

77. Synthèse d'une sonde biotinylée à bras clivable allongé pour l'isolement des récepteurs de l'angiotensine II

de René Seyer*, André Aumelas, Jacky Marie, Jean Claude Bonnafous, Serge Jard et Bertrand Castro

Centre C. N. R. S. I. N. S. E. R. M. de Pharmacologie-Endocrinologie, Rue de la Cardonille,
F-34094 Montpellier Cedex 2

(28.III.89)

Synthesis of a Biotinylated Probe with an Extended Cleavable Arm for Angiotensin II Receptors Purification

We have synthesized a new biotinylated probe for angiotensin II receptors studies: biotinyl-NH(CH₂)₂-SS-(CH₂)₂-CO-Gly-εAhx-[Ala¹, Phe(4N₃)⁸]angiotensin II (5). This molecule can be photoactivated through an aryl-azido group. ¹H-NMR studies suggest that it adopts an extended conformation which should allow a simultaneous recognition of both streptavidin and hormone receptor. It has a good affinity for receptors (*K_d* = 1 nM) and hence is a promising tool in their detection (autoradiography, gold-, ferritin-, enzyme-, or fluorescent streptavidin derivatives) and separation (cell sorting, affinity chromatography). It can be moniodinated (→6) at its tyrosine residue without a significant loss of affinity. Its extended cleavable arm allows an easy recovery of the 'probe-receptor' complex from streptavidin. An HPLC monitoring of the synthesis is described, particularly of the segment coupling 1 + 2 in presence of (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP). This method can be used as well for synthesis of the D-Phe⁸ derivative that has antagonist properties.

Introduction. – L'angiotensine II (= AII; Asp¹-Arg-Val-Tyr⁴-Ile-His-Pro-Phe⁸) est une hormone hydrophile qui agit sur de nombreuses cellules cibles (foie, rein, glandes surrénales, fibres musculaires lisses, etc.) par l'intermédiaire de glycoprotéines membranaires non isolées jusqu'à présent, ses 'récepteurs'. La rareté de ces composants dans la membrane plasmique (1 à 2 pmol/mg de protéines membranaires) ne permet guère d'envisager leur purification sans une étape de chromatographie d'affinité. Les très faibles quantités de substances mises en jeu nécessitent un radiomarquage de haute activité spécifique pour leur détection. Les conditions de solubilisation des protéines membranaires dont nous disposons jusqu'à présent (détergents non ioniques: C₁₂E₈, Triton X-100) ne préservent pas la capacité de liaison du récepteur pour l'hormone et ses analogues. Ceci interdit le recours à une technique de chromatographie d'affinité directe à l'aide d'hormone immobilisée. Nous avons proposé le prémarquage du récepteur avant sa solubilisation avec un dérivé bifonctionnel regroupant le site de liaison de l'hormone et un marqueur d'affinité en vue de l'étape de purification [1].

Les nombreuses relations de structure-activité établies pour l'AII [2] montrent que son site de reconnaissance est essentiellement C-terminal. Le résidu N-terminal Asp¹ peut être remplacé sans perte sensible d'affinité. En particulier les analogues [Sar¹]AII [3] et [Ala¹]AII [3] ont été proposés. A partir des travaux qui ont été décrits sur de nombreuses hormones peptidiques (insuline [4] [5], corticotropine [6], substance P [7]), nous avons choisi de coupler la biotine sur la partie N-terminale d'un dérivé de l'AII, afin de permettre la chromatographie du complexe 'sonde-récepteur' sur streptavidine immobili-

sée. Pour autoriser l'interaction simultanée du site de reconnaissance avec le récepteur et de la biotine avec l'avidine, nous avons intercalé un bras entre le résidu de biotine et l'hormone. Le principe d'un bras clivable à pont disulfure, déjà utilisé pour élaborer des conjugués de l' α -MSH [8], et associé à la biotine pour faciliter la récupération des complexes protéines-DNA [9] à partir d'une colonne d'avidine immobilisée a été retenu. En vue de l'utilisation de la sonde ainsi constituée sur des cellules entières dans des applications de marquage de récepteurs et de tri cellulaire, nous avons considérablement allongé le bras espaceur par l'incorporation d'un résidu ε -aminohexanoyl (ε Ahx). Un groupe azido a été introduit en *para* du noyau aromatique du résidu Phe⁸ de l'AII pour lier covalamment avec un fort rendement [10] la sonde au récepteur et éviter toute dissociation prématurée durant les étapes de purification. Un radiomarquage par monoiodation à l'¹²⁵I, qui intervient au niveau du résidu Tyr⁴, permet la détection des complexes 'sonde récepteur' par comptage γ et autoradiographie sans perte sensible d'affinité [1]. L'introduction d'un résidu de glycine dans le bras espaceur en augmente l'hydrophilie et offre une possibilité de double marquage [11] en vue d'un contrôle d'intégrité de la partie sonde dans les expériences de protéolyse du récepteur.

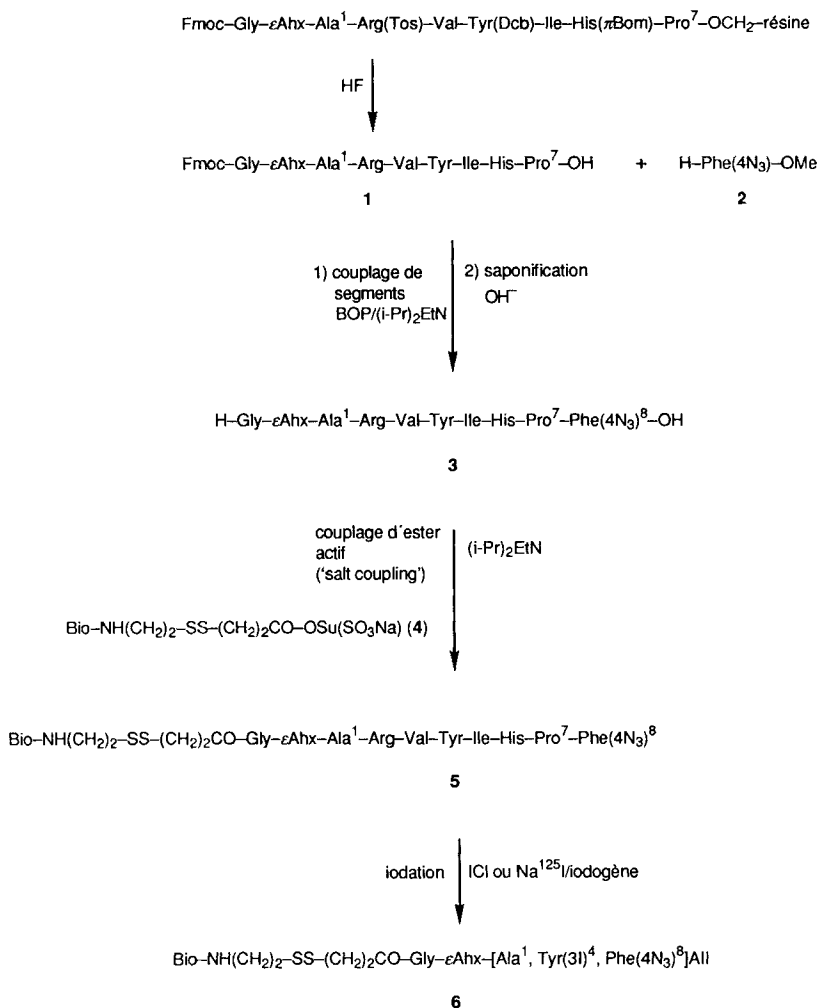
Nous proposons donc une nouvelle sonde multifonctionnelle biotinylée, Bio-NH(CH₂)₂-SS-(CH₂)₂-CO-Gly- ε Ahx-Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe(4N₃) (**5**), en vue de la détection et de l'isolement des récepteurs de l'AII, dans laquelle Bio représente le résidu biotiny, par analogie avec la notation utilisée pour les résidus aminoacyls.

