

Synthèse d'acides poly- α -aminés marqués au ^{14}C

ANDRÉ NORMAND ET LOUIS BERLINGUET

Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Québec

Reçu le 30 janvier 1967

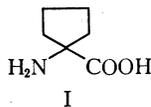
Des polymères et copolymères de l'acide amino-1 cyclopentane carboxylique et de la L-lysine ont été synthétisés. Pour fins d'études métaboliques, les polymères marqués au ^{14}C sur le groupement carboxylique de l'acide amino-1 cyclopentane carboxylique ont aussi été synthétisés en adaptant la synthèse pour la micropréparation.

Polymers and copolymers of 1-aminocyclopentanecarboxylic acid and L-lysine have been synthesized. The method has been adapted for the preparation of labelled polymers of 1-aminocyclopentanecarboxylic acid containing ^{14}C on the carbonyl group.

Canadian Journal of Chemistry. Volume 45, 1551 (1967)

INTRODUCTION

L'acide amino-1 cyclopentane carboxylique (I) présente un intérêt particulier puisqu'on a démontré que cet acide aminé non naturel peut inhiber la croissance de certains types de tumeurs cancéreuses (1, 2). L'étude de plusieurs de ses dérivés a permis de conclure que l'activité de I n'est pas diminuée lorsqu'il est incorporé dans un di- ou tri-peptide (3) car ces courts peptides par hydrolyse enzymatique libèrent I (4). Par ailleurs, l'acide aminé possède une toxicité assez marquée qui limite son emploi en clinique et qui a fait l'objet de plusieurs études (5-7). Nous avons pensé qu'en synthétisant un polypeptide de I, ou en l'incorporant dans un copolymère avec un acide aminé naturel, on pourrait à la fois diminuer sa toxicité et conserver son activité antitumorale.



Pour obtenir ces polypeptides, nous avons utilisés les méthodes classiques de synthèse des acides poly- α -aminés en polymérisant, dans des conditions variées de réaction (8), les anhydrides de Leuch (9). Dans le but d'étudier le métabolisme in vivo de ces polypeptides nous avons modifié ces méthodes de synthèse pour la micropréparation de polymères renfermant du ^{14}C .

I a été préparé à partir de la cyclopentanone par la méthode de Bucherer et Lieb

(10). L'anhydride *N*-carboxy correspondant a été obtenu avec un bon rendement par phosgénation directe de l'acide aminé. L'acide poly- α -amino-1 cyclopentane carboxylique a été synthétisé par deux méthodes différentes: (a) par chauffage de l'anhydride à son point de fusion et à pression réduite (McDonald (11) a obtenu l'acide poly- α -amino-1 cyclopentane carboxylique par une méthode identique, alors que Frankel et Bachi ne purent l'isoler (12)), et (b) à température ambiante, dans le dioxane anhydre, en amorçant la polymérisation par addition d'éthanoate de sodium.

L'acide poly- α -amino-1 cyclopentane carboxylique étant insoluble dans les milieux biologiques, nous avons voulu préparer un copolymère soluble de I en introduisant la L-lysine dans la chaîne peptidique. L'anhydride de la L-lysine fut préparé à partir de la α, ϵ -*N*-dicarbobenzoxy-L-lysine (13) par déshydratation au moyen du pentachlorure de phosphore. Un mélange équimolaire des anhydrides de I et ϵ -*N*-carbobenzoxy de la L-lysine a été polymérisé dans le dioxane anhydre en amorçant la réaction par l'éthanoate de sodium. L'hydrolyse subséquente du groupement carbobenzoxy par l'acide bromhydrique en milieu acétique glacial suivant Overell et Petrov (14) donne le copolymère soluble, l'acide poly- α -L-lysine-amino-1 cyclopentane carboxylique sous forme de bromhydrate.

A partir de l'acide amino-1 cyclopentane carboxylique- ^{14}C nous avons obtenu l'anhydride- ^{14}C correspondant, lequel a été

polymérisé seul et copolymérisé avec la L-lysine. La méthode modifiée de polymérisation et de récupération nous a permis d'obtenir des quantités variant de 0.5 à 1.0 g, avec une activité spécifique variant de 1×10^6 à 1×10^5 d.p.m./mg. Ces premiers polypeptides marqués au ^{14}C ont été étudiés in vivo. Les résultats préliminaires publiés indiquent que l'acide poly- α -amino-1 cyclopentane carboxylique n'est pas métabolisé chez le rat et qu'en vertu de son insolubilité il se comporte comme une substance inerte. Il est intéressant toutefois de noter que l'acide poly- α -amino-1 cyclopentane carboxylique possède un pouvoir antitumoral marqué à l'endroit du Sarcome 180 chez la souris, sans lui-même être toxique (15). L'addition d'un acide aminé naturel, comme la L-lysine, rend l'acide poly- α -L-lysine-amino-1 cyclopentane carboxylique susceptible à l'hydrolyse enzymatique in vivo. La polybasicité de ce peptide lui confère une toxicité et des propriétés semblables à celles observées avec la poly-L-lysine et les histones (16).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les points de fusion ont été déterminés dans un appareil Fisher-Johns et ne sont pas corrigés.

