

de leucine apparaissent. On ajoute 10 cm³ de méthyléthylcétone et chauffe encore 15 min. à reflux. Après refroidissement on ajoute 0,2 cm³ d'acide acétique glacial, filtre le précipité et le lave par de la méthyléthylcétone. On obtient 325 mg de leucine (82,7%). Le pouvoir rotatoire de la leucine obtenue est identique à celui de la L-leucine ayant servi à la préparation de la phtalyl-L-leucine.

Glycyl-glycine à partir de phtalyl-glycyl-glycine, glycyl-DL-phénylalanine à partir de phtalyl-glycyl-DL-phénylalanine, et glycyl-L-leucyl-glycyl-glycine à partir de phtalyl-glycyl-L-leucyl-glycyl-glycine. La scission est effectuée dans les mêmes conditions que ci-dessus soit: solution env. 0,5-m. dans éthanol 96%, avec un équ. de tri-n-butylamine et 2–5 équ. de phénylhydrazine, chauffage de 2 h. à reflux, addition de 2 vol. de méthyléthylcétone, chauffage de 15 min. à reflux, filtration après addition de 1,5 équ. d'acide acétique glacial et lavage du précipité à la méthyléthylcétone.

Les rendements sont de l'ordre de 80%. Pour des solutions plus diluées ou des peptides contenant un plus grand nombre de restes d'acides aminés, il est avantageux de prolonger le temps de chauffage et d'augmenter la quantité de phylhydrazine.

SUMMARY.

The phtalyl group of N-phtalyl derivatives of amino acids and peptides is removed in one step by heating in alcoholic solution with phenylhydrazine and a tertiary base.

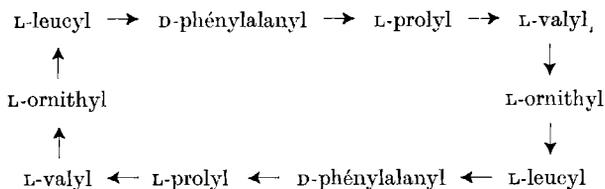
Laboratoires de chimie organique
de l'Université de Genève.

279. Synthèse de la L-valyl-L-(δ -carbobenzoxy)-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-proline

par Ingeborg Schumann et R. A. Boissonnas.

(25 IX 52)

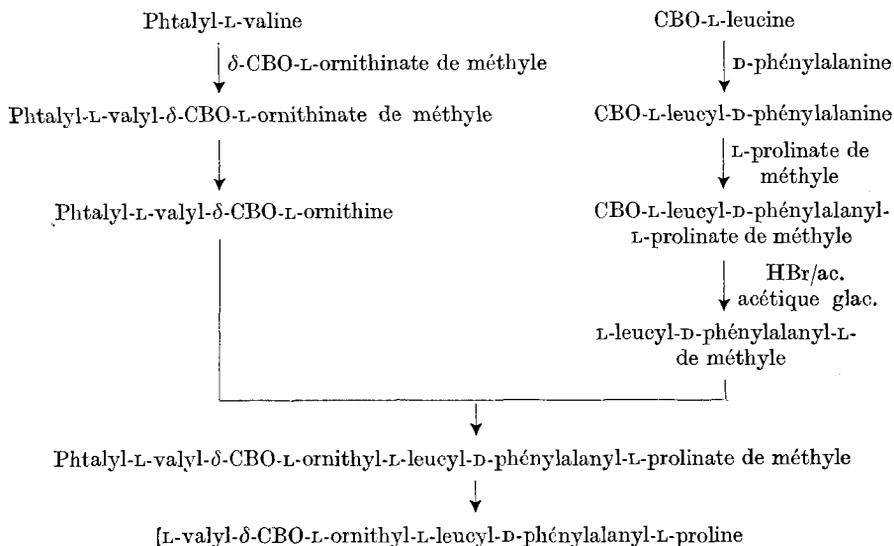
La structure actuellement attribuée à la gramicidine S¹) est celle d'un décapeptide cyclique, composé de deux périodes pentapeptidiques semblables, les seules fonctions libres étant les groupes α -amino des deux restes ornithyl:



¹) F. Sanger, Biochem. J. **40**, 261 (1946); K. O. Pederson & R. L. M. Syngé, Acta Chem. Scand. **2**, 408 (1948); A. R. Battersby & L. C. Craig, Am. Soe. **73**, 1887 (1951); R. Conden, A. H. Gordon, A. J. P. Martin & R. L. M. Syngé, Biochem. J. **40**, XLIII (1946); **41**, 596 (1947).