La stratégie de synthèse que nous avons mise au point permet simultanément l'accès au dérivé en D-Phe⁸ qui a généralement des propriétés d'antagoniste de l'hormone [12] et qui est susceptible de lier une forme de récepteur d'une masse molaire légèrement différente de celle que lie l'agoniste correspondant, en L-Phe⁸ [12]. Elle se prête bien, sans transposition, à la manipulation de petites quantités de produits, indispensable dès l'introduction des radioéléments.

Synthèse (v. *schéma 1*). – Nous avons choisi d'incorporer en dernier lieu la biotine et son bras clivable en raison de leur coût, de leur fragilité et de leur incompatibilité avec la procédure classique d'introduction du groupe azido [13] [14]. Cette incorporation finale pouvait également apporter une solution à l'oxydation de l'atome d'S du résidu de biotine lors du marquage de la molécule par le couple Na¹²⁵I/oxydant [15]. L'introduction séparée du groupe azido sur le résidu Phe est favorisée par la présence d'un résidu adjacent Pro permettant un couplage de segments exempt de racémisation. Elle évite toute réaction parasite du groupe diazo introduit transitoirement avec les résidus Tyr et His de l'AII.

Le segment **2** est obtenu à partir de Phe(NO₂)-OMe par hydrogénation, diazotation et substitution par N₃⁻ [14] et le segment **1** par synthèse en phase solide sur résine chlorométhylée avec l'hexafluorophosphate de (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)-phosphonium (BOP) comme agent de couplage [16] et le groupe *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) comme protection temporaire, excepté pour le résidu Gly qui a été incorporé sous la forme N α protégée par le groupe fluorénylméthyloxycarbonyl (Fmoc), choisi pour sa résistance à l'acidolyse par HF. Les autres protections choisies pour les chaînes latérales des amino-acides sont les groupes π -benzyloxyméthyl (π Bom) pour His [17], dichlorobenzyl (Dcb) pour Tyr et tosyl (Tos) pour Arg, toutes éliminées par HF. La suppression de l'étape 'de neutralisation' classique dans le processus de synthèse en phase solide, remplacée par une addition progressive de base (*N,N*-diisopropyléthylamine =

Schéma 1



(i-Pr)₂EtN) à l'étape de couplage a permis d'éviter l'élimination de la chaîne peptidique de la résine par la formation particulièrement favorisée de la dicétopipérazine correspondant au dipeptide His-Pro [18].

En raison de la stratégie de protection minimale adoptée pour les chaînes latérales des résidus Arg, His et Tyr, la quantité d'agent activant ajouté lors de la synthèse de **3** doit être limitée de façon à utiliser complètement le segment **1** sans toucher à ces fonctions. A cet effet, un monitoring HPLC a été mis au point. Des aliquotes de BOP sont ajoutés progressivement jusqu'à la quasi totale disparition de **1** (*fig. 1b*), sans apparition de produits parasites. De cette façon, le couplage peut être maîtrisé même à partir du synthon **1** brut, tel qu'issu du clivage par HF, sans purification préalable. La réaction de couplage avec le réactif BOP qui s'écrit

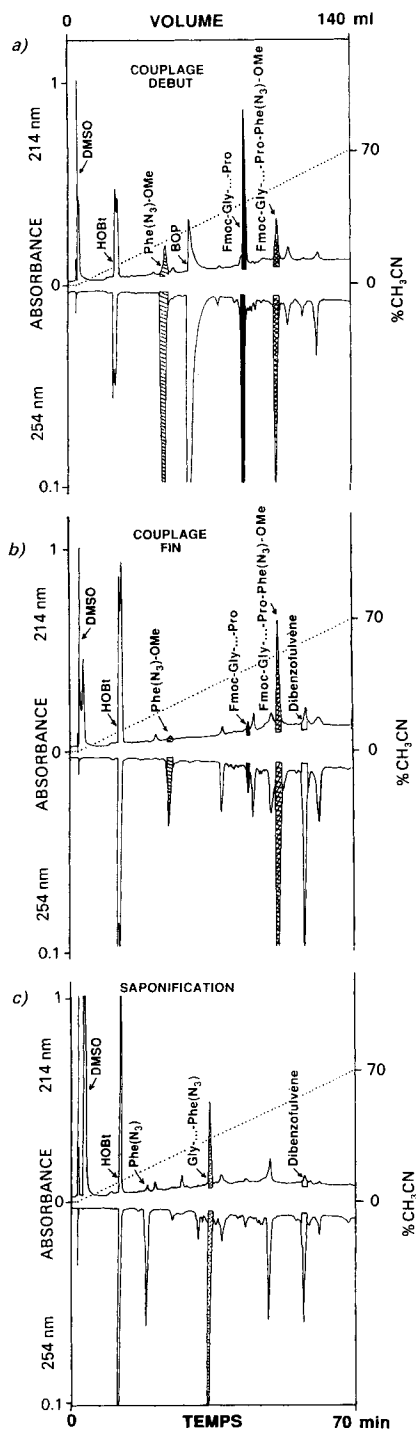
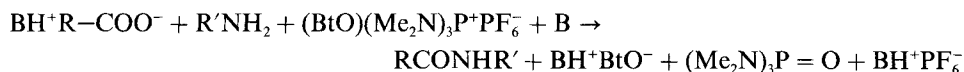


