

199. Synthèse du N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle et de peptides apparentés

par **St. Guttman** et **R. A. Boissonnas**

(27 VIII 58)

La séquence 1 à 5 aminotermine des ACTH dont la structure a été déterminée jusqu'ici¹⁾ est H-Sér-Tyr-Sér-Mét-Glu. Un pentapeptide ayant cette séquence a été isolé par **WHITE & LANDMANN**²⁾ après attaque pepsique prolongée de l'ACTH de porc et sa structure a été prouvée par synthèse par **HOFMANN** et coll.³⁾ 4). Dans une communication préliminaire précédente⁵⁾, nous avons brièvement rapporté la synthèse d'un pentapeptide protégé représentant cette séquence: le N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle et avons utilisé ce pentapeptide protégé pour la synthèse d'un eicosapeptide du type de l'ACTH.

HARRIS & LERNER⁶⁾ ont montré que l' α -MSH de porc est un tridécapptide qui possède la même séquence que les 13 premiers acides aminés de la chaîne des ACTH, avec en outre un groupe N-acétyle en position N-terminale et une fonction amide en position C-terminale (schéma 1).

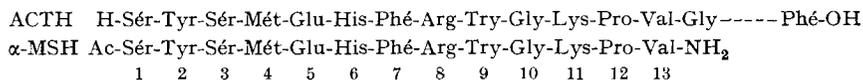


Schéma 1

Nous décrivons dans le présent travail la synthèse d'un N-acétyl-pentapeptide, le N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle, qui représente le début de la chaîne de l' α -MSH de porc, avec en outre un reste benzyle estérifiant la fonction γ -carboxylique du reste d'acide glutamique. La condensation du groupe α -carboxylique libre du reste glutamique de ce

¹⁾ ACTH de porc: P. H. BELL et coll., J. Amer. chem. Soc. **76**, 5565 (1954); **77**, 3419 (1955); **78**, 5051, 5059, 5067 (1956); W. F. WHITE et coll., *ibid.* **75**, 503 (1953); **76**, 4193 (1954); **77**, 771, 1711 (1955). ACTH de mouton: C. H. LI et coll. Nature **173**, 251 (1954); J. Amer. chem. Soc. **76**, 3607 (1954); Nature **176**, 687 (1955). ACTH de bœuf: C. H. LI et coll., J. Amer. chem. Soc. **80**, 2587 (1958).

²⁾ W. F. WHITE & W. A. LANDMANN, J. Amer. chem. Soc. **77**, 771 (1955).

³⁾ K. HOFMANN & A. JÖHL, J. Amer. chem. Soc. **77**, 2914 (1955).

⁴⁾ K. HOFMANN, A. JÖHL, A. E. FURLENMEYER & H. KAPPELER, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1636 (1957).

⁵⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, J.-P. WALLER & P.-A. JAQUENOUD, Experientia **12**, 446 (1956).

⁶⁾ J. I. HARRIS & A. B. LERNER, Nature **179**, 1346 (1957).

N-acétyl-pentapeptide avec l'octapeptide décrit dans le travail suivant⁷⁾ sera rapportée dans un troisième travail⁸⁾.

Le schéma de synthèse que nous avons employé est basé sur celui que nous avons suivi précédemment pour la synthèse de la séquence 1 à 20 de la chaîne de l'ACTH⁵⁾ et est résumé dans le schéma 2. Les variantes que nous avons également utilisées sont données au-dessus du schéma principal, tandis que les synthèses de deux CBO-peptides apparentés sont indiquées dans le schéma 3⁹⁾.

A) Séquence Sér-Tyr-Sér

Le tripeptide N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (X) a été préparé par plusieurs chemins en formant en premier lieu, soit la séquence Sér-Tyr, soit la séquence Tyr-Sér, et en utilisant, soit la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide¹⁰⁾, soit la méthode classique à l'azide. Les caractéristiques des produits que nous avons obtenus par ces différentes méthodes sont identiques.

L'étude du comportement envers l'alcali des esters des peptides contenant de la sérine a montré qu'alors que le N-CBO-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (VI) était saponifié rapidement et en bon rendement en N-CBO-L-tyrosyl-L-sérine (VII), la saponification du N-CBO-L-séryl-L-tyrosinate de méthyle (III) était beaucoup plus lente et toujours accompagnée de réactions secondaires importantes conduisant entre autres à la rupture de la liaison peptidique¹¹⁾. De même le tripeptide N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (X) ne peut être saponifié sans être partiellement décomposé. Ces faits sont à rapprocher de l'observation¹⁾ que le traitement des ACTH par l'alcali détruit l'activité ACTH et fait apparaître une activité MSH. Par contre l'action de l'hydrate d'hydrazine ne provoque pas de destruction notable et la transformation des esters susmentionnés en hydrazides correspondants se fait avec de bons rendements.

Le N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (XIV) a été préparé par acétylation, soit à l'aide d'acide thioacétique, soit à l'acide acétique en présence de dicyclohexylcarbodiimide, du L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (XIII) obtenu par scission du groupe CBO- du N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (X). En effet la condensation de la N-acétyl-L-sérine avec le L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (IX) aurait risqué de provoquer une racémisation¹²⁾ de la sérine en position 1.

⁷⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, R. L. HUGUENIN, P.-A. JAQUENOUD & ED. SANDRIN, *Helv.* **41**, 1867 (1958).

⁸⁾ Cf. aussi R. A. BOISSONNAS & ST. GUTTMANN, IV^e Congrès de Biochimie, Vienne, 1-6 sept. 1958, Résumé des communications, section I.

⁹⁾ Plusieurs peptides utilisés dans cette synthèse ont été décrits sommairement dans notre travail précédent dans le domaine de l'ACTH⁶⁾. Deux d'entre eux (V et X) ont été obtenus entre temps par HOFMANN et coll.⁴⁾ par d'autres méthodes.

¹⁰⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955). Lors des synthèses à la dicyclohexylcarbodiimide, la N-CBO-L-sérine se transforme partiellement en acylurée correspondante si l'on ne travaille pas en présence d'acétonitrile. Ce dernier accélère en effet fortement la formation de la liaison peptidique.

¹¹⁾ Cf. J. I. HARRIS & J. S. FRUTON, *J. biol. Chemistry* **191**, 143 (1951).

¹²⁾ M. B. NORTH & G. T. YOUNG, *Chemistry & Ind.* **1955**, 1597; G. T. YOUNG, M. B. NORTH & N. A. SMART, Résumé des communications du XVI^e Congrès international de chimie pure et appliquée, Paris 1957, tome II (chimie organique), p. 238.