Anhydride N-carboxy amino-1 cyclopentane carboxylique

On fait passer un courant de phosgène dans une suspension de 46 g (0.3 mole) de I dans 500 ml de dioxane anhydre pendant $\frac{1}{2}$ h à 60°, après quoi on porte la suspension à ébullition pendant 1 h; puis on fait barboter de l'azote sec pendant 20 min. L'excès de solvant est évaporé et l'anhydride précipité par l'addition d'éther de pétrole. Le produit recristallisé fond à 128–129°; rendement 42.8 g (77%).

Anal. Calc. for $\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$: N, 9.0; Trouvé: N, 8.9.

Acide poly- α -amino-1 cyclopentane carboxylique

Polymérisation en solution

On ajoute 0.68 g (0.01 mole) d'éthanoate de sodium dans une solution de 15.1 g (0.1 mole) d'anhydride N-carboxy amino-1 cyclopentane carboxylique dans 150 ml de dioxane anhydre et on laisse réagir pendant 16 h à la température de la chambre. On ajoute 100 ml de HCl 1 N (0.1 mole), puis on agite pendant 2 h pour détruire l'anhydride qui n'a pas réagi. Ensuite le polymère est centrifugé, lavé trois fois avec de l'eau et séché; rendement 10.1 g (94%) (calculé sur le CO_2 dégagé).

Anal. Calc. pour $\text{C}_6\text{H}_9\text{ON}$: N, 12.6. Trouvé: N, 12.41.

Polymérisation par chauffage

On place 11.0 g (0.072 mole) d'anhydride N-carboxy amino-1 cyclopentane carboxylique dans un four à 130° et à 12 mm de pression pendant 4 h. Le produit obtenu est alors lavé successivement avec de l'acétate d'éthyle chaud, de l'eau chaude et de l'éther; rendement 6.32 g (90%).

Anal. Calc. pour $\text{C}_6\text{H}_9\text{ON}$: N, 12.6. Trouvé: N, 12.32.

Anhydride N-carboxy amino-1 cyclopentane carboxylique (carboxyl- ^{14}C)

On traite 1.2 g d'acide amino-1 cyclopentane carboxylique (carboxyl- ^{14}C) (activité spécifique 1.71×10^6 d.g.m./mg) par le phosgène tel que décrit précédemment; rendement 1.0 g (71%), p.f. 128°.

Anal. Calc. pour $\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$: N, 9.0. Trouvé: N, 8.8.

Acide poly- α -amino-1 cyclopentane carboxylique (amido- ^{14}C)

On polymérise par chauffage tel que décrit précédemment 0.78 g d'anhydride N-carboxy amino-1 cyclopentane carboxylique (carboxyl- ^{14}C); rendement 0.32 g (57%) (activité spécifique 1.16×10^6 d.p.m./mg).

Anal. Calc. pour $\text{C}_6\text{H}_9\text{ON}$: N, 12.61. Trouvé: N, 12.37.

Acide poly- α -L-lysine-amino-1 cyclopentane carboxylique (1:1)

On copolymérise un mélange de 12.24 g (0.04 mole) d'anhydride ϵ -N-carbobenzoxy-N-carboxy-L-lysine (p.f. 100°, contenant 9.16% d'azote) et de 6.0 g (0.04 mole) d'anhydride N-carboxy amino-1 cyclopentane carboxylique dissous dans 200 ml de dioxane anhydre en ajoutant 0.54 g (0.008 mole) d'éthanoate de sodium et en laissant à température ambiante durant 16 h. On ajoute 80 ml de HCl 1 N (0.08 mole), puis on agite pendant 3 h pour détruire l'anhydride qui n'a pas réagi. Le copolymère est centrifugé et lavé trois fois avec de l'eau chaude. On dissout le produit sec dans 150 ml d'acide acétique glacial, puis on fait passer HBr sec pendant 10 min à 40° et on laisse à température ambiante pendant 12 h. Le copolymère est précipité sous forme de bromhydrate par addition d'éther anhydre, filtré, repris dans un minimum d'eau et précipité par l'alcool. On obtient le copolymère après lyophilisation; rendement 8.26 g (65%).

Anal. Calc. pour $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_3\text{Br}$: N, 13.1. Trouvé: N, 12.4.

Acide poly- α -L-lysine-amino-1 cyclopentane carboxylique (amido- ^{14}C)

La copolymérisation dans le dioxane tel que décrit précédemment de 0.93 g (0.006 mole) d'anhydride N-carboxy amino-1 cyclopentane carboxylique (carboxyl- ^{14}C) (activité spécifique 9.01×10^5 d.p.m./mg) et 1.89 g (0.006 mole) d'anhydride ϵ -N-carbobenzoxy- α -N-carboxy-L-lysine en amorçant la réaction par l'éthanoate de sodium (0.0012 M). L'hydrolyse subséquente du groupement carboxy par HBr en milieu acétique donne le copo-

lymère sous forme de bromhydrate; rendement 0.95 g (50%) (activité spécifique 2.78×10^5 d.p.m./mg).