Fig. 1. Monitoring HPLC de la synthèse du segment azidé 3. Des aliquotes de l'ordre de $\frac{1}{4}$ de μl de mélange réactionnel sont injectés sur la colonne C_{18} (Whatman ODS 3, $5\ \mu\text{m}$, $4 \times 250\ \text{mm}$) et élués par un gradient de 0–70% de CH_3CN (v/v) à raison de 1% et 2 ml/min, à un pH de 2,2 (0,1% de CF_3COOH). Le profil du gradient est représenté tel qu'il apparaît au niveau du détecteur (correction faite des volumes morts v_0) par la ligne pointillée. Les absorptions à 214 nm (1 unité d'absorbance pleine échelle, vers le haut) et 254 nm (0,1 unité d'absorbance pleine échelle, vers le bas) sont portées tête-bêche.

a) *Début du couplage*: Un pic de produit lipophile apparaît (quadrillé). Il est attribué au produit de couplage 7, N-(Fmoc) et C-(OMe) protégé. Le pic large vers 28% de CH_3CN est attribué à un excès passager de BOP. Il disparaît au cours du couplage. b) *Fin de couplage*: Le synthon nonapeptidique 1 (en noir) a presque totalement disparu. Le segment azidé 2 (hachuré), ajouté en excès, subsiste. Le pic de produit 7 (quadrillé) est prédominant. Il apparaît un produit très lipophile, identifié au dibenzofulvène, ce qui traduit un clivage prématuré du groupe Fmoc durant un couplage prolongé. c) *La saponification* est totale grâce à l'action brève d'un gros excès de soude sur le mélange brut de couplage. La déprotection se traduit par une baisse de pourcentage de coélution des produits. L'azido-angiotensine 3 (pointillés) est facilement identifiée dans le mélange connaissant l'ordre d'élution et les propriétés d'absorption des produits.



libère de l'hydroxybenzotriazole (HOBt) [19]. L'(i-Pr)₂EtN est généralement retenue comme base encombrée B. Seuls les produits absorbant la lumière UV sont repérés sur le chromatogramme HPLC. Le rapport d'absorption entre 214 et 254 nm facilite l'identification des produits. Les dérivés azido et Fmoc en particulier se distinguent par une plus forte absorption relative à 254 nm (*fig. 1*). Il faut remarquer un début d'élimination du groupe Fmoc en fin de couplage, peut-être par action de l'(i-Pr)₂EtN (*fig. 1b*). L'étude HPLC montre que la déprotection du segment ($\rightarrow 3$) par un gros excès de soude est totale et pratiquement instantanée (*fig. 1c*). Une réacidification rapide supprime tout risque d'altération par séjour en milieu alcalin. Nous avons vérifié qu'un produit ainsi obtenu est indiscernable, par étude RMN, par HPLC et par ses propriétés biologiques, du produit obtenu par couplage direct du segment **1**, brièvement préactivé, sur un excès de H-Phe(4N₃)-OH qui ne nécessite donc pas de saponification ultérieure. Le produit déprotégé **3** est facilement isolé malgré l'abondance des sels formés par une étape d'HPLC semi-prép. (*fig. 2a*) assortie d'un fractionnement et d'un contrôle par HPLC anal. (*fig. 2b*). L'épuisement des espèces activées résiduelles par un excès de résine aminée (de type benzhydrylamine) [20] permet de pratiquer la déprotection directement sur le mélange de couplage, sans isoler le produit protégé et sans provoquer d'acylations parasites au niveau des chaînes latérales des résidus Tyr et Arg.

L'utilisation d'un excès modéré (2 équiv.) de l'ester actif de sulfosuccinimide **4** [21] permet une incorporation du pseudodécapeptide **3** totale et rapide, contrôlée par HPLC. La sonde biotinylée non iodée **5** est facilement isolée par une seule étape de RP-HPLC à

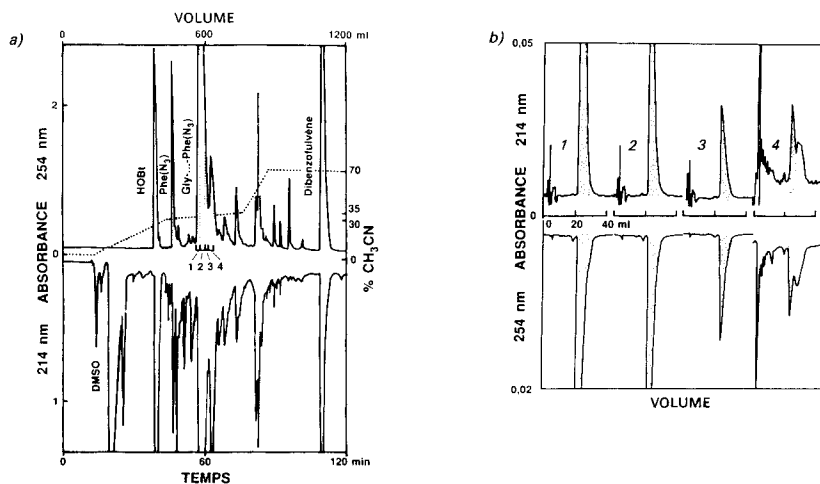


Fig. 2. Purification par RP-HPLC du segment azidé **3**. a) La partie hydrosoluble du mélange réactionnel est injectée sur une colonne *Whatman ODS 3* (10 μm) de $2,2 \times 50$ cm. Les différents produits sont élués à 10 ml/min par un gradient de CH₃CN (figuré en pointillé) dont la pente est limitée à 0,2%/min pour l'élution du produit attendu **3**. b) Les fractions les plus pures (**1** et **2**) sont sélectionnées sur la base de leur HPLC anal. isocratique sur colonne, avec 27% de CH₃CN (0,1% de TFA) (v/v), à 2 ml/min.

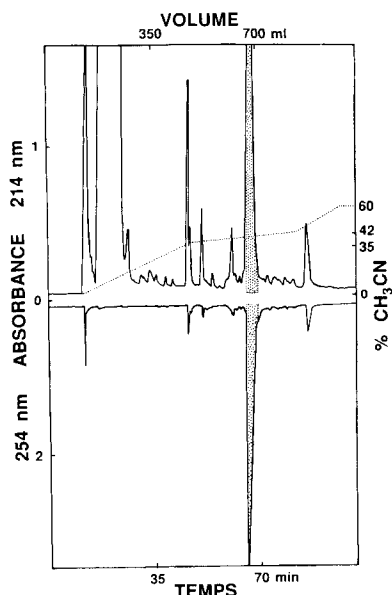
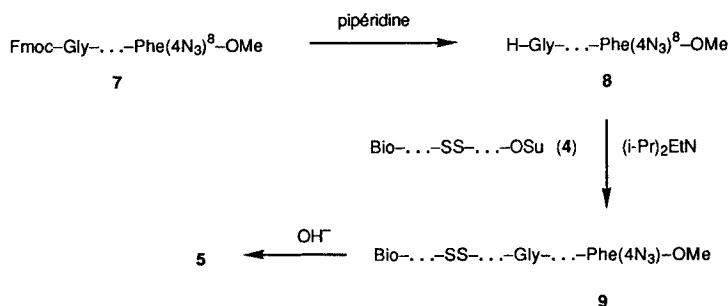


Fig. 3. Purification du dérivé biotinylé **5**. Le mélange de couplage de l'ester actif **4** (dans le DMSO) est réacidifié (CF_3COOH), injecté sur la colonne prép. (v. fig. 2) et élué à 10 ml/min par un gradient de CH_3CN , limité à 0,2%/min pour l'élution du produit. Le pic pointillé, homogène en HPLC anal., est collecté.

