

ETUDE DE LA RACEMISATION INDUITE PAR LA DMAP
DANS LES REACTIONS DE COUPLAGE PEPTIDIQUE

Jean-Paul GAMET, Robert JACQUIER et Jean VERDUCCI*

Equipe de Recherche Associée au CNRS N° 169
Place E. Bataillon, 34060 MONTPELLIER cédex, France.

(Received in France 22 February 1984)

Resumé : Les possibilités d'utilisation de la diméthylamino-4 pyridine (DMAP) comme additif aux carbodiimides en synthèse peptidique sont étudiées et comparées aux résultats obtenus en présence de N-hydroxybenzotriazole (HOBT). L'activation des acides aminés N-acylés en présence de DMAP entraîne une racémisation totale; par contre, pour les acides aminés protégés sous forme d'uréthanes, la DMAP conduit à de meilleurs rendements que l'HOBT et à des taux de racémisation généralement égaux ou légèrement supérieurs à ceux observés en présence d'HOBT.

Abstract : The scope and limitation for the use of 4-dimethylamino pyridine (DMAP) as additive to carbodiimides in peptide synthesis are studied and compared with the results obtained with N-hydroxybenzotriazole (HOBT). The activation of N-acylated aminoacids by the means of DMAP leads to a complete racemization. On the other hand, for the aminoacids protected under their urethans derivatives, DMAP gives better yields than HOBT with racemization extent generally equal to or slightly higher to that observed with HOBT.

Key Words : 4-dimethylaminopyridine, peptide synthesis, racemization.

Pour pallier aux difficultés parfois rencontrées dans les couplages peptidiques réalisés en présence de carbodiimides (rendements insuffisants, formation de N-acylurée, racémisation ...), divers additifs ont été proposés; ce sont pour la plupart des hydroxylamines substituées (HOSu, HOBT ...), c'est-à-dire des "super nucléophiles" au sens défini par Klopman^{1,2}.

Un autre mode d'accélération de la formation de la liaison peptidique pouvait être envisagé, basé sur l'emploi de dialkylamino-4 pyridines et notamment de la DMAP. Ces composés, bien que n'appartenant pas à la classe des "super nucléophiles" cités plus haut, sont des catalyseurs d'acylation extrêmement puissants³⁻⁶.

La DMAP a été utilisée en synthèse peptidique en phase solide pour créer une liaison ester entre la fonction hydroxyle du polymère et la fonction carboxyle du premier acide aminé⁷⁻¹¹ ou encore pour estérifier les acides aminés dans des conditions douces^{12,13}; cependant, une racémisation notable a été observée dans certains cas, celle-ci pouvant être supprimée ou diminuée par l'utilisation de conditions particulières^{12,14}.

Une publication récente de Merrifield et Coll.¹⁵ décrit l'utilisation de la DMAP comme additif à la DCC pour la formation de la liaison peptidique. Ces auteurs mettent en évidence une efficacité supérieure de la DMAP par rapport à celle de l'HOBT dans le cas

des couplages faisant intervenir des acides aminés encombrés tels que la cycloleucine, l'isoleucine ou la valine. Dans ces exemples, la racémisation n'est pas décelable; par contre elle devient importante lors du couplage entre la phénylalanine et l'acide glutamique. D'autre part, dans une étude de l'action des amines tertiaires sur les anhydrides d'acides aminés, Benoiton et Coll.¹⁶ montrent que la DMAP catalyse très fortement la formation d'oxazolone mettant ainsi en évidence le risque élevé de racémisation qu'elle peut induire.

Dans ce travail, nous approfondissons l'étude de l'action de la DMAP dans les couplages peptidiques afin de mieux cerner ses possibilités d'application et ses limites.

Dans un premier temps, nous avons étudié par RMN, méthode physicochimique simple, un modèle présentant un haut risque de racémisation; pour cela nous avons choisi de coupler la benzoyl leucine (le groupement N-benzoyl favorisant la cyclisation en oxazolone) avec le N- ϵ -Z-lysinate de méthyle, réaction conduisant à un dipeptide dont les deux diastéréoisomères présentent en RMN les signaux des méthyles fortement séparés^{17,18}.