*Harris & Work*¹⁾ ont synthétisé la L-valyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-proline, ainsi que ses esters, amides et dérivés tosylés, qui sont tous dénués d'une activité biologique comparable à celle de la gramicidine S. Ils n'ont pas réussi à synthétiser un pentapeptide ayant le groupe δ -amino de l'ornithine bloqué et le groupe α -amino de l'acide aminé terminal (en l'occurrence la valine) libre, pentapeptide qui est nécessaire pour pouvoir synthétiser un décapeptide susceptible d'être cyclisé et désacylé en gramicidine S.

Le présent travail décrit la synthèse de la L-valyl-L-(δ -carbobenzoxy)-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-proline dont le seul groupe amino libre est le groupe α -amino du reste valyl. La synthèse a été effectuée selon le schéma suivant:



Nous avons exclusivement utilisé la méthode de synthèse peptidique au moyen des chloroformiates d'alcyle décrites par *Boissonnas*²⁾, *Wieland*³⁾ et *Vaughan*⁴⁾. Le groupe phtalyle a été scindé par la méthode à la phénylhydrazine (décrite dans le travail précédent⁵⁾) sans que le groupe carbobenzoxy (CBO) de l'ornithine soit scindé.

Ces synthèses peptidiques appellent les remarques suivantes. La condensation d'un anhydride mixte se fait plus facilement avec les esters d'acides aminés ou de peptides en solution organique

¹⁾ *J. I. Harris & T. S. Work*, Nature **161**, 804 (1948); Biochem. J. **46**, 196, 582 (1950).

²⁾ *R. A. Boissonnas*, Helv. **34**, 874 (1951).

³⁾ *Th. Wieland & H. Bernhard*, A. **572**, 190 (1951).

⁴⁾ *J. R. Vaughan*, Am. Soc. **73**, 3547 (1951); *J. R. Vaughan & R. L. Osato*, Am. Soc. **74**, 676 (1952).

⁵⁾ *I. Schumann & R. A. Boissonnas*, Helv. **35**, 2229 (1952).

qu'avec les acides aminés ou peptides en solution aqueuse. C'est pourquoi il a été nécessaire d'employer les esters méthyliques de la proline et de l'ornithine pour obtenir des rendements satisfaisants. Lorsque le nombre des acides aminés de la chaîne augmente, il devient nécessaire d'employer exclusivement les esters. Nous avons pu confirmer les résultats de *Wieland* et de *Vaughan* selon lesquels les chloroformiates d'isobutyle ou de sec-butyle donnent de meilleurs résultats que le chloroformiate d'éthyle.

Nous remercions vivement le *Fonds pour l'encouragement des recherches scientifiques* (Berne) ainsi que la *Rockefeller Foundation* (New York) pour l'aide qu'ils nous ont accordée.

Partie expérimentale.

Le nombre de millimoles est indiqué entre parenthèses. — L'azote est déterminé par microkjeldahl.

Phtalyl-L-valine. Nous avons apporté quelques modifications à la méthode de *Billman & Harting*¹⁾. Après chauffage de 15 min. sous agitation de 0,5 g de L-valine et de 1 g d'anhydride phtalique à 180—185°, le mélange est placé au vide à 100° de façon à faire sublimer l'excès d'anhydride phtalique. Le produit est recristallisé dans 200 cm³ d'eau-ethanol (9:1). Rendement 642,3 mg de phtalyl-glycine, F. 115—116° (61% par rapport à la valine).

$C_{13}H_{13}O_4N$ (247,1) Calculé N 5,67% Trouvé N 5,74%

δ-CBO-L-ornithinate de méthyle La *δ-CBO-L-ornithine* préparée selon *Harris & Work*²⁾ est estérifiée selon *Syng*³⁾.