Schéma 2



partir du mélange du couplage brut (fig. 3). L'iodation **5**→**6** selon [1] [15] sera rapportée ailleurs.

Une autre voie de synthèse a été tentée en partant du segment **7** (v. schéma 2). Après déprotection partielle (→**8**), le couplage (→**9**) et la saponification ont donné des résultats peu reproductibles aboutissant à des mélanges du produit attendu **5** et d'autres dérivés, indiscernables par analyse d'acides-amino. Nous interprétons ces résultats par la fragilité du produit final **5** en milieu alcalin, vraisemblablement par clivage du pont disulfure [8]. Effectivement le produit de clivage a été identifié par RMN dans certains couplages.

Résultats. – La structure chimique de la molécule synthétisée, en solution dans le (D_6)DMSO, a été confirmée par les spectres de RMN- ^1H à 360 MHz (tab. 1). Tous les résidus aminoacyles, aminohexanoyl, biotinyl ainsi que le motif porteur du pont disulfure

Tab. 1. Données de RMN-¹H (360 MHz, (D₆)DMSO) de Bio-NH(CH₂)₂-SS-(CH₂)₂CO-Gly-εAhx-Ala¹-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe(4N₃)⁸ (5)^{a)}

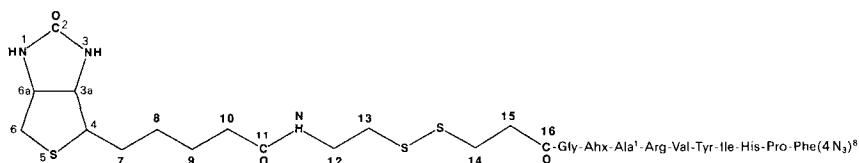
Résidus	Coefficient de temp. [ppb/K]	H-N(2)		H-C(2)	H-C(3), H'-C(3)			Autres		
		δ	³ J		δ	³ J	² J		δ	³ J
Ala ¹	-3,9	7,98 (d)	7,0	4,25	1,17 (d)	7,1				
Arg ²	-3,4	8,05 (d)	8,1	4,25	1,65			2 H-C(5)	3,08	
					1,49			2 H-C(4)	1,48	
H-N(5)	-2,1	7,48 (t)	5,5							
Val ³	-2,6	7,50 (d)	9,0	4,17	1,92			3 H-C(4)	0,76 (d)	6,8
								3 H'-C(4)	0,74 (d)	6,8
Tyr ⁴	-3,4	7,99 (d)	8,4	4,50	2,72	—		H _o	7,00 (d)	8,4
					2,64	9,4	14,2	H _m	6,61 (d)	8,5
Ile ⁵	-5,5	7,79 (d)	8,7	4,14	1,65			H-C(4)	1,36	
								H'-C(4)	1,05	
								3 H'-C(4)	0,76 (d)	6,8
								3 H-C(5)	0,78 (t)	7,0
His ⁶	-4,9 ^{b)}	8,29 (d)	7,7	4,76	3,04	—		H-C(2) (arom.)	8,87 (s)	
					2,92	—		H-C(4) (arom.)	7,33 (s)	
Pro ⁷				4,37	2,02			2 H-C(4)	1,82	
					1,78			H-C(5)	3,64	
								H'-C(5)	3,46	
Phe ⁸	-3,9 ^{b)}	8,29 (d)	7,7	4,42	3,02			H _o	7,31 (d)	8,6
(4N ₃)					2,91			H _m	7,00 (d)	8,4
Gly	-4,3	8,16 (t)	5,7	3,66						

Résidus ^{c)}	Coeffi- cient ppb/K	H-N		Autres ^{c)}						
		δ	³ J		δ	³ J		δ	³ J	² J
εAhx	-4,2	7,76 (t)	5,8	2 H-C(6)	3,03	2 H-C(2)	1,38	2 H-C(3), 2 H-C(4), 2 H-C(5)	1,6-1,2	
bras SS	-4,3	7,95 (t)	5,7	2 H-C(12)	3,31	2 H-C(13)	2,77 (t)	7,0		
				2 H-C(15)	2,55	7,3	2 H-C(14)	2,90	7,3	
Bio H-N(1)		6,34 (s)		H-C(3a)	4,13	H-C(6)	2,82	5,2	2 H-C(7)	1,61 et 1,45
									12,6	2 H-C(8), 2 H-C(9)
Bio H-N(3)		6,39 (s)		H-C(4)	3,10	H'-C(6)	2,58	0	2 H-C(10)	1,2 à 1,8
				H-C(6a)	4,30					2,07

a) Le signal résiduel du DMSO est pris comme référence à 2,5 ppm. Déplacements chimiques δ ppm, coefficients de temp. en 10³ ppm/K (ppb/K) et constantes de couplage J en Hz.

b) Ces deux valeurs peuvent être interverties.

c) Numérotation du bras biotinylé (arbitraire):



