

104. Une nouvelle méthode de synthèse peptidique

par R. A. Boissonnas.

(3 III 51)

On sait depuis de nombreuses années que les azides¹⁾ (I) et les chlorures²⁾ (II) des acides aminés et peptides dont le groupe amino est protégé réagissent avec des groupes amino libres d'acides aminés, de peptides, ou de dérivés de ceux-ci. Les azides nécessitent plusieurs stades pour leur préparation et se transposent parfois en isocyanates³⁾. La préparation des chlorures d'acides est souvent accompagnée de racémisation et de réactions secondaires⁴⁾.

Plus récemment, *Chantrenne*⁵⁾, ainsi que *Sheehan & Frank*⁶⁾ ont montré que les anhydrides mixtes (III et IV) des mono- ou diesters de l'acide phosphorique avec les acides aminés dont le groupe amino est protégé donnent également naissance à des liaisons peptidiques en présence d'acides aminés ou de peptides. Ces anhydrides mixtes furent préparés à partir du chlorure des acides aminés N-acylés et du sel d'argent de l'ester phosphorique, ce qui ne supprime donc pas les inconvénients inhérents à la synthèse des chlorures d'acide.

La préparation de ces anhydrides mixtes par la réaction inverse, c'est-à-dire la condensation d'un ester chlorophosphorique avec le sel d'un acide aminé N-acylé, a été tentée sans succès par *Sheehan & Frank*⁶⁾.

Cependant *Wieland* et collaborateurs⁷⁾ réalisèrent la préparation d'anhydrides mixtes par une réaction de ce type en condensant le chlorure de benzoyle, ou d'acétyle avec le sel (d'argent, de sodium, ou de N-éthylpipéridine) d'acides aminés ou de peptides N-acylés. En solution organique ou aqueuse, les anhydrides mixtes ainsi formés (V et VI) réagissent rapidement à froid en présence de groupes amino libres d'acides aminés, de peptides, ou d'esters de ceux-ci, avec formation de liaisons peptidiques.

¹⁾ *Th. Curtius*, B. **35**, 3226 (1902).

²⁾ *E. Fischer*, B. **36**, 2094 (1903).

³⁾ *M. Bergmann & L. Zervas*, J. Biol. Chem. **113**, 341 (1936); *J. S. Fruton*, J. Biol. Chem. **146**, 463 (1942).

⁴⁾ *M. Bergmann & L. Zervas*, B. **65**, 1192 (1932); *M. Bergmann, L. Zervas, J. S. Fruton, F. S. Schneider & H. Schleich*, J. Biol. Chem. **109**, 325 (1935); *E. Pacsu & E. J. Wilson*, J. Org. Chem. **7**, 117, 126 (1942).

⁵⁾ *Nature* **164**, 576 (1949); *Biochem. Biophys. Acta* **4**, 484 (1950).

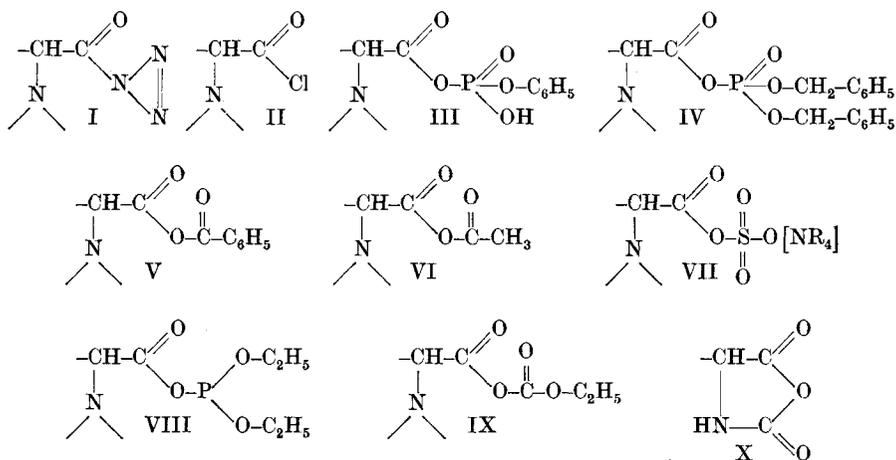
⁶⁾ *Am. Soc.* **72**, 1312 (1950).

⁷⁾ *Th. Wieland, W. Kern & R. Schring*, A. **569**, 117 (1950); *Th. Wieland & R. Schring*, A. **569**, 122 (1950).