Nous avons d'abord suivi l'évolution d'un mélange de benzoyl leucine et de DCC dans CD_2Cl_2 , avec ou sans additif (HOBt ou DMAP). Dans tous les cas, le seul produit observé par RMN est l'oxazolone **3** (schéma I) : en absence d'additif, la réaction est très rapide puisqu'en moins de 3 mn, toute la DCU précipite; par contre, en présence de DMAP (1 équivalent), la réaction est fortement ralentie puisque la formation de DCU dure 70 mn, nécessitant plusieurs filtrations. Ce résultat peut s'expliquer par la basicité de la DMAP ($pK_a = 9,7$) qui ralentit la réaction acidocatalysée d'addition de l'acide sur la DCC. En présence d'HOBt, la DCU précipite en 20 mn, mais aucune estimation sur la vitesse de réaction ne peut être faite en raison de la solubilité de l'urée dans le solvant utilisé (mélange $CD_2Cl_2/DMSO-d_6$).

Abréviations

DMAP : Diméthylamino-4 pyridine

HOSu : N-hydroxysuccinimide

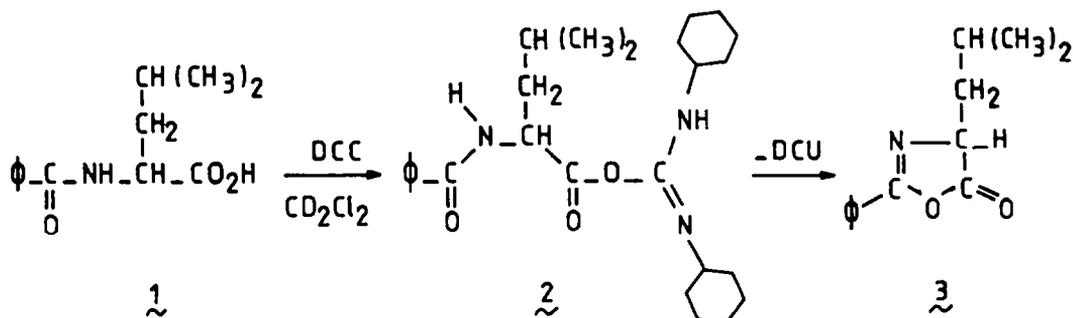
HOBt : N-hydroxybenzotriazole

DCC : dicyclohexylcarbodiimide

DCU : dicyclohexylurée

Z : benzyloxy-carbonyle

- Schema I -



Ces résultats confirment la formation très aisée d'oxazolone à partir de la N-benzoyl leucine, donc le très haut risque de racémisation lors de son couplage avec un autre acide aminé.

Nous avons ensuite suivi par RMN le couplage de la N-benzoyl leucine avec le N-εZ lysinate de méthyle, l'observation des signaux du méthyle nous permettant d'estimer le temps correspondant aux 2/3 d'avancement de la réaction et de déterminer le pourcentage de dipeptides L,L et D,L en fin de couplage (Tableau I).

Tableau I

Couplage N-Bz(L)Leu + N-εZ(L)LysOMe^a

N°	Additif (Nbre d'équiv.)	t _{2/3} mn	dipeptide	
			%D,L	%L,L
1	néant	5-10	45	55
2	HOBt(1) ^b	5-6	0	100
3	DMAP (0,2)	15-20	55	45
4	DMAP (0,5)	15-20	55	45
5	DMAP (1)	15-20	55	45
6	DMAP (0,1) ^c	-	55	45
7	DMAP (0,06) HOBt (1)	-	15	85
8	DMAP (1) ^d	-	35	65
9	DMAP (0,1) ^e	-	45	55

- a) Les réactions sont réalisées par addition de la solution de DCC à une solution contenant les deux dérivés d'acide aminé et éventuellement l'additif; le solvant est le CD₂Cl₂, sauf indication contraire.
 b) Solubilisation de l'HOBt dans un minimum de DMSO₆.
 c) Le mélange de N-Bz-Leu, de DMAP et de DCC est laissé 3 heures en contact avant l'addition de N-εZ-lysineOMe.
 d) Dans cette expérience, le dichlorométhane a été remplacé par le DMF.
 e) Réaction réalisée à -20°C.