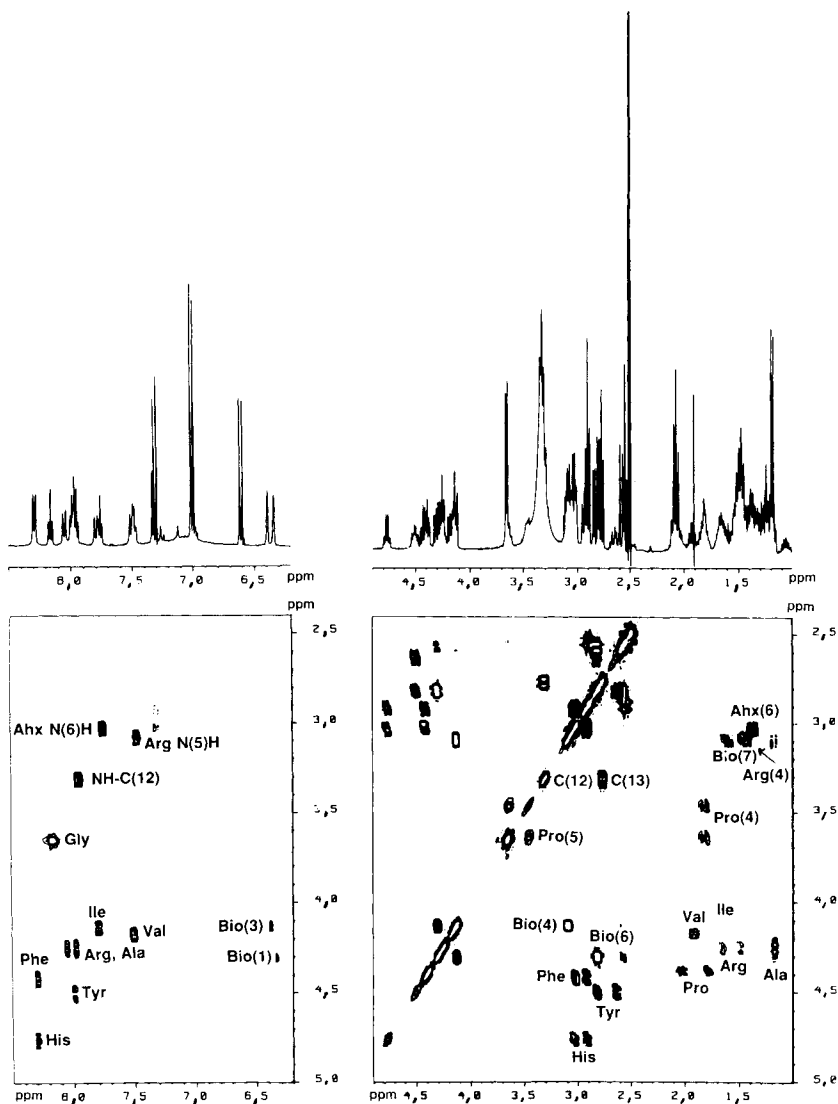


Fig. 4. Spectre COSY RMN- ^1H à 360 MHz de la sonde biotinylée **5** enregistré dans le (D_6) DMSO à 305 K. Les zones plus particulièrement intéressantes de 6,2 à 8,5 ppm (corrélations $\text{H}-\text{N}(2)$, $\text{H}-\text{C}(2)$) et 1 à 4,9 ppm (corrélations $\text{H}-\text{C}(2)$, $\text{H}-\text{C}(3)$) sont représentées. (Bio(1), Bio (3), Bio (4) etc. désignent les protons $\text{H}-\text{N}(1)$, $\text{H}-\text{N}(3)$, $\text{H}-\text{C}(4)$ etc. du résidu biotinyl.

ont pu être attribués en utilisant les techniques COSY (fig. 4) et NOESY (détermination des effets Overhauser (NOE)).

Les signaux de RMN- ^1H de $\text{H}-\text{N}(2)$, $\text{H}-\text{C}(2)$ et $\text{H}-\text{C}(3)$ constituent des systèmes de spins caractéristiques des différents résidus. Largement décrits [22], ces systèmes sont identifiés à l'aide d'une expérience de type COSY [23] [24]. La fig. 4 montre les deux régions les plus significatives de la carte COSY obtenue, l'une dans laquelle apparaissent les pics de corrélation entre $\text{H}-\text{N}(2)$ et $\text{H}-\text{C}(2)$ et l'autre dans laquelle apparaissent le ou les pics de

corrélation entre $H-C(2)$ et $H-C(3)$. Ainsi peut-on rapidement vérifier la présence de tous les résidus attendus sur la carte 2D (fig. 4). De cette façon, nous avons pu déterminer les déplacements chimiques du signal des protons amides, $H-C(2)$ et $H-C(3)$. Les ambiguïtés d'attribution des trois systèmes $H-C(3)$ et $H'-C(3)$ correspondant aux résidus aromatiques (His, Tyr et Phe) ont nécessité une étude des effets *Overhauser* inter-résidus, particulièrement entre le $H-C(2)$ du résidu i et le $H-N(2)$ du résidu $i + 1$ [25–27]. Ceux-ci sont obtenus dans une expérience de type NOESY [28].

Le spectre RMN- 1H permet de caractériser Gly (signal à 3,66 ppm couplé avec le t à 8,16 ppm) et de confirmer la substitution en *para*, par le groupement azido, de Phe⁸ (d' H_{ortho} à 7,31 et $H_{méta}$ à 7,00 ppm).

Les signaux des protons du cycle de la biotine sont rapidement identifiés dans la carte COSY. Ils constituent deux systèmes de spins caractéristiques. D'une part $H-C(3a)$ (4,13 ppm) est couplé avec $H-N(3)$ (6,39 ppm) et $H-C(4)$ (3,10 ppm), et d'autre part $H-C(6a)$ (4,30 ppm) est couplé avec $H-N(1)$ (6,39 ppm), $H-C(6)$ et $H'-C(6)$ (2,82 et 2,58 ppm). Les deux protons de jonction $H-C(3a)$ et $H-C(6a)$ sont couplés entre eux. Les différents groupes méthylènes du bras clivable $NH-C H_2(12)-C H_2(13)-SS-C H_2(14)-C H_2(15)-CO$ sont également identifiés à partir du COSY. Le signal du $CH_2(12)$, voisin d'un atome d'N, devrait sortir à champ plus faible que celui du $CH_2(13)$, voisin d'un atome d'S. Ceci est bien vérifié puisque le proton amide (t à 7,95 ppm) est couplé aux 2 $H-C(12)$ (3,31 ppm), eux-mêmes couplés aux 2 $H-C(13)$ (2,77 ppm). Compte tenu de l'électronégativité du S et du carbonyle, les signaux des $CH_2(14)$ et $CH_2(15)$ sont attendus entre 3 et 2 ppm. Après attribution de tous les protons dans cette région, deux signaux à 2,90 et 2,55 ppm, uniquement couplés entre eux, ont été attribués respectivement aux 2 $H-C(14)$ et 2 $H-C(15)$.

Excepté le t correspondant à $H-N(5)$ de Arg (7,48 ppm), l'observation de trois protons amides sous forme de t (7,95 ppm (bras clivable), 8,16 ppm (Gly), 7,76 ppm (ϵ Ahx)) permet de conclure que les différents éléments constitutifs de la sonde sont bien liés entre eux par une liaison peptidique. Le proton amide de Ala, sous forme de d , indique bien sa liaison au résidu ϵ Ahx.