Tout dernièrement deux autres types d'anhydrides mixtes ont été également préparés à partir des sels d'acides aminés ou peptides N-acylés.

*Kenner*¹⁾ a obtenu à partir des sels d'amine quaternaire des dérivés carbobenzoxy d'acides aminés ou de peptides et d'anhydride sulfurique dans la diméthylformamide des anhydrides mixtes de l'acide sulfurique (VII), qui sont très réactifs et donnent immédiatement naissance à des liaisons peptidiques en présence d'acides aminés ou de peptides en solution aqueuse. De même que pour les anhydrides mixtes phosphoriques, benzoïques ou acétiques cités ci-dessus, il est nécessaire de neutraliser au fur et à mesure l'acide (alcoyl-phosphorique, benzoïque, acétique ou sulfurique) libéré au cours de la réaction. Il n'est pas possible d'ajouter dès le début une quantité équivalente de base (amine tertiaire ou alcali), car ces anhydrides sont instables en présence de base en milieu organique ou aqueux. Il faut donc travailler en milieu tamponné, ce qui complique l'isolement du peptide formé, ou bien procéder à une addition soigneusement contrôlée de base au cours de la réaction.

*Anderson, Welcher & Young*²⁾ ont préparé, à partir des sels de triéthylamine d'acides aminés N-acylés et de diéthylchlorophosphite, des anhydrides éthylphosphoreux mixtes VIII qui sont beaucoup plus stables, mais moins réactifs que les anhydrides mixtes phosphoriques, benzoïques, acétiques ou sulfuriques correspondants, et ne réagissent qu'à chaud en solution organique avec les esters d'acides aminés ou de peptides.

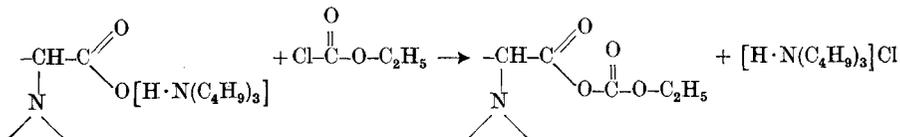


Nous avons préparé un nouveau type d'anhydride mixte, les anhydrides alcoylcarboniques IX. Ceux-ci présentent plusieurs avantages sur les anhydrides mixtes décrits jusqu'ici.

¹⁾ Chem. & Industry 1951, 15.

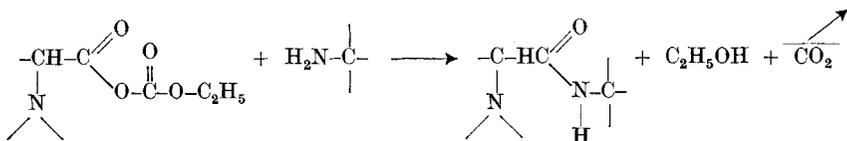
²⁾ Am. Soc. 73, 501 (1951).

Ils sont très facilement préparés en ajoutant à 0–10° en quantités équimoléculaires une amine tertiaire (tri-*n*-butylamine), puis du chloroformiate d'éthyle ou de méthyle, à un acide aminé ou peptide *N*-acylé dans un solvant organique ne possédant pas d'hydrogène labile, selon la réaction:



Nous employons la tri-*n*-butylamine de préférence à une autre base tertiaire, car ses sels sont très solubles dans la plupart des solvants organiques. La solution d'anhydride mixte alcoylcarbonique ainsi obtenue est stable pendant plusieurs heures.

Si, à une telle solution, on ajoute une solution aqueuse ou organique d'un corps possédant un groupe amino libre (sel ou ester d'acide aminé ou de peptide, amine), il se forme immédiatement une liaison peptidique avec dégagement d'anhydride carbonique, selon la réaction:



En effet, l'acide alcoylcarbonique libéré est trop faible pour pouvoir former un sel stable avec les groupes amino, et il se décompose spontanément. Il n'est donc pas nécessaire d'ajouter de l'alcali au cours de la réaction, ni de travailler en milieu tamponné, comme c'est le cas pour d'autres anhydrides mixtes, puisque l'acide libéré au cours de la réaction s'élimine de lui-même. Les rendements totaux en peptides purifiés sont supérieurs à 65%. Nous n'avons pas remarqué la formation d'uréthanes, ni l'apparition de réactions secondaires.