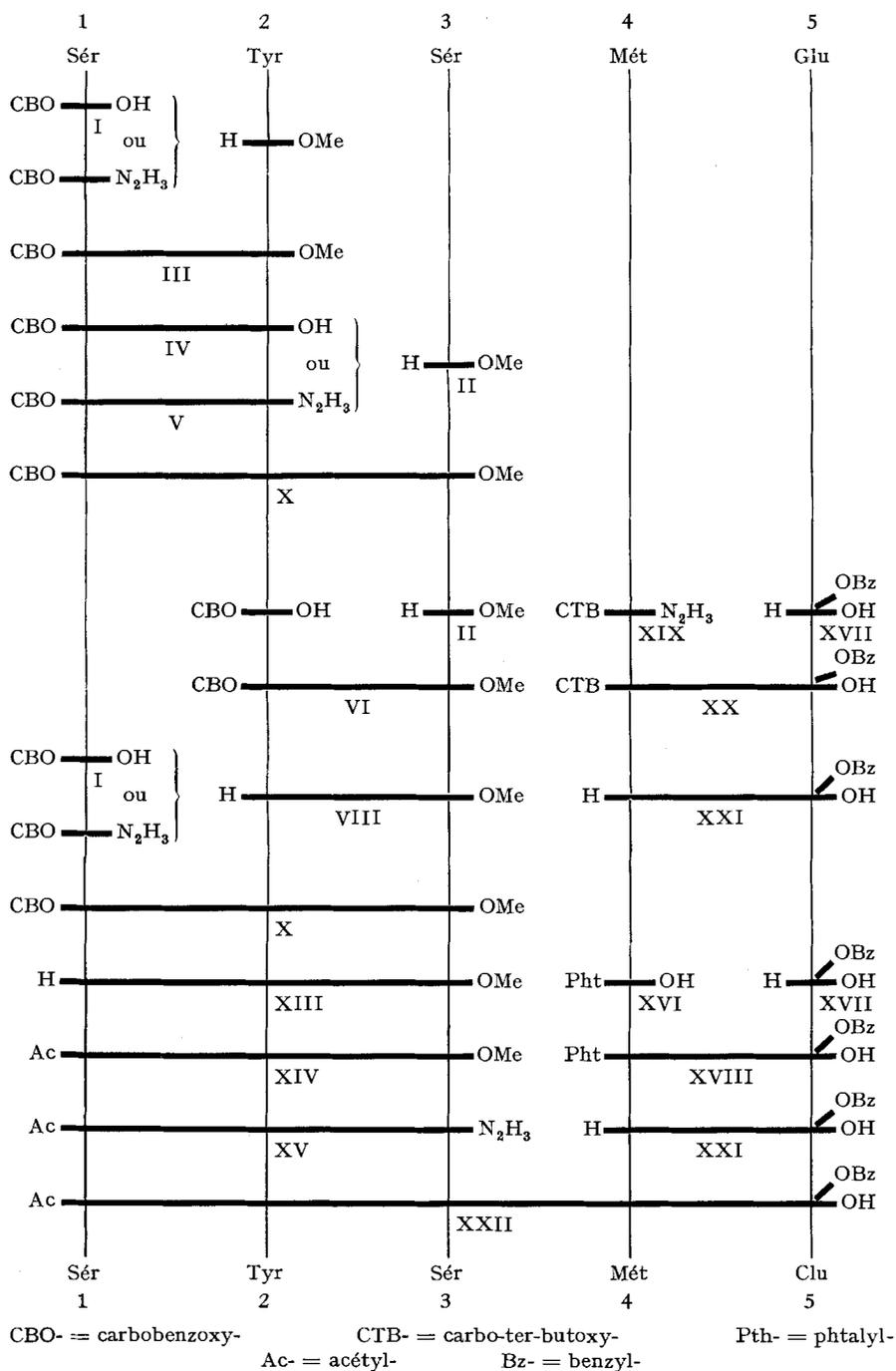


Schéma 2

Nous avons pu montrer que le traitement de la N-CBO-L-séryl-L-tyrosine (IV) et de la N-CBO-L-tyrosyl-L-sérine (VII) par une solution de HBr dans l'acide acétique anhydre provoque non seulement la scission du groupe CBO- mais encore une acétylation presque totale de l'hydroxyle de la sérine (prouvée par dosage d'acétyle). Par contre l'hydroxyle phénolique de la tyrosine n'est pas acétylé (spectre UV. inchangé). Si la solution de HBr dans l'acide acétique est additionnée de 30% d'eau, il se produit une scission du groupe CBO- également, mais cette fois sans acétylation simultanée de l'hydroxyle de la sérine, et l'on obtient les mêmes produits que ceux qui résultent de la scission du groupe CBO- par hydrogénéolyse catalytique. D'autre part nous avons pu montrer par chromatographie sur papier qu'à un pH supérieur à 7 l'O-acétyl-L-séryl-L-tyrosine donnait lieu à une transacétylation de l'hydroxyle à l' amino terminal¹³⁾.

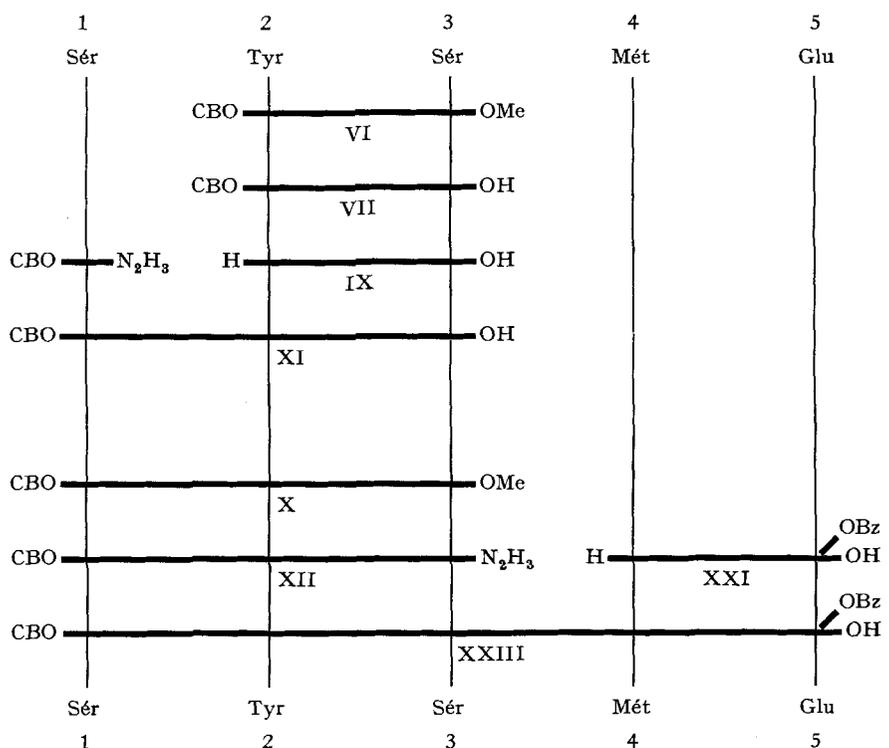


Schéma 3

¹³⁾ Des transacylations O → N et N → O ont été récemment observées par L. JOSEFSON & P. EDMAN (Biochem. & Biophysica Acta 25, 614 (1957)). Mais en soumettant le N-CBO-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle aux conditions de transacylation N → O employées par ces auteurs (solution dans l'acide formique à 20°) nous n'avons pas obtenu, même après quatre jours, de réaction positive à la ninhydrine, qui aurait dénoté la formation de O-(N-CBO-L-tyrosyl)-L-sérinate de méthyle.