Afin d'accéder à la conformation de la molécule **5**, nous avons mesuré les coefficients de température des protons amides (tab. 1). Les grandes valeurs obtenues ($-2,6$ à $-4,9 \cdot 10^{-3}$ ppm/K) suggèrent que tous ces protons sont accessibles au solvant et ne sont pas impliqués dans des liaisons H. De plus, les constantes de couplage $^3J(H-N(2), H-C(2))$ (7,0–9,0 Hz) traduisent des angles dièdres en accord avec une structure étendue de la partie peptidique de la molécule. Ceci se trouve vérifié par les NOE $H-C(2), H-N(2)$ inter-résidus qui sont plus intenses que les NOE intra-résidus. Aucun NOE entre l'hétérocycle de la biotine et la partie peptidique, susceptible de traduire une proximité des deux extrémités de la molécule n'a pu être mis en évidence.

Propriétés biologiques. – Les propriétés biologiques de la sonde biotinylée seront rapportées en détail ailleurs. Brièvement, les études de liaison pratiquées sur des membranes de foie de rat [29] donnent des résultats très voisins de ceux obtenus avec l'angiotensine II elle-même, en particulier une constante de dissociation $K_d = 1$ nM et une capacité de liaison maximale $B_{max} = 1,3$ pmol/mg de protéines. La sonde permet par photoactivation le marquage covalent d'une protéine glycosylée qui a toutes les caractéristiques du récepteur hépatique de l'angiotensine II (masse molaire de 65 000 daltons) [10].

Partie expérimentale

Généralités. Les acides aminés protégés sont de la forme L sauf précision contraire et sont fournis par Bachem, Novabiochem et Fluka. L'ester actif de sulfosuccinimide **4** est fourni par Pierce (NHS-SS-Biotin). Le réactif BOP a été offert par Sempa Chimie. [Sar¹, [Phe³]]AI est un don du Dr. E. Escher. La résine chlorométhylée provient de chez Pierce. Le CH_2Cl_2 est fraîchement distillé sur P_2O_5 et le MeOH sur son dérivé organomagnésien. (i-Pr)₂EtN et DMF sont distillées d'abord sur CaH_2 , puis sur ninhydrine. DMSO, CF_3COOH et éthanedithiol sont de Fluka. La synthèse en phase solide est pratiquée dans la cellule en verre Pyrex d'un montage manuel. Le HF est fourni par Matheson (Interchim). CH_3CN est la qualité HPLC RS de Carlo Erba. Un papier humidifié est utilisé pour l'appréciation du pH en milieu organique.

HPLC. L'équipement (*Waters*) est composé de deux pompes (6000 A), un formeur de gradient haute pression (modèle 720), deux photomètres (modèle 440 pour 254 ou 280 nm et modèle 441 pour 214 nm), un enregistreur deux voies (*Houston*), une précolonne, un injecteur automatique (*WISP*) pour les études anal. et un injecteur manuel (*Rhéodyne*, boucle 2 ml) pour les injections prép. Les fractions sont collectées automatiquement à l'aide d'un collecteur *Frac 100* (*Pharmacia*) en mode détection de pic, à partir d'un seuil sélectionné de densité optique. Sauf précision contraire, les injections anal. sont faites sur une colonne *Lichrosorb C₁₈* (5 µm; 4 × 250 mm; *Merck*), avec un débit de 2 ml/min. Les injections prép. sont faites sur une colonne *C₁₈ Partisil ODS 3 Magnum 20* (*Whatman*) à un débit de 10 ml/min. Le système d'éluant entièrement volatil H₂O/CH₃CN acidifié par 0,1 % de CF₃COOH (*v/v*) a toujours été suffisant pour ces séparations. Seuls des gradients linéaires sont utilisés. Les % de CH₃CN mentionnés sur les figures et dans le texte sont toujours ceux (*v/v*) qui coéluent avec le produit, corrections faites des volumes morts du système HPLC (*v₀*). Les rapports d'absorption donnés le sont seulement à titre indicatif, tels qu'évalués à l'aide des photomètres. Les dérivés diazo et azido sont maintenus à l'abri de la lumière.

Analyse d'acides aminés. Les hydrolyses des pseudopeptides sont faites à l'abri de la lumière dans des ampoules scellées sous vide avec HCl 6M additionné de 1 % de phénol, pendant 21 h à 110°. Les séparations sont réalisées après réaction avec le phthalaldéhyde en utilisant la détection par fluorescence (appareil *Waters*). Pro, *ε*Ahx, Phe(4N₃) et Bio ne sont pas dosés par cette technique.

Spectroscopie RMN-¹H. Tous les spectres ont été enregistrés à 305 K sur un spectromètre *Bruker WM 360 WB* (360 MHz) équipé d'un système *Aspect 3000* avec des soln. de 8 mg de produit dans 0,5 ml de (D₆)DMSO (99,8 % D) dont le pic résiduel sert de référence à 2,5 ppm. Sans autre indication, les paramètres d'acquisition sont les suivants: largeur spectrale = 4000 Hz, longueur d'impulsion = 4 µs ($\pi/2 = 7,5$ µs) et temps d'acquisition = 2,04 s pour 16 K points. Nous n'avons pas utilisé de délai de relaxation. Le traitement a été fait sur 32 K (résolution digitale = 0,24 Hz). Les corrélations entre protons couplés de façon scalaire ont été établies à l'aide d'une expérience à deux dimensions utilisant la séquence *D₁-90°-D₂-45°-acquisition* (COSY) [23] [24]. Pour l'acquisition, 512 délais incrémentables (*D₂*) ont été utilisés. Le traitement a été fait en utilisant 2 K en *F₂* et 1 K en *F₁*. Avant la transformée de *Fourier*, les FID sont multipliées par une fenêtre de type 'sine-bell' non décalée dans les deux domaines. Les corrélations entre protons couplés de façon dipolaire ont été obtenues en utilisant la séquence *D₁-90°-D₀-90°-τ_m-90°-acquisition* [28] en mode phasé avec un temps de mélange *τ_m* de 300 ms et 256 délais incrémentables. Avant la transformée de *Fourier*, les FID sont traitées par une 'sine-bell' décalée de $\pi/8$ en *F₂* et de $\pi/4$ en *F₁*.