Par cette nouvelle méthode, nous avons préparé les peptides suivants (les rendements totaux sont donnés entre parenthèses):

Dipeptides: Phtalyl-glycyl-glycinate d'éthyle à partir de phtalyl-glycine et de glycinate d'éthyle (69,5%).

Carbobenzoxy-DL-alanyl-glycinate d'éthyle à partir de carbobenzoy-DL-alanine et de glycinate d'éthyle (71%).

Phtalyl-glycyl-DL-phénylalanine à partir de phtalyl-glycine et de DL-phénylalanine (71,5%).

Térapeptide: Phtalyl-glycyl-DL-phénylalananyl-glycyl-L-leucine à partir de phtalyl-glycyl-DL-phénylalanine et de glycyl-L-leucine (65,5%).

La constitution de ces polypeptides a été vérifiée par hydrolyse, chromatographie sur papier, et dosage colorimétrique des quantités relatives des acides aminés ainsi séparés¹⁾.

En présence d'aniline, les anhydrides mixtes alcoylcarboniques donnent des anilides. En présence d'ammoniac, on obtient avec un rendement de plus de 90 % des amides.

Les anhydrides mixtes alcoylcarboniques IX peuvent être rapprochés des anhydrides cycliques de *Leuchs*²⁾ X, qui présentent les mêmes propriétés que les anhydrides mixtes³⁾. Mais alors qu'on peut former les anhydrides mixtes aussi bien à partir des peptides que des acides aminés N-acylés, on n'obtient les anhydrides cycliques de *Leuchs* qu'à partir des acides aminés, ce qui ne permet d'allonger la chaîne peptidique que par une unité d'acide aminé à la fois.

Comparée aux méthodes de synthèses peptidiques basées sur l'emploi des anhydrides mixtes (I—VIII) décrits jusqu'ici, cette méthode nouvelle de synthèse peptidique par l'intermédiaire d'anhydrides mixtes alcoylcarboniques présente des avantages au point de vue de la rapidité et de la simplicité d'exécution, ainsi que de la douceur des conditions employées.

Nous exprimons notre reconnaissance au Professeur *K. H. Meyer* pour l'intérêt qu'il a bien voulu témoigner à ce travail qui a été exécuté grâce à l'appui du «Fonds fédéral pour l'encouragement des recherches scientifiques».

Partie expérimentale.

Les F. sont corrigés. Précision: $\pm 2^{\circ}$. L'azote a été déterminé par semi-micro *Kjeldahl*. Les solvants sont purs et anhydres. La tri-n-butylamine est redistillée sur sodium. Sauf indication contraire, les différents réactifs sont employés en quantités équimoléculaires.

Anilide de phtalyl-glycine. Une solution refroidie à 0° de 1680 mg (8,2 millimoles) de phtalyl-glycine et de 1,95 cm³ de tri-n-butylamine dans 10 cm³ de chloroforme est additionnée de 0,79 cm³ de chloroformiate (= chlorocarbonate = chlorométhanoate) d'éthyle. Après 10 min. à 0°, on ajoute 0,75 cm³ d'aniline. Un dégagement de CO₂ se produit immédiatement et il apparaît des cristaux qui sont filtrés, lavés par 5 cm³ de chloroforme et séchés. On obtient ainsi avec un rendement de 68% 1580 mg d'anilide de phtalyl-glycine, 230—231,5° (litt.: 231—232°⁴⁾; 230,5, 231,5°⁵⁾).

C₁₆H₁₂O₃N₂ (280,28) Calculé N 10,00% Trouvé N 9,95%

Le rendement en anilide n'est pas modifié si l'on attend 30 ou 60 min. au lieu de 10 min. avant l'adjonction de l'aniline, si l'on augmente les quantités de tri-n-butylamine, de chloroformiate ou d'aniline, si l'on fait la réaction dans le benzène, le benzonitrile, le nitrobenzène, l'acétate d'éthyle, le dioxanne, l'éther, l'acétone, ou la diméthylformiamide, ou si l'on remplace le chloroformiate d'éthyle par le chloroformiate de méthyle.

Les anhydrides mixtes formés intermédiairement peuvent être isolés, mais, de même que les anhydrides mixtes benzoïques et acétiques⁶⁾, il est difficile de les purifier sans amener une certaine décomposition.

¹⁾ *R. A. Boissonnas*, Helv. **33**, 1966, 1972, 1975 (1950).

²⁾ *H. Leuchs*, B. **36**, 857 (1903).