Par contre, dans les mêmes conditions, la L-tyrosyl-O-acétyl-L-sérine ne donne pas lieu à une transacétylation de l'hydroxyle de la sérine sur l' amino de la tyrosine. Il semble donc qu'il faille que le groupe amino soit en position voisine de l'hydroxyle pour que la transacétylation ait lieu. Nous avons fait les mêmes observations avec tous les peptides de la sérine que nous avons préparés, ainsi qu'avec la sérine elle-même et ses dérivés.

B) Séquence Glu-Mét

Nous avons préparé le γ -L-glutamate de benzyle (XVII) par estérification partielle de l'acide glutamique par l'alcool benzylique en présence d'acide sulfurique. Cette méthode donne un bien meilleur rendement et fournit un produit plus stable que les méthodes employées jusqu'ici¹⁴).

Le méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle (XXI) a été préparé par condensation de l'anhydride mixte¹⁵) de la N-phtalyl-L-méthionine (XVI) avec le γ -L-glutamate de benzyle (XVII), et scission du groupe phtalyle en présence d'un équivalent d'hydrazine¹⁶), ou bien par condensation du CTB-L-méthionyl-azide (XIXa) avec le γ -L-glutamate de benzyle (VII), et scission du groupe CTB- par du HCl en solution éthérée¹⁷), ce dernier réactif ne scindant pas le groupe benzyle de la fonction γ -ester.

Au cours de la préparation de peptides de la méthionine, nous avons remarqué que le traitement par du HBr dans l'acide acétique de la N-CBO-L-méthionine, de N-CBO-peptides contenant de la méthionine en position N-terminale ou non N-terminale, d'esters benzyliques de peptides contenant de la méthionine ou de N-CBO-acides aminés ou peptides en présence de méthionine, conduit à l'addition du bromure de benzyle, formé au cours de la scission, sur le groupe thio-éther de la méthionine¹⁸). Cette réaction secondaire gênante a pu être éliminée presque totalement par addition de 30% de méthyl-éthyl-sulfure, ou mieux de diéthylphosphite, au HBr dans l'acide acétique. La scission du groupe CBO- de peptides de la méthionine par hydrogénolyse catalytique a conduit à une désulfurisation partielle de la méthionine¹⁹).

¹⁴) W. E. HANBY, S. G. WALEY & J. WATSON, J. chem. Soc. **1950**, 3239; E. R. BLOUT & R. H. KARLSON, J. Amer. chem. Soc. **78**, 944 (1956).

¹⁵) R. A. BOISSONNAS, Helv. **34**, 874 (1951); TH. WIELAND & H. BERNHARD, Liebigs Ann. Chem. **572**, 190 (1951); J. R. VAUGHAN & R. L. OSATO, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3547, 5553 (1951); **74**, 676 (1952).

¹⁶) J. C. SHEEHAN & W. L. RICHARDSON, J. Amer. chem. Soc. **76**, 6329 (1954).

¹⁷) F. C. MCKAY & N. F. ALBERTSON, J. Amer. chem. Soc. **79**, 4686 (1957); G. W. ANDERSON & ANNE C. MCGREGOR, *ibid.* **79**, 6180 (1957).

¹⁸) Une réaction semblable, conduisant à la formation de benzylhomocystéine, a été également observée par N. F. ALBERTSON & MCKAY (J. Amer. chem. Soc. **75**, 5323 (1953)) lors du traitement de la N-CBO-DL-méthionyl-glycine par du HBr dans le nitrométhane et lors du traitement de la N-CBO-DL-méthionine par du HCl dans l'acide acétique, ainsi que par C. DEKKER & J. FRUTON (J. biol. Chemistry **173**, 471 (1948)) lors de l'hydrolyse par HCl 6-n. à 100° du N-CBO-L-méthionyl-anilide.

¹⁹) Cette méthode a cependant été employée par HOFMANN et coll.⁴) sur la N-CBO-L-séryl-L-méthionine.

C) Séquence Sér-Tyr-Sér-Mét-Glu

Le pentapeptide N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle (XXII) a été obtenu par condensation du N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-azide (XVa) avec le L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle (XXI).

Par la même méthode, nous avons préparé, à partir du N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-azide (XIIa), le N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle (XXIII), qui, après scission des groupes CBO- et γ -benzyle par du HBr dans l'acide acétique en présence de méthyl-éthyl-sulfure et d'eau ou par du HBr dans le diéthylphosphite, nous a donné l'acide L-séryl-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl-L-glutamique²⁰⁾. Nous avons pu entièrement scinder ce dernier par la leucine-aminopeptidase²¹⁾ ²²⁾ en les acides aminés composants. De même l'attaque, par le même enzyme, du L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-hydrazide obtenu par hydrogénation catalytique du N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-hydrazide (XII) a conduit à une transformation quantitative en les acides aminés correspondants. Nous pouvons donc admettre qu'il n'y a pas eu de racémisation lors de la formation des N-CBO-peptides. Les N-acétyl-peptides ayant été préparés d'une manière analogue aux N-CBO-peptides examinés, nous pouvons également les considérer comme optiquement purs.

Partie expérimentale²³⁾

Les *F*. ont été déterminés sur banc KOFLER et corrigés (précision $\pm 2^\circ$). Les *séchages au vide* ont été conduits sous 10^{-2} à 10^{-3} Torr (16 h à 60° pour les analyses). Les *évaporations sous vide* ont été effectuées dans l'évaporateur rotatif de CRAIG²⁴⁾.

Les *chromatographies sur papier* ont été faites par la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040 b lavé»: Rf_M dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:20); Rf_A dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/eau (35:35:30); Rf_B dans le mélange sec-butanol/NH₄OH 1,5-n. (75:25); Rf^a après scission préliminaire de 1 h à 20° dans une solution 20% de HBr dans l'acide acétique glacial; Rf^b après scission préliminaire de 10 min à 100° dans l'acide acétique glacial; Rf^c après scission préliminaire de 10 min à 100° par l'acide acétique glacial contenant un équivalent de HCl; Rf^d après scission par hydrogénation catalytique; Rf^e après scission de 1 h à 20° par une solution saturée de HCl dans l'éther; Rf^o sans scission préalable.