Phtalyl-L-valyl-δ-CBO-L-ornithinate de méthyle. On dissout 247 mg (1) de phtalyl-valine dans 1 cm³ de tétrahydro-furanne avec 0,24 cm³ de tri-n-butylamine et refroidit le tout à 0°. Après avoir introduit 0,14 cm³ (1) de chloroformiate de s-butyle, on laisse réagir pendant 10 min. en agitant et ajoute une solution de 316,4 mg (1) de chlorhydrate de *δ-CBO-L-ornithinate de méthyle* dans 15 cm³ de tétrahydro-furanne et 0,24 (1) de tri-n-butylamine. Le mélange est violemment agité pendant 2 h. à 5°. Le tétrahydro-furanne est progressivement évaporé sous un léger vide de façon à augmenter la concentration. La réaction à la ninhydrine est devenue négative. La solution est évaporée au vide. Le résidu est dissout dans 50 cm³ d'éther, séchée sur du sulfate de sodium anhydre et évaporée à sec au vide. On obtient ainsi 419,7 mg de phtalyl-di-peptide brut (82,5%). Par recristallisation de ce produit dans l'éther, on obtient le phtalyl-L-valyl-*δ-CBO-L-ornithinate de méthyle*, F. 104,5—105°.

$C_{27}H_{31}O_7N_3$ (509,3) Calculé N 8,25% Trouvé N 8,26%

Phtalyl-L-valyl-δ-CBO-L-ornithine. L'ester méthylique brut de la phtalyl-L-valyl-*δ-CBO-L-ornithine* obtenu à partir de 247 mg (1) de phtalyl-valine est dissout dans 3 cm³ de dioxanne et 2 cm³ de NaOH n. Après 4 h. à température ordinaire le dioxanne est évaporé au vide (temp. max. 35°). Le résidu est repris par l'eau et la solution est filtrée et acidifiée par 2 cm³ de HCl n. L'huile qui s'est formée est extraite par 50 cm³ d'éther. La solution étherée est lavée à l'eau, séchée sur du sulfate de sodium anhydre et évaporée à sec au vide. Après séchage de 48 h. au vide poussé, on obtient 394 mg de phtalyl-L-valyl-*δ-CBO-L-ornithine* (79,7% par rapport à la phtalyl-L-valine). Après hydrolyse acide et chromatographie sur papier, on retrouve la valine et l'ornithine en quantités égales.

$C_{26}H_{29}O_7N_3$ (495,3) Calculé N 8,52% Trouvé N 8,45%

1) Am. Soc. **70**, 1473 (1948).

2) Biochem. J. **46**, 582 (1950).

3) Biochem. J. **42**, 99 (1948).

CBO-L-leucine. Elle est préparée selon la méthode utilisée par *Fox, Fling, Wax & Pettinga*¹⁾ pour la préparation de la CBO-DL-leucine. L'huile obtenue n'a pu être cristallisée. Rendement 76%.

$C_{14}H_{19}O_4N$ (265,2) Calculé N 5,28% Trouvé N 5,21%

CBO-L-leucyl-D-phénylalanine. A une solution de 1,863 g (7,05) de CBO-L-leucine dans 5 cm³ de dioxanne et 1,68 cm³ (7,05) de tri-n-butylamine, on ajoute à 0° 0,69 cm³ (7,05) de chloroformiate d'éthyle. Après 10 min., on ajoute une solution de 1,165 g (7,05) de D-phénylalanine dans 1,81 cm³ de NaOH 4-n. Il y a immédiatement un fort dégagement de CO₂. Après 30 min. à température ordinaire, on ajoute 2,42 cm³ de HCl 3-n. L'huile précipitée est extraite à l'éther; la solution étherée est lavée à l'eau et séchée sur du sulfate de sodium anhydre. Après avoir évaporé l'éther dans le vide, on reprend et évapore 2 fois avec du toluène sec, afin d'enlever les dernières traces d'eau. Après séchage au vide poussé, on obtient 2,7 g de CBO-L-leucyl-D-phénylalanine (92,8%).

$C_{23}H_{28}O_5N_2$ (412,4) Calculé N 6,88% Trouvé N 6,80%

Chlorhydrate de L-prolinate de méthyle. 1 g de L-proline est laissé 24 h. à température ordinaire en solution dans 20 cm³ de méthanol sec saturé de HCl. On évapore le solvant au vide, reprend le résidu par 10 cm³ de méthanol et filtre sur la norite. Le méthanol est évaporé au vide. On reprend et évapore 2 fois avec du toluène sec, et sèche au vide poussé. On obtient ainsi 1,435 g de chlorhydrate de L-prolinate de méthyle (95,7%). Après quelques mois le produit cristallise en cristaux hygroscopiques.