³⁾ *J. L. Bailey*, Nature **164**, 889 (1949); Soc. **1950**, 3461; *A. C. Farthing*, Soc. **1950**, 3213.

⁴⁾ *J. Scheiber*, B. **46**, 1103 (1913).

⁵⁾ *J. C. Sheehan & V. S. Frank*, Am. Soc. **72**, 1312 (1950).

⁶⁾ *Th. Wieland* et coll., A. **569**, 117, 122 (1950).

Phtalyl-glycyl-glycinate d'éthyle. A une solution d'anhydride mixte préparée comme plus haut à partir de 1680 mg de phtalyl-glycine, mais dans 5 cm³ de chloroforme, on ajoute 5 cm³ de chloroforme additionnés de 1143 mg de chlorhydrate de glycinate d'éthyle et de 1,95 cm³ de tri-n-butylamine. Il y a immédiatement un fort dégagement de CO₂ et formation d'un abondant précipité. On lave la suspension chloroformique par 5 cm³ d'H₂O, 3 cm³ HCl n., 3 cm³ NaHCO₃ 0,5-m., et 3 cm³ H₂O. Par filtration et lavage par 5 cm³ de chloroforme, on obtient 1650 mg (rendement 69,5%) de phtalyl-glycyl-glycinate d'éthyle, F. 194—195°.

C₁₄H₁₄O₅N₂ (290,27) Calculé N 9,66% Trouvé N 9,64%

Carbobenzoxy-DL-alanyl-glycinate d'éthyle. Une solution refroidie à 10° de 937 mg (4,2 millimoles) de carbobenzoxy-DL-alanine et de 1 cm³ de tri-n-butylamine dans 5 cm³ de dioxanne est additionnée de 0,40 cm³ de chloroformiate d'éthyle. Après 10 min. à 10° on ajoute en une fois 5 cm³ de dioxanne contenant 587 mg de chlorhydrate de glycinate d'éthyle et 1 cm³ de tri-n-butylamine. Il se dégage immédiatement du CO₂. Par addition de 30 cm³ d'eau, il se forme une huile qui est reprise dans 10 cm³ de chloroforme et lavée par 5 cm³ de HCl n., 3 cm³ H₂O, 5 cm³ NaHCO₃ 0,5-m. et 3 cm³ H₂O. Le chloroforme séché par Na₂SO₄ et évaporé, livre une huile qui cristallise après quelques heures en fournissant 911 mg (rendement 71%) de carbobenzoxy-DL-alanyl-glycinate d'éthyle, F. 78°.

C₁₅H₂₀O₅N₂ (308,33) Calculé N 9,08% Trouvé N 8,98%

Après hydrolyse, séparation chromatographique sur papier et dosage colorimétrique⁴⁾, on trouve par mole de glycine: 1,01 mole d'alanine (calculé 1,00).

Phtalyl-glycyl-DL-phénylalanine. A une solution d'anhydride mixte préparée comme plus haut à partir de 1680 mg de phtalyl-glycine, mais dans 5 cm³ de dioxanne à 10°, on ajoute en une fois 1360 mg de DL-phénylalanine dans 2,1 cm³ NaOH 4-n. Il y a immédiatement un très fort dégagement de CO₂ qui cesse après 1 min. On acidifie au Congo par 2,8 cm³ HCl 3-n., et l'huile qui s'est formée est extraite par l'éther (100 cm³ au total). Par concentration de l'éther au vide, il apparaît des cristaux qui sont filtrés et recristallisés de l'alcool isoamylique. On obtient ainsi 2060 mg (rendement 71,5%) de phtalyl-glycyl-DL-phénylalanine, F. 197—199° (litt. 197—198,5°¹⁾).

C₁₉H₁₆O₅N₂ (352,34) Calculé N 7,95% Trouvé N 7,93%

Après hydrolyse, etc.²⁾, on trouve par mole de glycine: 1,01 mole de phénylalanine (calculé 1,00).

Phtalyl-glycyl-DL-phénylalanyl-glycyl-L-leucine. Une solution refroidie à 10° de 352 mg (1,0 millimole) de phtalyl-glycyl-DL-phénylalanine et de 0,24 cm³ de tri-n-butylamine dans 2,5 cm³ de dioxanne est additionnée de 0,10 cm³ de chloroformiate d'éthyle. Après 10 min. on ajoute une solution de 188 mg de glycyl-L-leucine dans 1 cm³ NaOH n. Le fort dégagement de CO₂ cesse après 1 min. On alcalinise la solution obtenue par 1 cm³ NaOH 0,1-n., extrait le dioxanne par l'éther et acidifie au Congo par HCl 3-n. Le précipité formé, recristallisé du méthanol, fournit 342 mg (rendement 65,5%) de phtalyl-glycyl-DL-phénylalanyl-glycyl-L-leucine, F. 195—196°.

