyméthyle (Bom) pour l'histidine¹⁶, dichloro-2,6 benzyle pour la tyrosine, tosyle pour l'arginine ; nous avons enfin utilisé l'ester cyclohexylique de l'acide aspartique pour minimiser la transposition α - β aspartique¹⁷. La Boc-Gly est introduite comme précédemment par l'intermédiaire de son sel de césium, les autres Boc-acides aminés par la méthode des anhydrides symétriques : un seul couplage de 30min est en général suffisant sauf pour Boc-Arg(Tos) et Boc-Asp(Cyclohexyl) pour lesquels deux couplages de 60min chacun sont nécessaires pour que le test de Kaiser devienne négatif. Les protections temporaires Boc sont clivées par traitement de la résine pendant 30min par une solution de TFA à 30 % dans CH₂Cl₂ suivi par les lavages habituels.

Afin de démontrer la bonne tenue de notre maillon pendant toute la synthèse, nous avons clivé du support le tétradécapeptide entièrement protégé afin d'examiner sa pureté et d'évaluer le rendement de la synthèse. Ainsi après traitement de la résine par 2 équivalents d'une solution de NaOH 1N dans le mélange iPrOH-H₂O 70/30, acidification jusqu'à pH 4 par HCl 1N et évaporation à sec, on obtient une huile qui cristallise en présence d'éther. La masse du peptide obtenue (95 % de la masse totale) correspond à une conservation de 93 % des chaînes peptidiques sur le support, soit 0,5 % de perte par cycle synthétique : valeur tout à fait conforme aux observations précédentes. Le produit brut, homogène en CCM (silice, Rf 0,73 éluant BuOH-AcOH-H₂O 12/3/5), a pour analyse Arg 1,22 ; His 3,00 ; Phe 1,07 ; Tyr 0,90 ; Leu 1,16 ; Ile 1,90 ; Val 1,96 ; Gly 1,06 ; Pro 1,07 ; Asp 0,87. Son spectre de RMN est reproduit dans la figure suivante.

Une étude est en cours pour évaluer la stabilité de la liaison ester créée par le maillon bromacétamido, dans les conditions d'utilisation d'acides aminés protégés par le groupement baso-labile Fmoc (fluorométhylloxycarbonyle).



Spectre de RMN (^1H) à 360 MHz du tétradécapeptide entièrement protégé (solvant : $\text{DMSO } d_6$) :
 (a) iPr de Val et Leu, (b) Boc et CH_2 de Leu, (c) CH_3 de tosyl, (d) DMSO, (e) CH_2 de Gly, (f) CH_2 de Bom, (g) CH_2 de di-C1-bz, (h) CH_2 de Bom.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - C. Aspisi, B. Calas, J. Daunis, M. Follet, R. Jacquier et J. Parello, Brevet US 4.436.874 (1984) et Brevet Européen 81.408 (1982) ; Chem. Abstr., 1983, 99, 140.404.
 F. Baleux, B. Clavelin, J. Daunis, R. Jacquier, B. Calas et J. Parello, Makromol. Chem., sous presse.
- 2 - R. Arshady, E. Atherton, D. Clive et R. Sheppard, J. Chem Soc. Perkin Trans 1, 1981, p 529
- 3 - R. Sheppard et B. Williams, Int. J. Peptide Protein Res., 1982, 20, 451
- 4 - E. Gross et J. Meienhofer, "The Peptides", Vol 2, Academic Press, New York, 1980, p 66
- 5 - R. Pillai et M. Mutter, Topics Current Chem., 1982, 106, 119
- 6 - R. Epton, P. Goddard, S. Hocart, G. Marr et D. Hudson, Int. J. Biol. Macromol., 1982, 4, 233
- 7 - E. Atherton, A. Dryland, R. Sheppard et J. Wade, "Peptides", Proceedings of the Eighth American Peptide Symposium, V. Hruby et D. Rich, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, 1983, p 45
- 8 - Les différents essais ainsi que la synthèse du tétrapeptide ont été réalisés à l'aide d'un synthétiseur de peptides semi-automatique "Sempa 3" gracieusement prêté par la société Sempa Chimie que nous remercions.
- 9 - J. Stewart et J. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", W. Freeman and co, San Francisco, 1969
- 10 - V. Sarin, S. Kent, J. Tam et R. Merrifield, Analyt. Biochem., 1981, 117, 147
- 11 - A. Mitchell, S. Kent, M. Engelhard et R. Merrifield, J. Org. Chem., 1978, 43, 2845
- 12 - T. Lucas, M. Prystowsky et B. Erickson, Biochem., 1981, 78, 2791
- 13 - Meienhofer, M. Waki, E. Heimer, T. Lambros, R. Makofske et C. Chang, Int. J. Peptide Protein Res., 1979, 13, 35
- 14 - R. Camble, R. Garnier et G. Young, J. Chem Soc.(C), 1969, p 1911
- 15 - D. Tewksbury, R. Dart et J. Travis, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1981, 99, 1311
- 16 - T. Brown, J. Jones et D. Richards, J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, 1982, p 1553
- 17 - J. Tam, T. Wong, M. Riemen, F. Tjoeng et R. Merrifield, Tetrahedron Lett., 1979, p 4033

(Received in France 28 July 1984)