$C_5H_{12}O_2NCl$ (165,5) Calculé N 8,46% Trouvé N 8,35%

CBO-L-leucyl-D-phénylalananyl-L-prolinate de méthyle. A une solution de 1,69 g (4,1) de CBO-L-leucyl-D-phénylalanine dans 5 cm³ de chloroforme et 1 cm³ (4,1) de tri-n-butylamine on ajoute à 0° 0,4 cm³ (4,1) de chloroformiate d'éthyle. Après 10 min., on verse sous agitation une solution de 678 mg (4,1) de chlorhydrate de L-prolinate de méthyle dans 3 cm³ de chloroforme et 1 cm³ (4,1) de tri-n-butylamine. Après 20 min. d'agitation à 0° et 30 min. à température ordinaire, on ajoute 20 cm³ de chloroforme et lave la solution par HCl n., H₂O, NaHCO₃ 0,5-m., H₂O et la sèche sur du sulfate de sodium anhydre. Le solvant est évaporé au vide et le résidu est repris deux fois par du toluène sec que l'on éloigne sous pression réduite. Après séchage de 48 h. au vide poussé, on obtient 1,664 g de CBO-L-leucyl-D-phénylalananyl-L-prolinate de méthyle (77,6%). Pas plus que *Harris & Work*²⁾ qui l'ont préparé par une autre méthode, nous n'avons pu obtenir ce produit à l'état cristallisé. Après hydrolyse et chromatographie sur papier (alcool butylique tertiaire-méthanol-eau 4—5—1) on retrouve en quantités égales la leucine, la phénylalanine et la proline.

$C_{29}H_{37}O_6N_3$ (523,5) Calculé N 8,02% Trouvé N 7,7%

L-leucyl-D-phénylalananyl-L-prolinate de méthyle. On dissout 1,664 g de CBO-L-leucyl-D-phénylalananyl-L-prolinate de méthyle (3,2) dans 8,7 cm³ d'acide acétique glacial, ajoute 4 cm³ d'une solution 3,2-n. de HI dans de l'acide acétique glacial et laisse reposer le mélange 1 h.³⁾ Après évaporation du solvant sous vide à 35°, on ajoute 10 cm³ d'eau et 3,8 cm³ de HCl n. et l'on extrait à l'éther. La solution aqueuse est décolorée par quelques gouttes d'une solution saturée de thiosulfate de sodium. La solution aqueuse est chauffée à 40° et additionnée de carbonate d'argent jusqu'à ce que le dégagement de CO₂ ait cessé et que la solution ne bleuisse plus le papier au rouge Congo. On acidule avec env. 7,5 cm³ de HCl n. et laisse reposer la nuit. La réaction doit rester faiblement acide. On filtre et évapore la solution à sec dans le vide (30—40°). Le résidu est traité 2 fois avec HCl méthanolique n., en évaporant chaque fois à sec sans élever la température au-dessus de 40°.

¹⁾ Am. Soc. **72**, 1862 (1950).

²⁾ Biochem. J. **46**, 196 (1950).

³⁾ La scission des groupes CBO des peptides, effectuée par *E. Waldschmidt-Leitz & K. Kühn* (B **84**, 381 (1951)) par l'acide iodhydrique dans l'acide acétique glacial à ébullition, peut, selon *R. A. Boissonnas & G. Preitner* (à publier), se faire également à température ordinaire par l'acide iodhydrique, ou mieux encore, par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique glacial, sans que les liaisons peptidiques ou esters soient scindées.

On sèche encore au vide poussé. Le produit, qui est extrêmement hygroscopique, se solidifie. On obtient 903 mg de chlorhydrate de L-leucyl-D-phénylalanyl-L-prolinate de méthyle (66,7%). *Harris & Work* ont préparé le même produit en scindant le groupe CBO par hydrogénation catalytique¹).

Par chromatographie sur papier dans divers mélanges, on obtient un seul spot, ce qui montre l'absence de scission par l'acide iodhydrique de liaisons peptidiques.