Les *électrophorèses sur papier* ont été faites dans l'appareil à électrophorèse sous haute tension et sous refroidissement de WIELAND & PFLEIDERER²⁵⁾ dans les mélanges suivants (en volume): acide formique/acide acétique/eau (15:10:75 pour pH 1,9), pyridine/acide acétique/eau (1:9:90 pour pH 3,2; 5:5:90 pour pH 4,5; 8:2:90 pour pH 5,3; 9:1:90 pour

²⁰⁾ Ce pentapeptide libre avait déjà été synthétisé par HOFMANN et coll.³⁾ ⁴⁾ par une autre méthode. Ces auteurs avaient montré qu'il était identique au pentapeptide obtenu par scission enzymatique de la molécule d'ACTH entre les positions 5 et 6³⁾.

²¹⁾ D. H. SPACKMANN, E. L. SMITH & D. M. BROWN, J. biol. Chemistry **212**, 255 (1955).

²²⁾ K. HOFMANN, M. E. WOOLNER, G. SPÜHLER & E. T. SCHWARTZ, J. Amer. chem. Soc. **80**, 1486 (1958).

²³⁾ Les *microanalyses* ont été effectuées dans notre Laboratoire microanalytique (Dr W. SCHÖNIGER). Les *spectres UV*. ont été pris dans notre Laboratoire spectroanalytique (Dr H. G. LEEEMANN).

²⁴⁾ L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, Anal. Chemistry **22**, 1462 (1950).

²⁵⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, Angew. Chem. **67**, 257 (1955).

pH 5,8) et triéthylamine/eau/CO₂ (5:95: saturation pour pH 7,0). E_{1,9} = 0,8 His, indique qu'à pH 1,9 la substance migre 0,8 fois la distance que migre l'histidine. Les exposants ont les mêmes significations que pour les chromatogrammes.

Les *réactifs de révélation* suivants ont été vaporisés sur les chromatogrammes et les phérogrammes. Solution 0,4% de *ninhydrine* dans le mélange sec-butanol/acide acétique/eau (89:1:10) (après chauffage de 5 min à 100°, fixation au nitrate de cuivre alcoolique²⁶⁾). Solution 0,4% d'*isatine* dans le mélange sec-butanol/acide acétique glacial (96:4) (chauffage de 5 min à 100°). Réactif tyrosine-tryptophane de FOLIN-CIICALTEU²⁷⁾ dilué par un volume d'eau (exposition ultérieure à des vapeurs de NH₃ sans séchage préalable). Réactif histidine de PAULY préparé à partir de sulfanilamide²⁸⁾. Réactif à l'*acide iodoplantinique*²⁹⁾.

Les *hydrolyses* ont été faites en tube scellé pendant 20 h à 110° dans HCl 6-n. bidistillé. Le mélange d'acides aminés de référence est soumis aux mêmes conditions d'hydrolyse.

Les *attaques à la leucine-aminopeptidase*²¹⁾ ont été conduites selon HOFMANN et coll.²²⁾; on a prélevé en outre des prises au cours du temps de façon à pouvoir suivre la cinétique de l'attaque enzymatique et à mettre en évidence d'éventuels peptides résiduels.

Les *déterminations quantitatives d'acides aminés* ont été effectuées par la méthode colorimétrique à la ninhydrine de BOISSONNAS³⁰⁾ après séparation par électrophorèse sur papier et par chromatographie

A) Séquence Sér-Tyr-Sér

N-CBO-L-Sérine (I). A une solution de 10,5 g (100 mmoles) de L-sérine dans 400 ml de NaHCO₃ 1-m., on ajoute à 20° sous très forte agitation 24,0 g (140 mmoles) de chloroformiate de benzyle. Après 4 h d'agitation, on extrait deux fois par l'éther, refroidit la solution aqueuse à 0° et acidifie par HCl conc. sous forte agitation. Après filtration, lavage à l'eau et séchage, on obtient une première fraction de 10,5 g de N-CBO-L-sérine de F. 119,5°. Les filtrats réunis sont extraits trois fois par de l'acétate d'éthyle. Après séchage de celui-ci sur Na₂SO₄ et évaporation, on obtient une masse cristalline, qui après trituration dans l'éther donne encore 11,0 g de N-CBO-L-sérine de même F. que la première fraction, soit un total de 21,5 g (90%)³¹⁾. $[\alpha]_D^{22} = +5,9^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,7; ac. acétique) (*idem* litt.³¹⁾); $+3,0^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,7; méthanol); $-1,5^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,7; diméthylformamide). Insoluble dans l'éther de pétrole. Peu soluble dans l'éther et l'eau. Soluble dans l'acétate d'éthyle, les alcools et le diméthylformamide.

C₁₁H₁₃O₅N (239,2) Calculé N 5,8% Trouvé N 5,8%

L-Sérinate de méthyle, HCl (II). Dans 100 ml de méthanol absolu refroidi à -10°, on introduit sous agitation 26 ml de chlorure de thionyle purifié, en l'espace de 10 min, puis 10,5 g (100 mmoles) de L-sérine. On agite à température ordinaire jusqu'à dissolution complète, laisse reposer 24 h, évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 50 ml de méthanol anhydre, ajoute 250 ml d'éther sec et filtre des cristaux qui se forment. Après séchage au vide, on obtient 15,5 g (99%) de L-sérinate de méthyle de F. 168° (litt.³²⁾ 167°). $[\alpha]_D^{23} =$

²⁶⁾ TH. WIELAND & E. KAWERAU, *Nature* **168**, 77 (1951).

²⁷⁾ O. FOLIN & V. CIICALTEU, *J. biol. Chemistry* **73**, 629 (1927).

²⁸⁾ R. BLOCK, E. L. DURRUM & G. ZWEIG, *Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, p. 95 (Academic Press, New York 1955).

²⁹⁾ G. TOENNIES & J. J. KOLB, *Anal. Chemistry* **23**, 823 (1951).

³⁰⁾ R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **33**, 1980 (1950); cf. aussi R. A. BOISSONNAS & G. PREITNER, *Helv.* **36**, 875 (1953).

³¹⁾ J. S. FRUTON, *J. biol. Chemistry* **146**, 463 (1942). Réaction en présence de NaOH. Rendement env. 70%. - J. A. MOORE, J. R. DICE, E. D. NICOLAIDES, R. D. WESTLAND & E. L. WITTLE, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 2884 (1954). Réaction en présence de NaOH. Rendement 78% en produit brut. - E. BAER & J. MAURUKAS, *J. biol. Chemistry* **212**, 25 (1955). Réaction en présence de MgO. Rendement 72%.