Synthèse en phase solide avec BOP. CF₃COOH · Arg(Tos)-Val-Tyr(Dcb)-Ile-His(πBom)-Pro-OCH₂-polys-tyrène. Une résine chlorométhylée (réticulée à 1 %; 10g; 1 à 2 mmol de Cl par g) est acylée avec Boc-Pro-OCs [30]. Le degré de substitution, déterminé par la méthode à l'acide picrique [31], est de 0,45 mmol/g. L'incorporation de chaque résidu aminoacyl, à partir de 5 g de Boc-Pro-résine (2,25 mmol), implique les étapes suivantes: 1) Prélavage avec CF₃COOH à 50 % dans CH₂Cl₂ pendant 2 min; 2) déprotection avec CF₃COOH à 50 % dans CH₂Cl₂ durant 30 min (1 % d'éthanedithiol ajouté dès l'incorporation de la tyrosine); 3) lavage avec CH₂Cl₂ durant 2 min (3 fois); 4) neutralisation avec 1 équiv. d'(i-Pr)₂EtN (290 mg) dilué dans du CH₂Cl₂ suivie immédiatement par: 5) addition de 2 équiv. de Boc-acide aminé, sous agitation constante, par exemple, pour le premier couplage: Boc-His(πBom) (5 mmol, 1,86 g) dans le mélange DMF/CH₂Cl₂; 6) addition de 2,2 équiv. de BOP (5 mmol, 2,2 g) et agitation; 7) addition graduelle de 3,2 équiv. d'(i-Pr)₂EtN (7,2 mmol, 0,93 g) en 30 min environ, sous agitation constante (de cette façon, la perte de peptide par formation de dicétopipérazine durant le couplage est particulièrement réduite [18]); 8) addition d'(i-Pr)₂EtN pour maintenir le pH aux environs de 7 à 8 et test qualitatif à la ninhydrine [32] après 2 h, alors que le pH reste stable; 9) lavages avec CH₂Cl₂ (2 fois) et test supplémentaire à la ninhydrine. Ces opérations sont répétées jusqu'à l'incorporation de Boc-Arg(Tos) et suivies des opérations 1–3. La peptidylrésine, sous forme de trifluoroacétate, est séchée sous vide en présence de KOH et pesée. A cette étape, le gain en poids est de 3 g, c'est-à-dire la quantité prévisible de peptide protégé correspondant à une substitution finale de 0,3 mmol/g de peptidylrésine.

Tab. 2. Rapports d'absorption des composants du mélange de couplage de **1** et **2** et du mélange saponifié

Produit	HOBt	Phe(N ₃)	Phe(N ₃)—OMe (2)	BOP	Fmoc-Gly-... ...-Pro (1)	Fmoc-Gly-... ...-Phe(N ₃)O—Me (7)	Gly-... ...-Phe(N ₃) (3)	Dibenzo- fulvène
% CH ₃ CN 10	16	22	28	41	50	32	56	
$\epsilon_{214}/\epsilon_{254}$	8	0,5	0,5	2	3	2	2,3	0,8

Modulation-N-terminale: *Fmoc-Gly-εAhx-Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro* · 2 CF₃COOH (1 · 2 CF₃COOH). Un aliquote de peptidylrésine (1 g, ca. 0,3 mmol) est acylé selon le même processus, successivement avec Boc-Ala, Boc-εAhx et Fmoc-Gly. Après une série de lavages (DMF, CH₂Cl₂, MeOH et CH₂Cl₂), la peptidylrésine est séchée sous vide.

Clivage et déprotection par HF. La peptidylrésine est traitée (1 g) par HF (20 ml) en présence d'anisole (15%), 1 h à 0°. Après évaporation du HF (30 min), l'anisole est éliminé par des lavages à l'Et₂O et le peptide extrait de la résine successivement par H₂O/CH₃CN/CF₃COOH 80:20:0,1 (v/v) et par CH₃COOH 50% (v/v). Les solns. obtenues sont filtrées et lyophilisées séparément pour donner 190 et 220 mg de **1** brut sous forme de trifluoroacétate et d'acétate respectivement.

Purification HPLC et caractérisation. Une soln. de 50 mg de **1** brut dans 500 µl de DMSO (qualité spectr.) est centrifugée puis injectée sur une colonne C₁₈ semi-prép. *Whatman ODS 3* de 2,2 × 500 cm (élution avec CH₃CN/H₂O/CF₃COOH 38:62:0,1 (v/v) à 10 ml/min). Après élution du produit (240 ml), un rapide gradient jusqu'à 60% de CH₃CN élimine les produits lipophiles. Les fractions anal. pures de **1** (contrôlées par HPLC) sont rassemblées (27 mg) et le produit est caractérisé par RMN-¹H dans le (D₆)DMSO. En particulier, les protons arom. du groupe Fmoc sont identifiés (*d* à 7,89–7,71, *t* à 7,43–7,33) ainsi que le CHCH₂OCO (*m* à 4,2–4,3), prouvant la bonne résistance du groupement à l'acidolyse par HF.

Gly-εAhx-Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe(4N₃) (3). *Couplage de segments avec BOP.* Tel qu'issu du clivage par HF, 117 mg de **1** brut, sous forme de trifluoroacétate (estimé à 30 µmol), sont dissous dans 500 µl de DMSO (qualité spectr.) additionnés de 15 mg (ca. 60 µmol) de CF₃COOH · Phe(4N₃)-OMe (2 · CF₃COOH) et de 13 mg de BOP (ca. 30 µmol). Le pH est maintenu aux environs de 8 par addition d'(i-Pr)₂EtN (ca. 50 µl, 300 µmol). Des aliquotes de 1 µl sont prélevés au cours du temps et allongés de 200 µl d'H₂O/CH₃CN/CF₃COOH 50:50:0,1 (v/v) pour bloquer le couplage par réacidification. L'équivalent de ¼ de µl de mélange réactionnel est injecté sur une colonne anal. C₁₈ et élué par un gradient de CH₃CN de 1% par min de 0–70% avec un débit de 2 ml/min. Les produits sont détectés par leur absorption UV simultanément à 254 et 214 nm. La *fig. 1* montre la composition du mélange en début de couplage (*fig. 1a*) et après 1 h (*fig. 1b*). Les différents produits sont identifiés par injection séparée. Le DMSO, solvant de couplage, est élué immédiatement. Il n'absorbe qu'à 214 nm. Un pic, attribuable au réactif BOP, apparaît transitoirement en début de couplage, mais le réactif est consommé et vraisemblablement plus ou moins hydrolysé dans les conditions de l'analyse. Les % approximatifs de coélution en CH₃CN peuvent être déterminés sur les chromatogrammes. Les rapports d'absorption entre 214 et 254 nm facilitent considérablement l'identification des produits (*tab. 2*). La *fig. 1a* montre l'apparition du produit de la réaction **7**, le plus lipophile, en début de couplage. Lorsque la réaction n'évolue plus, l'addition d'une quantité complémentaire de BOP et d'(i-Pr)₂EtN permet une quasi totale utilisation du synthon **1** (qui est le plus important segment) ainsi que le montre la *fig. 1b*, donc un rendement optimal puisqu'aucun produit parasite n'apparaît.