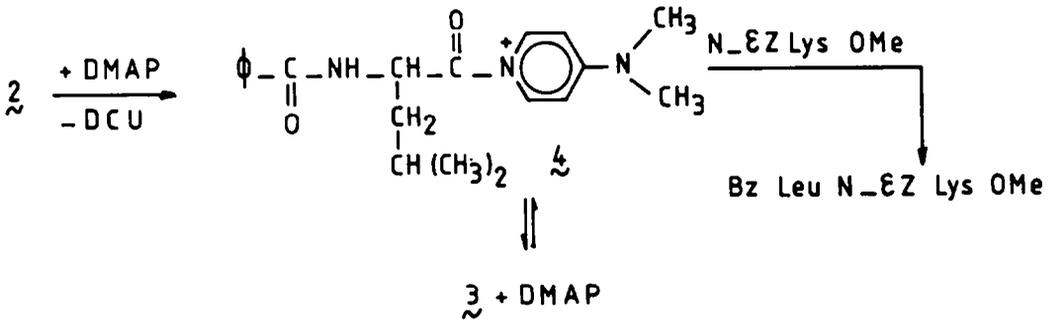
L'examen à t_{2/3} confirme le ralentissement apporté par la DMAP dans la réaction de formation de la O-acylisourée, donc du dipeptide.

Du point de vue racémisation, l'expérience N°1 montre une concurrence importante entre la réaction de cyclisation en oxazolone de la O-acylisourée et l'attaque directe du second acide aminé (45% de composé D,L). Par contre, en présence d'HOBt (expérience N°2), la racémisation est totalement supprimée; la formation de l'ester hydroxybenzotriazolique et son aminolyse sont plus rapides que la cyclisation en oxazolone.

Lors de l'emploi de la DMAP, l'induction asymétrique en faveur du composé D,L (55%) ne peut s'expliquer que par une racémisation rapide de la leucine (probablement sous la forme oxazolone) suivie d'une attaque avec induction asymétrique du second acide aminé. La comparaison des expériences 3-5 où l'on a fait varier la quantité de DMAP montre que le pourcentage de composé D,L obtenu est constant et ne provient pas d'une compétition entre plusieurs mécanismes réactionnels; seuls des changements de solvant ou de température modifient le taux de racémisation (expériences 8 et 9). La grande réactivité de la DMAP est confirmée par l'expérience 7 qui montre que même des quantités catalytiques de ce réactif conduisent à une compétition importante avec l'HOBt.

On peut donc admettre qu'il y a, dans un premier temps, attaque très rapide de la DMAP sur la O-acylisourée conduisant à l'acylpyridinium correspondant 4 (schéma II); cet intermédiaire très réactif se cyclise aisément en oxazolone 3 (cf. Benoiton¹⁶) qui se racémise.

- Schema II -



Afin de déterminer sur quel intermédiaire (3 ou 4) se fait l'attaque du lysinate de méthyle, nous avons synthétisé l'oxazolone 3 suivant la méthode de Mohr¹⁹ et contrôlé que le composé obtenu est totalement racémisé. L'action du dérivé de la lysine sur ce composé conduit à une forte induction asymétrique puisqu'il se forme 67% de dérivé D,L; la même réaction réalisée en présence d'un équivalent de DMAP conduit à 55% de dérivé D,L comme dans la réaction directe. Ces résultats montrent que le N-εZ lysinate de méthyle attaque l'acylpyridinium 4, à condition d'admettre un équilibre entre 3 et 4; celui-ci est mis en évidence par l'étude de l'action du méthanol sur l'oxazolone 3 : en présence de méthanol, 3 reste inchangé en 30 mn, par contre, l'addition d'un équivalent de DMAP conduit à la formation quantitative de l'ester méthylique de la N-benzoyl leucine en 20 mn.