³²⁾ E. FISCHER, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **39**, 2949 (1906). Synthèse par barbotage de HCl dans la solution méthanolique.

$-2,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,8$; diméthylformamide); $+3,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$; eau); $+5,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,8$; méthanol). $Rf_M^0 = 0,52$. Soluble dans l'eau, les alcools, le chloroforme et le diméthylformamide. Peu soluble dans l'acétate d'éthyle. Insoluble dans l'éther.

$C_4H_{10}O_3NCl$ (155,6) Calculé Cl 22,8% Trouvé Cl 22,8%

N-CBO-L-Séryl-L-tyrosinate de méthyle (III). – a) *Par la méthode à la dicyclohexyl-carbodiimide.* A une solution de 2,39 g (10 mmoles) de N-CBO-L-sérine (I) et de 2,34 g (12 mmoles) de L-tyrosinate de méthyle³³) dans un mélange de 25 ml d'acétonitrile et de 25 ml de dioxanne, on ajoute 2,5 g (12 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide, agite 1 j à 20°, filtre, évapore le filtrat au vide, triture plusieurs fois avec de l'éther de pétrole, dissout le résidu huileux dans 50 ml d'acétate d'éthyle, lave par HCl 1-n., NH_4OH 1-n. et eau, sèche sur Na_2SO_4 et évapore au vide. Par reprise dans 10 ml d'acétate d'éthyle chaud, repos de 3 h à 0°, filtration, lavage et séchage au vide, on obtient 1,23 g de dipeptide de F. 116°. Par concentration du filtrat à 4 ml et adjonction de 25 ml d'éther de pétrole, filtration et séchage au vide, on obtient encore 1,58 g de F. 115°, soit un total de 2,81 g (68%) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosinate de méthyle de F. 115–116° (litt. ³⁴) 112–113°. $[\alpha]_D^{21} = +13,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$; diméthylformamide); $+3,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,9$; méthanol). $Rf_M^a = 0,95$ (révélation par ninhydrine et FOLIN). Spectre UV.: λ_{max} 280 m μ ($\log \epsilon = 3,33$), 286 m μ ($\log \epsilon = 3,25$) dans diméthylformamide-tributylamine (97:3). Soluble dans les solvants organiques sauf l'éther de pétrole.

$C_{21}H_{24}O_7N_2$ Calculé C 60,6 H 5,8 O 26,9 N 6,7%
(416,4) Trouvé „ 61,2 „ 5,9 „ 26,8 „ 6,7%

b) *Par la méthode à l'azide.* A une solution de 19,5 g (100 mmoles) de L-tyrosinate de méthyle³³) dans 100 ml de diméthylformamide et 200 ml de dioxanne, on ajoute une solution de N-CBO-L-sérylazide dans 200 ml d'acétate d'éthyle, préparée à partir de 12,7 g (50 mmoles) de N-CBO-L-sérylhydrazide³⁵). Le mélange est concentré au vide au quart du volume et laissé 2 j à 0°. Après évaporation au vide, reprise par l'acétate d'éthyle, lavage par HCl 1-n., $NaHCO_3$ 1-m., séchage sur Na_2SO_4 et évaporation au vide, on recristallise dans le mélange acétate d'éthyle-éther de pétrole et obtient 16,7 g (80% calculé à partir du N-CBO-L-sérylhydrazide) de F. 113° (litt. ³⁴) 112–113° semblable au produit décrit ci-dessus.

N-CBO-L-Séryl-L-tyrosine (IV). La saponification du N-CBO-L-séryl-L-tyrosinate de méthyle (III), effectuée dans différentes conditions de durée, de température, de solvant et de concentration en alcali, conduit avec des rendements n'excédant jamais 50% à la N-CBO-L-séryl-L-tyrosine, obtenue précédemment par FISCHER & WHETSTONE³⁴) ainsi que par HOFMANN et coll.⁴) par saponification du N-CBO-L-séryl-L-tyrosinate d'éthyle, avec des rendements de l'ordre de 50% également. (L'examen des liqueurs-mères de la saponification montre la présence de sérine, ce qui traduit une destruction de la chaîne peptidique.) Après scission du groupe CBO par une solution d'HBr dans l'acide acétique anhydre le Rf_M est de 0,52. Si l'acide acétique contient 30% d'eau ou si le groupe CBO est enlevé par hydrogénation catalytique le Rf_M est de 0,30³⁶) (révélation par ninhydrine ou FOLIN).

N-CBO-L-Séryl-L-tyrosyl-hydrazide (V). On dissout par léger chauffage 8,32 g (20 mmoles) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosinate de méthyle (III) dans 50 ml de méthanol, ajoute 2,0 ml (40 mmoles) d'hydrate d'hydrazine et laisse 36 h à 0°. Le précipité qui s'est formé est filtré, lavé par 50 ml de méthanol, 50 ml de méthanol-éther 1:1 et 150 ml d'éther, puis séché au vide. On obtient ainsi 6,9 g (83%) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-hydrazide de F. 200° (inst.) et F. 234° après préchauffage de 20 sec à 190° (litt. ⁴) 213–214°. $[\alpha]_D^{21} = 0,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 1,0$. Spectre UV.: λ_{max} 280 m μ ($\log \epsilon = 3,35$), 286 m μ ($\log \epsilon = 3,27$) dans diméthylformamide-tributylamine (97:3). Peu soluble dans les

³³) E. FISCHER, Ber. deutsch. chem. Ges. **41**, 855, note 2 (1908).

³⁴) R. F. FISCHER & R. R. WHETSTONE, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5076 (1954). L'ester éthylique décrit par K. HOFMANN et coll. (*ibid.* **79**, 1636 (1957)) est une huile.

³⁵) J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **146**, 463 (1942).

³⁶) Voir partie théorique.

solvants organiques sauf le diméthylformamide. Très soluble dans l'acide chlorhydrique dilué et concentré.