Analyses et détermination du poids moléculaire

Les polymères ont été hydrolysés dans HCl 12 N à reflux pendant 48 h. Après chromatographie circulaire dans le solvant pyridine-eau (80:20) et coloration à la ninhydrine, on observe dans le cas de l'acide poly- α -amino-1 cyclopentane carboxylique et l'acide poly- α -amino-1 cyclopentane carboxylique- ^{14}C une bande (R_f 0.62) correspondant à I. Dans le cas de l'acide poly- α -L-lysine-amino-1 cyclopentane carboxylique et de l'acide poly- α -L-lysine-amino-1 cyclopentane carboxylique- ^{14}C , on observe deux bandes correspondant à la L-lysine (R_f 0.18) et à I (R_f 0.62).

Blout a démontré qu'il existe une relation directe entre la viscosité spécifique d'un polypeptide et son poids moléculaire. Il existe une excellente corrélation entre les poids moléculaires déterminés par viscosimétrie et ceux déterminés par diffraction de la lumière et mesure de la sédimentation (17). Le poly- α -amino-1 cyclopentane carboxylique étant insoluble dans tous les solvants sauf l'acide trifluoroacétique, nous avons calculé le poids moléculaire moyen des polymères synthétisés par viscosimétrie. Les poids moléculaires ont été obtenus en comparant la viscosité spécifique des polypeptides à la courbe obtenue par Doty (18) pour le γ -benzyl-glutamate.

La viscosité spécifique des polypeptides en solution dans l'acide trifluoroacétique (0.2% p/v) a été mesurée à 25° dans un viscosimètre Ostwald-Fenske grandeur 50, et est exprimée par η_{sp}/c . Les viscosités et les poids moléculaires approximatifs sont: poly- α -amino-1-cyclopentane carboxylique, 0.148 dyne l/g et 18 000; poly- α -L-lysine-amino-1 cyclopentane carboxylique, 0.275 dyne l/g et 40 000; poly- α -L-lysine-amino-1 cyclopentane carboxylique- ^{14}C , 0.356 dyne l/g et 50 000.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Conseil National de la Recherche du Canada pour une bourse accordée à l'un d'eux (A. N.)

et envers l'Institut National du Cancer pour son aide financière. Ils remercient de plus M. Bertin Girard pour la synthèse de l'acide amino-1 cyclopentane carboxylique marqué au ^{14}C .

BIBLIOGRAPHIE

1. F. MARTEL et L. BERLINGUET. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 433 (1959).
2. T. A. CONNORS, L. A. ELSON et W. C. ROSS. *Biochem. Pharmacol.* **1**, 239 (1958).
3. R. B. ROSS, C. I. NALL, W. C. ROSS, M. C. NADKARNI, B. M. MORRISON, JR. et H. W. BAND. *J. Med. Pharm. Chem.* **3**, 1 (1961).
4. P. TAILLEUR. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Québec, 1962.
5. L. BERLINGUET, N. BÉGIN, L. M. BABINEAU, F. MARTEL, R. VALLÉE et R. O. LAFERTÉ. *Can. J. Biochem. Physiol.* **40**, 425 (1962).
6. L. BERLINGUET, N. BÉGIN, L. M. BABINEAU et R. O. LAFERTÉ. *Can. J. Biochem. Physiol.* **40**, 433 (1962).
7. L. BERLINGUET, N. BÉGIN et L. M. BABINEAU. *Can. J. Biochem. Physiol.* **40**, 1111 (1962).
8. E. KATCHALSKY et M. SELA. *Advan. Protein Chem.* **13**, 243 (1958).
9. H. LEUCH. *Ber.* **39**, 857 (1906).
10. H. T. BUCHERER et V. A. LIEB. *J. Prakt. Chem.* **141**, 5 (1934).
11. R. N. McDONALD. U.S. Patent. No. 2,560,584 (July 1951).
12. M. FRANKEL et M. BACHI. *Biopolymers*, **3**, 15 (1965).
13. M. BERGMANN, L. ZERVAS et N. F. ROSS. *J. Biol. Chem.* **111**, 913 (1935).
14. B. C. OVERELL et V. PETROV. *J. Chem. Soc.* 232 (1954).
15. L. BERLINGUET et A. NORMAND. *Intern. Cancer Congr.* 9th, Tokyo, 1966. Abstr. p. 372.
16. A. DE VRIES, J. D. FELDMAN, O. STEIN, Y. STEIN et E. KATCHALSKY. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **82**, 237 (1953).
17. E. R. BLOUT. *Dans Polyamino acids, polypeptides and proteins*. M. A. Stahman (*Editeur*). University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, 1962.
18. P. DOTY, J. H. BRADBURY et A. M. HOLTZER. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 947 (1956).