Phtalyl-L-valyl-δ-CBO-L-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-prolinate de méthyle. A une solution de 1,04 g (2,1) de phtalyl-L-valyl-δ-CBO-L-ornithine dans 1 cm³ de tétrahydrofuranne et 0,5 cm³ de tri-n-butylamine, refroidie à 0°, on ajoute 0,3 cm³ (2,1) de chloroformiate de sec-butyle. Après 10 min., on verse sous agitation une solution de 895 mg (2,1) de chlorhydrate de L-leucyl-D-phénylalanyl-L-prolinate de méthyle et 0,7 cm³ de tri-n-butylamine dans 5 cm³ de tétrahydro-furanne. On agite 2 h. à 10° en évaporant progressivement le tétrahydro-furanne de façon à augmenter la concentration à la fin de la réaction. On reprend le résidu par 5 cm³ d'HCl n., extrait par portions avec 50 cm³ d'éther, lave la solution étherée par quelques cm³ d'hydrogéo-carbonate de sodium 0,5-m. et d'eau, sèche la solution étherée sur du sulfate de sodium anhydre et évapore l'éther au vide. On obtient 673 mg de phtalyl-L-valyl-δ-CBO-L-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-prolinate de méthyle (62,9%). Après recristallisation dans l'éther, F. 117—119° avec déc.

$C_{47}H_{58}O_{10}N_6$ (866,9) Calculé N 9,69% Trouvé N 9,63%

Phtalyl-L-valyl-δ-CBO-L-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-proline. A une solution de 433,5 mg (0,5) de phtalyl-L-valyl-δ-CBO-L-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-prolinate de méthyle dans 5 cm³ de dioxanne on ajoute 3 cm³ de NaOH n. Le trouble qui se forme disparaît rapidement. Après 3 h., on évapore le dioxanne au vide (35°) et l'on ajoute 6 cm³ de HCl 0,5-n. Le précipité formé est extrait par l'acétate d'éthyle. La couche organique est lavée à l'eau, séchée sur du sulfate de sodium anhydre et évaporée au vide. On suspend l'huile obtenue dans l'éther bouillant (5 cm³), refroidit à 0° et décante. L'huile restante se solidifie par séchage au vide poussé. On obtient ainsi 355 mg de phtalyl-L-valyl-δ-CBO-L-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-proline (83,2%). Après hydrolyse et chromatographie sur papier, à deux dimensions²) (alcool butylique tertiaire-méthanol-eau 4—4—2, puis alcool butylique tertiaire-méthanol-eau 4—5—1), on retrouve en quantités égales la valine, la leucine, la phénylalanine, la proline et l'ornithine.

$C_{46}H_{56}O_{10}N_6$ (852,9) Calculé N 9,9% Trouvé N 10,0%

L-valyl-δ-CBO-L-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-proline. On chauffe 24 h. à 100° une ampoule scellée contenant 85 mg (0,1) de phtalyl-L-valyl-δ-CBO-L-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-proline, 0,024 cm³ (0,1) de tri-n-butylamine, 0,5 cm³ d'éthanol à 96% et 0,2 cm³ (2) de phénylhydrazine. On ajoute 0,01 cm³ d'acide acétique glacial, et 1 cm³ d'eau. La couche aqueuse est extraite par le chloroforme, puis évaporée à 0,2 cm³ et additionnée de 0,5 cm³ d'acétone. On obtient 58 mg de L-valyl-δ-CBO-L-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-proline (80,5%). Un chromatogramme sur papier, à deux dimensions, dans le mélange méthyléthylcétone-pyridine-eau (60—15—25) ne donne qu'un seul spot. Par hydrolyse et chromatographie à deux dimensions comme ci-dessus, on retrouve à quantités égales la valine, la leucine, la phénylalanine, la proline et l'ornithine.

$C_{38}H_{54}O_8N_6$ (722,9) Calculé N 11,6% Trouvé N 11,2%

SUMMARY.

The synthesis of L-valyl-δ-CBO-L-ornithyl-L-leucyl-D-phénylalanyl-L-proline, which could be an intermediary product for the synthesis of Gramicidin S, has been achieved.

Laboratoires de chimie organique
de l'Université de Genève.

¹) *Biochem. J.* **46**, 196 (1950).

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