$C_{20}H_{24}O_6N_4$ (416,42)	Calculé C 57,7 H 5,8 O 23,1 N 13,5%
	Trouvé ,, 57,6 ,, 5,8 ,, 23,4 ,, 13,0%

N-CBO-L-Tyrosyl-L-sérinate de méthyle (VI). A une solution de 78,8 g (250 mmoles) de N-CBO-L-tyrosine³⁷, de 38,8 g (250 mmoles) de chlorhydrate de L-sérinate de méthyle (II) et de 35,0 ml (250 mmoles) de triéthylamine dans 1200 ml d'acétonitrile, on ajoute sous refroidissement 61,8 g (300 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide. Un précipité d'urée se forme immédiatement. Après 1 j d'agitation à 20°, on filtre et lave avec un peu d'acétonitrile l'urée qui s'est formée (53,3 g), évapore le filtrat au vide, triture le résidu avec de l'éther de pétrole pour éloigner l'excès de dicyclohexyl-carbodiimide, et dissout le produit obtenu dans 1500 ml d'acétate d'éthyle en présence de 500 ml d'eau. La couche organique est lavée trois fois par HCl 1-n., deux fois par NH₄OH 1-n. et encore une fois par HCl 0,1-n. Après séchage sur Na₂SO₄ et concentration à 200 ml, on cristallise par adjonction de 300 ml d'éther. Après 12 h à 0°, filtration et lavage à l'éther, on obtient 83,2 g (81%) de N-CBO-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle de F. 152°. $[\alpha]_D^{23} = -3,1^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,2; méthanol); $-3,5^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,9; diméthylformamide). $Rf_M^a = 1,0$ (révélation par ninhydrine ou FOLIN). Spectre UV.: $\lambda_{max} = 281 m\mu$ (log $\epsilon = 3,31$), $286 m\mu$ (log $\epsilon = 3,23$) dans diméthylformamide-tributylamine (97:3). Soluble dans les solvants organiques sauf éther et éther de pétrole.

$C_{21}H_{24}O_7N_2$ (416,4)	Calculé C 60,6 H 5,8 N 6,7%
	Trouvé ,, 59,8 ,, 5,8 ,, 6,9%

N-CBO-L-Tyrosyl-L-sérine (VII). Une solution de 4,16 g (10 mmoles) de N-CBO-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (VI) dans 40 ml d'acétate d'éthyle est agitée fortement 15 min avec 40 ml de NaOH 1-n. On sépare la phase aqueuse et lave l'acétate d'éthyle par 10 ml d'eau. Les solutions aqueuses réunies sont refroidies à 0° et acidifiées par adjonction de 12 ml de HCl 4-n. Après repos de 12 h à 0°, filtration et séchage au vide, on obtient 3,37 g (84%) de N-CBO-L-tyrosyl-L-sérine sous forme d'aiguilles de F. 148°. $[\alpha]_D^{20} = 0,0^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 1,8; diméthylformamide); $+8,1^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 1,8; éthanol absolu). $Rf_M^a = 0,55$. $Rf_M^d = 0,35$. Spectre UV.: $\lambda_{max} = 281 m\mu$ (log $\epsilon = 3,35$), $286 m\mu$ (log $\epsilon = 3,29$) dans diméthylformamide-tributylamine (97:3).

$C_{20}H_{22}O_7N_2$ (402,4)	Calculé C 59,7 H 5,5 O 27,8 N 7,0% p. équiv. 402
	Trouvé ,, 59,6 ,, 5,7 ,, 27,6 ,, 7,0% ,, 400

L-Tyrosyl-L-sérinate de méthyle, HCl (VIII). Une suspension de 6,5 g d'oxyde de palladium sur du sulfate de baryum³⁸ dans 200 ml de méthanol est hydrogénée pendant 30 min, puis additionnée d'une solution de 12,5 g (30 mmoles) de N-CBO-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (VI) dans 200 ml de méthanol contenant 2,18 g (60 mmoles) de HCl. Après 10 min d'hydrogénation l'absorption d'hydrogène est presque totale. Après 4 h d'hydrogénation, 650 ml (29 mmoles) d'hydrogène ont été consommés et la solution est filtrée sur hyflosupercel et évaporée au vide. Après reprise dans 150 ml d'eau, filtration d'un résidu insoluble, évaporation au vide et plusieurs dissolutions dans l'éthanol absolu, suivies d'évaporation au vide, on triture le résidu solide obtenu avec de l'éther sec, filtre et sèche au vide. On obtient ainsi 9,15 g (95%) de chlorhydrate de L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle de F. 130–135° (déc.). $[\alpha]_D^{22} = +12,2^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,0; méthanol); $-9,0^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,0; diméthylformamide). $Rf_M^o = 1,0$ (révélation par FOLIN ou ninhydrine). Soluble dans l'eau, les alcools et le diméthylformamide.

$C_{13}H_{19}O_5N_2Cl$ (318,8)	Calculé C 49,0 H 6,0 O 25,1 N 8,8 Cl 11,1%
	Trouvé ,, 49,6 ,, 6,2 ,, 24,7 ,, 8,9 ,, 11,3%

³⁷) M. BERGMANN & L. ZERVAS, Ber. deutsch. chem. Ges. **65**, 1199 (1932).

³⁸) R. KUHN & H. J. HAAS, Angew. Chem. **67**, 785 (1955).

L-Tyrosyl-L-sérine (IX). On hydrogène une suspension de 1 g d'oxyde de palladium dans 25 ml de méthanol, ajoute une solution de 3,00 g (7,5 mmoles) de CBO-L-tyrosyl-L-sérine (VII) dans un mélange de 50 ml de méthanol, 50 ml d'eau et 10 ml d'acide acétique, et hydrogène pendant 6 h. La consommation d'hydrogène est de 172 ml (7,6 mmoles). Après filtration et évaporation à sec, le produit est recristallisé de 10 ml d'eau bouillante par addition de 50 ml d'éthanol absolu. Après filtration, lavage à l'éthanol et à l'éther, et séchage au vide, on obtient 1,80 g (90%) de L-tyrosyl-L-sérine de F. 260° (déc.). $[\alpha]_D^{22} = +24,2^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 1,6; HCl 1-n.). $Rf_M^0 = 0,33$. Spectre UV.: $\lambda_{\max} = 281 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,35$), $286 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,28$) dans diméthylformamide-tributylamine (97:3). Insoluble dans les solvants organiques anhydres, peu soluble dans l'eau froide, soluble dans les acides et les bases dilués.

$C_{12}H_{16}O_5N_2$	Calculé C 53,7	H 6,0	O 29,8	N 10,5%
(268,3)	Trouvé ,, 54,4	,, 6,2	,, 29,9	,, 10,1%

N-CBO-L-Séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (X). – a) *A partir du N-CBO-L-sérylazide*. On dissout 11,2 g (35 mmoles) de chlorhydrate de L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (VIII) dans 100 ml de diméthylformamide contenant 5,6 ml (40 mmoles) de triéthylamine, agite 30 min et filtre du chlorhydrate de triéthylamine formé. Au filtrat on ajoute une solution de N-CBO-L-sérylazide dans l'acétate d'éthyle, préparée à partir de 8,9 g (35 mmoles) de N-CBO-L-sérylhazide selon FRUTON⁸⁵). L'acétate d'éthyle est éloigné au vide et après 2 j à 20°, on évapore la solution à sec, dissout le résidu dans 250 ml de n-butanol, lave par HCl 1-n., NH_4OH 1-n., et NaCl 30% et évapore à sec. Le résidu solide est repris dans 150 ml d'acétate d'éthyle bouillant. Après 12 h à 0°, on filtre, lave, sèche et obtient ainsi 12,8 g (72%) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle de F. 189–191° (litt. ⁴) 191–192°. $[\alpha]_D^{19} = -7,5^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,6; diméthylformamide); $-22,4^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,5; méthanol); $-8,3^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,4; acide acétique); $-3,4^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,5; pyridine) (litt. ⁴) $-3,9^\circ$ (c = 1,77; pyridine). $Rf_M^a = 0,9$ (révélation par ninhydrine et FOLIN). Spectre UV.: $\lambda_{\max} = 281 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,34$), $286 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,28$) dans diméthylformamide-tributylamine (97:3). Soluble dans le diméthylformamide, les alcools et la pyridine. Insoluble dans l'éther et l'éther de pétrole. Peu soluble dans les autres solvants organiques.