L'ensemble de ces résultats montre donc la forte activité catalytique de la DMAP dans les réactions de couplage peptidique mais confirme aussi le haut risque de racémisation qu'elle peut introduire.

Nous avons cependant étudié quelques couplages faisant intervenir des acides aminés protégés sous forme d'uréthanes, ce type de protection limitant fortement l'aptitude à la cyclisation en oxazolone. Les dipeptides 5-9 (Tableau II) ont été synthétisés par action de la DCC en présence de 0,1 équivalent de DMAP et les résultats comparés à ceux obtenus par action de la DCC et d'un équivalent d'HOBT.

Tableau II

N°	Dipeptide	RMN OMe en Hz	Méthode HOBT* Rdt %D,L	Méthode DMAP** Rdt %D,L
<u>5</u>	Z Phe Leu OMe	734 729	83 <3	90 <3
<u>6</u>	Z Phe Met OMe	738 734	76 <3	79 8
<u>7</u>	Z Phe Val OMe	738 734	85 <3	95 <3
<u>8</u>	Z Val Leu OMe	733,5 730	84 4	98 6
<u>9</u>	Z Val Val OMe	737,5 734	65 4	86 6

*) Solvant DMF, 1 équiv. d'HOBT ; **) Solvant CH_2Cl_2 , 0,1 équiv. de DMAP.

L'examen du tableau II montre que l'utilisation de la DMAP conduit dans tous les cas à de meilleurs rendements que l'HOBt, notamment pour les acides aminés encombrés, en accord avec les travaux de Merrifield et Coll.¹⁵.

L'étude de la racémisation a été réalisée par RMN à 200 MHz qui permet de distinguer les signaux des esters méthyliques des deux diastéréoisomères comme l'ont montré Castro et Coll.²⁰. L'attribution des signaux DCH_3 des isomères L,L et D,L est faite par comparaison aux composés racémiques que nous avons synthétisés; notons que dans la plupart des cas, une meilleure séparation des signaux a pu être obtenue en utilisant l'acétone deutériée comme solvant. Par cette méthode un seuil de détection de 3% de l'un des isomères est facilement obtenu et peut, dans certains cas être abaissé à 1 ou 2%.

Le tableau II montre que la formation des dipeptides 5 et 7, faisant intervenir la phénylalanine, acide aminé aisément racémisable, se fait sans racémisation notable en présence de DMAP; dans le cas de dipeptides encombrés (composés 8 et 9) le pourcentage d'isomère D,L est légèrement supérieur lors de l'utilisation de la DMAP. Seul le composé 6 faisant intervenir la phénylalanine et la méthionine, conduit avec la DMAP à une racémisation nettement plus élevée que celle observée avec l'HOBt.

Nous montrons enfin l'efficacité de la DMAP en l'utilisant dans un type de couplage difficilement réalisable par les méthodes classiques. En effet, l'activation d'un α -déhydroaminoacide par le DCC n'est pas aisée en raison de la désactivation de la fonction acide; il est en général nécessaire d'utiliser le chlorure d'acide correspondant ou de masquer la double liaison par un groupement thiobenzyle²¹ ou encore d'employer l'anhydride de Leuch correspondant²².

L'addition de 0,1 équivalent de DMAP à la DCC nous a permis de coupler la Z-déhydrophénylalanine (Z- Δ Phe) au glycinate de méthyle en 3 heures avec un rendement de 80%.