Saponification. Pour piéger les espèces activées, 35 mg de résine benzhydrylaminiée neutralisée (ca. 20 µmol de NH₂) sont ajoutés [20], un pH de l'ordre de 9 est maintenu par addition d'(i-Pr)₂EtN durant quelques h. Puis 1,5 ml de NaOH M est ajouté au mélange de couplage brut et agité. Un abondant précipité blanc se forme. Après 15 min, le mélange est réacidifié par du CF₃COOH M (150 µl) et débarrassé par centrifugation du dibenzofulvène précipité (couche supérieure) et de la résine (culot). L'achèvement de la réaction est contrôlé en RP-HPLC (*fig. 1c*) par la totale disparition du pic de Fmoc-Gly-...-Phe(4N₃)-OMe (**7**). La saponification touche également l'excès de Phe(N₃)-OMe qui est déprotégé. Comme prévisible, le produit de couplage **7**, N- et C-protégé, est le plus lipophile.

Remarque. En fin de couplage (*fig. 1b*), un produit très lipophile, de forte absorption relative à 254 nm, non touché par la saponification, apparaît. Il a été identifié au dibenzofulvène par comparaison avec le produit de la déprotection de Fmoc-Gly (HPLC) et par comparaison avec le précipité obtenu au cours de la saponification.

HPLC semi-prép. La soln. brute issue de la saponification (600 µl) est injectée sur la colonne semi-prép. Le DMSO est d'abord élué par H₂O/CF₃COOH 1000:1 (v/v), puis un gradient d'élution est pratiqué de 0–70% de CH₃CN à raison de 1% et 10 ml/min sauf dans la région du produit attendu où le gradient est limité à 0,2% min. Le pic coéluant avec 33% de CH₃CN est fractionné et collecté (*fig. 2a*). Les différentes fractions sont contrôlées en HPLC anal. (*fig. 2b*), et les plus pures sont rassemblées et lyophilisées (28 mg).

Bio-NH(CH₂)₂-SS-(CH₂)₂-CO-Gly-εAhx-Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe(4N₃) (5). A 5,1 mg (3 µmol) de **3** dans 500 µl de DMSO anh., 5 mg (ca. 8 µmol) de **4** (NHS-SS-Biotin de *Pierce*) sont ajoutés. Le pH est porté vers 7–8 à l'aide d'(i-Pr)₂EtN (ca. 5 µl, 30 µmol). Après 5 min, le pH est réajusté avec de l'(i-Pr)₂EtN (ca. 5 µl). Après 15 min, le milieu est dilué par 500 µl de CH₃CN/H₂O 1:1 (v/v) et réacidifié par du CF₃COOH (ca. 10 µl). La HPLC anal. en mode gradient (0–60% de CH₃CN, 1% et 2 ml/min) montre la disparition de **3** qui coélué avec 34% de

CH₃CN et l'apparition d'un pic nettement majoritaire qui coélue avec 40% de CH₃CN. Le mélange est injecté sur la colonne de RP-HPLC semi-prép. (*Whatman ODS 3*; 2,2 × 50 cm; 10 µm) et élué à 10 ml et 0,2% de CH₃CN/min en mode gradient (*fig. 3*). Le pic principal, qui coélue avec 38% de CH₃CN dans ces conditions, est collecté, lyophilisé (4 mg) et contrôlé par HPLC anal. Deux essais identiques ont fourni au total 8 mg de produit, consacrés à l'étude RMN-¹H. La même méthode, extrapolée à de plus grandes quantités, a permis d'obtenir 50 mg de produit pur en une seule injection d'HPLC semi-prép.

REFERENCES

- [1] J. C. Bonnafous, R. Seyer, M. Tencé, J. Marie, M. Kabbaj, A. Aumelas, *J. Recept. Res.* **1988**, 8, 295.
- [2] D. Regoli, F. Rioux, W. K. Park, C. Choi, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1974**, 52, 39.
- [3] D. Regoli, W. K. Park, F. Rioux, *Pharmacol. Rev.* **1974**, 26, 69.
- [4] F. M. Finn, G. Titus, D. Horstman, K. Hofmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 7328.
- [5] K. Hofmann, H. Romovacek, G. Titus, K. Ridge, J. A. Raffensperger, F. Finn, *Biochemistry* **1987**, 26, 7384.
- [6] K. Hofmann, H. Romovacek, C. Stehle, F. Finn, *Biochemistry* **1986**, 25, 1339.
- [7] S. Lavieille, G. Chassaing, J. C. Beaujouan, Y. Torrens, A. Marquet, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, 24, 480.
- [8] R. Wunderling, S. D. Sharma, P. Minakakis, R. Schwyzler, *Helv. Chim. Acta* **1985**, 68, 1.
- [9] M. Shimkus, J. Levy, T. Herman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1985**, 82, 2593.
- [10] G. Guillemette, G. Guillon, J. Marie, M. N. Balestre, E. Escher, S. Jard, *Mol. Pharmacol.* **1986**, 30, 544.
- [11] R. E. Feeney, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, 29, 145.
- [12] G. Guillemette, G. Guillon, J. Marie, C. Pantaloni, M. N. Balestre, E. Escher, S. Jard, *J. Recept. Res.* **1984**, 4, 267.
- [13] T. Wieland, A. Von Dungen, C. Birr, *Liebigs Ann. Chem.* **1971**, 752, 109.
- [14] Z. Mackiewicz, S. Bélisle, D. Bellabarba, N. Gallo-Payet, J. G. Lehoux, G. Lagacé, E. Escher, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 423.
- [15] J. C. Bonnafous, M. Tencé, R. Seyer, J. Marie, A. Aumelas, S. Jard, *Biochem. J.* **1988**, 251, 873.
- [16] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 14, 1219.
- [17] T. Brown, J. H. Jones, J. D. Richards, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1982**, 1553.
- [18] D. Le Nguyen, R. Seyer, A. Heitz, B. Castro, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1985**, 1025.
- [19] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *J. Chem. Res.* **1977**, 182, 2118.
- [20] P. Rivaille, communication personnelle (Faculté de Médecine Saint-Antoine (Biophysique), 27, rue de Chaligny, F-75571 Paris Cedex 12).
- [21] P. S. Anjaneyulu, J. V. Staros, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, 30, 117.
- [22] K. Wüthrich, 'NMR of Proteins and Nucleic Acids', Wiley & Sons, New York, 1986.
- [23] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2229.
- [24] K. Nagayama, A. Kumar, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1980**, 40, 321.
- [25] M. D. Shenderovich, G. V. Nikiforovich, G. I. Chippens, *J. Magn. Reson.* **1984**, 59, 1.
- [26] O. Jardetzky, G. C. K. Roberts, 'NMR in Molecular Biology', Academic Press, New York, 1981, p. 169.
- [27] B. P. Roques, R. Rao, D. Marion, *Biochimie* **1980**, 62, 753.
- [28] G. Bodenhausen, H. Kogler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1984**, 58, 370.
- [29] D. M. Neville, *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, 154, 540.
- [30] B. F. Gisin, *Helv. Chim. Acta* **1973**, 56, 1476.
- [31] B. F. Gisin, *Anal. Chim. Acta* **1972**, 58, 248.
- [32] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595.