C₂₇H₃₀N₄O₇ (522,54) Calculé N 10,72% Trouvé N 10,20%

Après hydrolyse, etc.²⁾, on trouve par mole de glycine: 0,51 mole de phénylalanine et 0,49 mole de leucine (calculé 0,50 et 0,50).

Phtalyl-glycinamide. Dans une solution d'anhydride mixte préparée comme plus haut à partir de 1680 mg de phtalyl-glycine, dans 10 cm³ de chloroforme, on fait passer un courant d'ammoniac sec. Un précipité apparaît immédiatement. La suspension est lavée par 5 cm³ H₂O, 3 cm³ HCl n., 3 cm³ NaHCO₃ 0,5-m. et 3 cm³ H₂O. Le précipité est filtré, lavé par 5 cm³ de chloroforme et séché. On obtient 1514 mg (rendement 90,5%) de phtalyl-glycinamide, F. 259—260°.

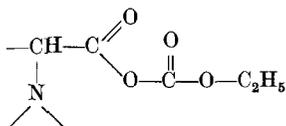
C₁₀H₈O₃N₂ (204,18) Calculé N 13,72% Trouvé N 13,78%

¹⁾ J. C. Sheehan & V. S. Frank, Am. Soc. **71**, 1860 (1949).

²⁾ R. A. Boissonnas, Helv. **33**, 1966, 1972, 1975 (1950).

RÉSUMÉ.

En ajoutant à un acide aminé ou peptide N-acylé dans un solvant organique une amine tertiaire (tri-n-butylamine), puis du chloroformiate (= chlorocarbonate = chlorométhanoate) d'éthyle (ou de méthyle) en quantités équimoléculaires, on obtient immédiatement une solution contenant des anhydrides mixtes de la forme:



Si, à une telle solution, on ajoute une solution aqueuse ou organique d'un acide aminé, d'un peptide, d'un ester de ceux-ci, ou d'une amine, on obtient sur le champ la formation d'une liaison peptidique, avec dégagement de CO₂. Grâce à cette méthode simple et rapide, nous avons préparé divers dipeptides ainsi qu'un térapeptide (à partir de deux dipeptides). Avec l'ammoniac, ces anhydrides mixtes alcoyl-carboniques donnent des amides.

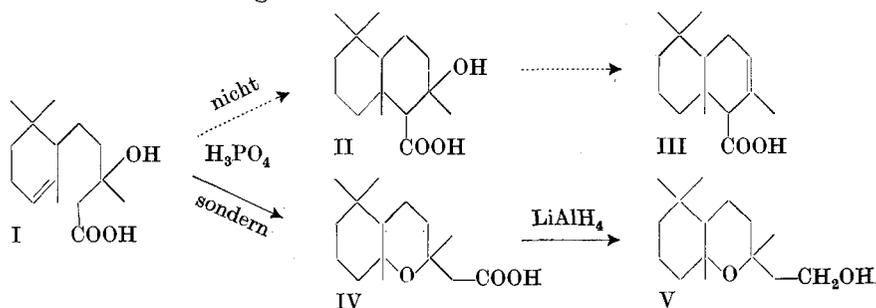
Laboratoire de Chimie organique et inorganique
de l'Université de Genève.

105. Zur säurekatalysierten Cyclisation von ungesättigten β -Oxy-säuren der Terpen- und Sesquiterpenreihe

von A. Caliczi, E. Lederer und H. Schinz.

(17. III. 51.)

C. Collin-Asselineau, E. Lederer & J. Polonsky¹⁾ berichteten kürzlich über die Cyclisation der β -Methyl- γ -(α -cyclogeranyl)- β -oxybuttersäure (I) und der isomeren β -Cyclogeranyl-Verbindung mittels konzentrierter Phosphorsäure. Dem dabei erhaltenen Reaktionsprodukt, dessen Phenyl-phenacylester bei 97° schmolz, wurde die Konstitution II zugeschrieben.



¹⁾ Bl. 1950, 715.