Conclusion:

Le grand pouvoir catalytique de la DMAP dans les réactions d'acylation en fait un réactif intéressant pour le couplage peptidique. Cependant, l'importance de la racémisation observée dans le cas des acides aminés N-acylés interdit son emploi avec de tels composés; en particulier, le couplage de fragments (pour lesquels l'activation de la fonction acide est comparable à celle d'un acide aminé N-acylé) ne peut être envisagé sauf dans le cas où l'aminoacide mis en jeu n'est pas racémisable (glycine, proline ou acide aminé α -disubstitué).

Le couplage d'acides aminés protégés sous forme d'uréthanes est possible, mais il doit être contrôlé du point de vue racémisation; les conditions expérimentales peuvent être optimisées pour la minimiser: faibles quantités de DMAP (10% en moles au maximum) ajoutées après tous les autres réactifs, abaissement de la température et choix du meilleur solvant. L'emploi de la DMAP sera donc réservé aux couplages difficiles (acides aminés encombrés, déhydroaminoacides) ou faisant intervenir des acides aminés non racémisables.

Partie expérimentale

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur des appareils Varian T 60 et Brüker WP 200. Les acides aminés commerciaux ont été employés directement; la N-benzoyl leucine a été préparée suivant la méthode de Greenstein et Winitz²² et l'isobutyl-4 oxazolone suivant la technique de Mohr¹⁹; leurs caractéristiques sont identiques à celles de la littérature.

Réaction de couplage par un système DCC/additif suivie par RMN

Le N- ϵ Z lysinate de méthyle est libérée de son chlorhydrate par passage sur une résine échangeuse d'ions (amberlite IRA 45 sous forme OH). A une solution dans 0,3 ml de CD_2Cl_2 , contenant 0,25 mmol de N-benzoyl leucine, 0,25 mmol de N- ϵ Z lysinate de méthyle et éventuellement l'additif on ajoute 0,25 mmol de DCC dissous dans 0,3 ml de CD_2Cl_2 . L'évolution du mélange est suivie par RMN à 60 MHz, en observant le signal de l'ester méthylique; lorsque la précipitation de la DCU abaisse trop la résolution, la solution est filtrée puis analysée à nouveau.

Dans le cas où il n'y a pas racémisation (expérience 2), $t_{2/3}$ est obtenu par intégration; dans les autres cas où la racémisation est de l'ordre de 50%, $t_{2/3}$ est déterminé lorsqu'il y a égalité de l'intensité des trois signaux de l'ester méthylique correspondant au produit de départ et aux deux diastéréoisomères du dipeptide. Les résultats sont rassemblés dans le tableau I.

Synthèse des dipeptides 5-9

A 10 mmol de chlorhydrate d'acide aminé dissout dans 20 ml de solvant sont ajoutés 10 mmol de N-méthylmorpholine. Après 5 mn d'agitation à température ambiante, 10 mmol d'acide aminé N-protégé sont ajoutés, puis la quantité désirée d'additif (DMAP ou HOBt); après refroidissement à 0°, on ajoute 11 mmol de DCC dans 10 ml de solvant. Le mélange est agité 15 mn à 0° puis trois heures à température ambiante.

-réactions dans le dichlorométhane ou le THF

Après filtration de la DCU sur verre fritté N°4, le filtrat est lavé par 10 ml d'une solution 0,5N d'acide chlorhydrique, puis 10 ml d'une solution saturée de bicarbonate de sodium. Après décantation, la phase organique est lavée plusieurs fois par 10 ml d'eau, jusqu'à pH neutre, séchée sur sulfate de sodium, puis évaporée sous pression réduite.

-réactions dans le DMF

Après filtration de la DCU, la solution est diluée par 50 ml d'eau et laissée une heure à 0° puis filtrée. Le solide obtenu est repris par 30 ml de dichlorométhane et traité comme ci-dessus.