$C_{24}H_{29}O_9N_3$	Calculé C 57,3	H 5,8	O 28,6	N 8,3%
(503,5)	Trouvé ,, 57,2	,, 5,8	,, 28,4	,, 8,1%

b) *A partir de la N-CBO-L-sérine*. A une solution de 720 mg (3 mmoles) de N-CBO-L-sérine (I), de 1112 mg (3,5 mmoles) de chlorhydrate de L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (VIII) et de 0,49 ml de triéthylamine (3,5 mmoles) dans 20 ml d'acétonitrile et 4 ml de chlorure de méthylène, on ajoute 820 mg (4 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite pendant 12 h. La dicyclohexylurée formée précipite rapidement ainsi qu'une partie du tripeptide formé. On évapore à sec, triture plusieurs fois dans l'éther de pétrole, dissout dans 30 ml de n-butanol, lave par HCl 1-n., NH_4OH 1-n. et NaCl 30%, concentre à environ 8 ml, refroidit à 0° et filtre de la dicyclohexylurée. On évapore le filtrat à sec, reprend par 10 ml de diméthylformamide, garde 12 h à 0° et filtre d'une deuxième fraction d'urée. Le filtrat est évaporé à sec, et le résidu, repris dans 10 ml de dioxanne chaud. Par adjonction d'éther de pétrole, 843 mg (56%) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle de F. 168° cristallisent. Après une recristallisation dans l'acétate d'éthyle, le produit fond à 187° et ses caractéristiques sont semblables à celle du tripeptide obtenu selon a). $[\alpha]_D^{19} = -22,6^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,5; méthanol). Trouvé N 8,2%.

c) *A partir de la N-CBO-L-séryl-L-tyrosine*. A une solution de 186 mg (1,2 mmole) de chlorhydrate de sérinate de méthyle (II) et de 0,17 ml (1,2 mmole) de triéthylamine dans 2 ml de chloroforme et 10 ml d'acétonitrile, on ajoute 402 mg (1,0 mmole) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosine (IV). A la solution obtenue, on ajoute encore 270 mg (1,3 mmole) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite le tout pendant 24 h. Le tripeptide et la dicyclohexylurée précipitent ensemble. Après purification comme sous b), et recristallisation dans 1 ml d'acétate d'éthyle chaud, on obtient 393 mg (78%) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle de F. 190–191°. $[\alpha]_D^{19} = -23,1^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,0; méthanol). Trouvé N 8,2%.

d) *A partir du N-CBO-L-séryl-L-tyrosylazide*. En suivant la méthode décrite par HORMANN et coll.⁴⁾ nous avons obtenu avec un rendement de 50% du N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle identique à tous points de vue aux produits obtenus par les trois méthodes ci-dessus. $F. 189-191^{\circ}$. $[\alpha]_{D}^{19} = -22,0^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 2,0$; méthanol).

N-CBO-L-Séryl-L-tyrosyl-L-sérine (XI). A une solution de 1,34 g (5,0 mmoles) de L-tyrosyl-L-sérine (IX) dans 10 ml de diméthylformamide contenant 1,4 ml (10 mmoles) de triéthylamine et 0,5 ml d'eau, on ajoute une solution de N-CBO-L-sérylazide dans l'acétate d'éthyle préparée selon FRUTON⁸⁵⁾ à partir de 1,78 g (7,0 mmoles) de N-CBO-L-sérylhydrazide. Après éloignement au vide de l'acétate d'éthyle, la solution est maintenue 3 j à 0°, puis évaporée à sec au vide. On reprend le résidu par 30 ml de NH_4OH 1-n. et extrait le trouble par de l'acétate d'éthyle. Par acidification de la couche aqueuse par HCl 4-n., le tripeptide précipite immédiatement sous une forme gélatineuse difficile à filtrer. On extrait donc par du n-butanol, lave celui-ci par de l'eau et du NaCl 30%, sèche sur Na_2SO_4 et évapore à sec. L'huile obtenue cristallise par trituration avec de l'éther. Après recristallisation d'acétate d'éthyle - méthanol on obtient 1,70 g (70%) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérine de $F. 182^{\circ}$. $[\alpha]_{D}^{20} = -10,5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,9$; méthanol); $0,0^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,9$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,58$, $Rf_M^d = 0,25$ (révélation par FOLIN ou ninhydrine). Spectre UV.: $\lambda_{max} = 281 m\mu$ ($\log \epsilon = 3,34$), $286 m\mu$ ($\log \epsilon = 3,29$) dans diméthylformamide-tributylamine (97:3). Peu soluble dans l'éther et l'acétate d'éthyle. Insoluble dans l'éther de pétrole.

$C_{23}H_{27}O_6N_3$ (489,5) Calculé N 8,6% p. équiv. 489 Trouvé N 8,6% p. équiv. 489

N-CBO-L-Séryl-L-tyrosyl-L-sérylhydrazide (XII). On dissout 25,2 g (50 mmoles) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (X) dans 300 ml de méthanol contenant 10 ml (200 mmoles) d'hydrate d'hydrazine. Après quelques heures à 20° l'hydrazide commence déjà à cristalliser. Après 3 j à 20° et 6 h à 0°, on filtre, lave par 100 ml de méthanol, 100 ml de méthanol-éther 1:1 et 300 ml d'éther, sèche au vide sur P_2O_5 et obtient 21,8 g (87%) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérylhydrazide de $F. 210^{\circ}$ instantané et $F. 234^{\circ}$ après préchauffage (litt. ⁴⁾ $210-213^{\circ}$). $[\alpha]_{D}^{23} = -4,2^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,9$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,95$ (révélation par ninhydrine ou FOLIN). Spectre UV.: $\lambda_{max} = 280 m\mu$ ($\log \epsilon = 3,36$), $286 m\mu$ ($\log \epsilon = 3,30$) dans diméthylformamide-tributylamine 97:3. Peu soluble dans les solvants organiques sauf le diméthylformamide. Assez soluble dans les alcools ou le dioxanne lorsqu'ils contiennent 20 à 60% d'eau.