Z- Δ Phe Gly OMe

A une suspension de 126 mg (1 mmol) de chlorhydrate de glycinate de méthyle dans le dichlorométhane on ajoute 101 mg (1 mmol) de triéthylamine; après une agitation de 10 mn à température ambiante, on ajoute 297 mg (1 mmol) de Z- Δ Phe, 206 mg (1 mmol) de DCC et 12 mg de DMAP (0,1 mmol). Le mélange est agité trois heures à température ambiante puis filtré sur fritté N°4 pour éliminer la DCU. La solution est évaporée sous pression réduite, le résidu repris par l'acétate d'éthyle et lavé à l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis refroidie à -15° pendant trois heures afin d'éliminer les restes de DCU. La solution est ensuite évaporée sous pression réduite et le résidu repris par l'éther. Le dipeptide est obtenu solide, $F=140^\circ$; il est caractérisé par RMN (δ , $CDCl_3$): 3,78 (s, 3H, OCH_3), 4,12 (d, $J=5,5$, 2H, CH_2), 5,18 (s, 2H, $\emptyset CH_2$), 6,62 (s, 1H, NH), 7,00 (t, $J=5,5$, 1H, NH), 7,23 (s, 1H, CH), 7,4 (m, 10H, \emptyset).

Bibliographie

- 1 I. Fleming, "Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions", Wiley and Sons, p.24, 40 et 70 (1976).
- 2 G. Klopman, J. Amer. Chem. Soc., 90, 223 (1968).
- 3 L. Litvinenko et A. Kirichenko, Dokl. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim., 176, 97 (1967).
- 4 W. Steglich et G. Hofle, Angew. Chem. Int. Ed., 8, 981 (1969).
- 5 DMAP update, Reilly Report, distribué par Reilly Chemicals SA, Boite 19, B. 1050, Bruxelles, Belgique.
- 6 G. Hofle, W. Steglich et H. Vorbruggen, Angew. Chem. Int. Ed., 17, 569 (1978).
- 7 J. Meienhofer, M. Waki, E. Heimer, T. Lambros, R. Makofske et C. Chang, Int. J. Pept. Prot. Res., 13, 35 (1979).
- 8 J. Tam, R. Dimarchi et R.B. Merrifield, Int. J. Pept. Prot. Res., 16, 412 (1980).
- 9 S.S. Wang et I.D. Kulesha, J. Org. Chem., 40, 1227 et 1235 (1975).
- 10 J. K. Chang, M. Shimizu et S.S. Wang, J. Org. Chem., 41, 3235 (1976).
- 11 F. Brown, B.J. Williams et R.C. Sheppard, J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1093 (1983).
- 12 B. Neises, T. Andries et W. Steglich, J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1132 (1982).

- 13 M.K. Dhaon, R. Olsen et K. Ramassamy, *J. Org. Chem.*, 47, 1962 (1982).
- 14 E. Atherton, N.L. Benoiton, E. Brown, R.C. Sheppard et B.J. Williams, *J. Chem.Soc. Chem. Comm.*, 336 (1981).
- 15 S.S. Wang, J.P. Tam, B.S.H. Wang et R.B. Merrifield, *Int. J. Pept. prot. Res.*, 18, 459 (1981).
- 16 N.L. Benoiton et F.M.F. Chen, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1225 (1981).
- 17 N.L. Benoiton, K. Kuroda et F. Chen, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 13, 403 (1979).
- 18 N.L. Benoiton, K. Kuroda et F. Chen, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 15, 475 (1980).
- 19 E. Mohr, *J. Prakt. Chem.*, 81, 478 (1910).
- 20 B. Castro, J.R. Dormoy et D. Le Nguyen, *Tetrahedron Letters*, 45, 4419 (1978).
- 21 D.H. Rich, P. Bhatnagar, P. Mathiparanam, J.A. Grant et J.P. Tam, *J. Org. Chem.*, 43, 296 (1978).
- 22 Y. Yonezawa, T. Yamada et C.G. Shin, *Chem. Letters*, 1567 (1982).
- 23 J. Grenstein et M. Winitz, "Chemistry of the Amino Acids", Vol. 1, p.1266 (1961).