$C_{23}H_{29}O_8N_5$ Calculé C 54,9 H 5,8 O 25,4 N 13,9% p. équiv. 503
(503,5) Trouvé ,, 54,9 ,, 6,5 ,, 26,0 ,, 13,9% ,, 480

On obtient le même hydrazide avec les mêmes caractéristiques physiques que ci-dessus en traitant de manière identique des tripeptides-esters partiellement acétylés sur la sérine, le traitement à l'hydrazine provoquant une désacétylation.

Après scission du groupe CBO-, le tripeptide-hydrazide obtenu est entièrement scindé par la leucine-aminopeptidase²¹⁾²²⁾ en les acides aminés composants.

L-Séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle, HCl (XIII). On hydrogène 2,5 g de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN⁸⁶⁾ en suspension dans 25 ml de méthanol pendant 30 min, puis, une fois que le catalyseur est devenu noir, introduit 2,5 g (5,0 mmoles) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (X) dissous dans 25 ml de méthanol et 2,0 ml de méthanol 2,6-n. en HCl et poursuit l'hydrogénation pendant 4 h. A ce moment la quantité d'hydrogène absorbé est de 110 ml (5,0 mmoles). On filtre, évapore à sec au vide et triture le résidu solide obtenu, avec de l'éther sec. Pour éloigner de petites quantités de sels de baryum, on dissout le produit obtenu dans 5 ml d'eau, extrait par cinq fois 5 ml de n-butanol, contre-extrait le n-butanol par une fois 5 ml d'eau, extrait celle-ci par cinq fois 5 ml de n-butanol, et évapore à sec les solutions butanoliques réunies (50 ml). Le résidu solide obtenu est trituré dans l'éther sec. Après filtration, lavage et séchage, on obtient 1,42 g (70%) de L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle de $F. 135^{\circ}$ (déc.). $[\alpha]_{D}^{20} = +8,6^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 2,2$; eau); $+10,2^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 2,6$; méthanol); $0,0^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 2,6$; diméthylformamide). $Rf_M^o = 0,95$. Spectre UV.: $\lambda_{max} = 280 m\mu$ ($\log \epsilon = 3,35$), $285 m\mu$ ($\log \epsilon = 3,28$) dans

diméthylformamide-tributylamine (97:3). Soluble dans l'eau, les alcools et le diméthylformamide. Insoluble dans les autres solvants organiques ordinaires.

$C_{18}H_{24}O_7N_3Cl$ (405,8)	Calculé C 47,4 Trouvé „ 47,1	H 6,0 „ 6,1	O 27,6 „ 27,4	N 10,4 „ 10,5	Cl 8,7% „ 8,7%
-----------------------------------	---------------------------------	----------------	------------------	------------------	-------------------

N-Acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (XIV). On ajoute 12,2 g (30 mmoles) de chlorhydrate de L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (XIII) à une solution de 4,2 ml (30 mmoles) de triéthylamine dans 200 ml de chlorure de méthylène, et agite fortement jusqu'à dissolution totale. On refroidit à 0° et ajoute 3,8 g (50 mmoles) d'acide thioacétique. On garde la solution homogène obtenue pendant 2 j à 20°. Il se produit pendant ce temps un dégagement d'acide sulfhydrique et la formation d'un précipité. Celui-ci est filtré, lavé par du chlorure de méthylène, un peu de méthanol et de l'eau. On obtient ainsi 7,03 g de tripeptide acétylé de F. 214°. Le filtrat est lavé deux fois par NaHCO₃ 1-m., trois fois par de l'eau, deux fois par HCl 1-n. et une fois par NaHCO₃ 1-m. On ajoute 30 ml d'éthanol (afin d'éviter la cristallisation du produit dans le solvant sec), sèche sur Na₂SO₄ et évapore à sec au vide. Le solide résultant est trituré avec de l'éther puis avec de l'éther de pétrole. Après filtration, lavage à l'éther et séchage, on obtient 3,79 g de N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle de F. 214° également, soit un total de 10,82 g (87%). $E_{0,8}^{0,8} = 1,0$ Mét. Le produit est négatif à la ninhydrine et positif au FOLIN. Il est chromatographiquement homogène. $[\alpha]_D^{21} = -28,2 \pm 0,5$ (c = 3,0; diméthylformamide). Spectre UV.: $\lambda_{max} = 280 m\mu$ (log $\epsilon = 3,32$), $285 m\mu$ (log $\epsilon = 3,25$). Légèrement soluble dans les solvants organiques. Soluble dans le diméthylformamide.

$C_{18}H_{25}O_3N_3$ (411,4)	Calculé C 52,6 Trouvé „ 52,6	H 6,1 „ 6,2	O 31,1 „ 30,5	N 10,2% „ 10,0%
---------------------------------	---------------------------------	----------------	------------------	--------------------

Le même produit est obtenu à l'état un peu moins pur avec un rendement de 75% à partir d'un mélange de L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (base libre!), d'acide acétique et de dicyclohexyl-carbodiimide. F. 190°. $[\alpha]_D^{21} = -28,0 \pm 0,5$ (c = 1,8; diméthylformamide); $-21,7 \pm 0,5$ (c = 2,7; méthanol). La moins grande pureté se traduit par une plus grande solubilité dans les solvants organiques, notamment le méthanol.

N-Acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérylhydrazide (XV). On dissout 8,0 g (19,4 mmoles) de N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (XIV) dans 700 ml de méthanol en chauffant 15 min à reflux. On ajoute 7 ml (140 mmoles) d'hydrate d'hydrazine et l'on refroidit rapidement à 20°. L'hydrazide commence à cristalliser après quelques heures. Après 36 h à 20°, on concentre le mélange à un volume de 200 ml environ et laisse 16 h à 0°. Par filtration, lavage par 100 ml de méthanol, 100 ml de méthanol-éther 1:1 et 300 ml d'éther et séchage au vide on obtient 5,97 g (75%) de N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérylhydrazide de F. 232° instantané et F. 250° par préchauffage. $[\alpha]_D^{23} = -38,5 \pm 1,0$ (c = 1,7; HCl 1-n.); $-13,1 \pm 0,5$ (c = 2,0; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 1,0$, révélation par FOLIN. Spectre UV.: $\lambda_{max} = 280 m\mu$ (log $\epsilon = 3,35$), $286 m\mu$ (log $\epsilon = 3,27$) dans diméthylformamide-tributylamine (97:3). Peu soluble dans l'eau et les solvants organiques, très soluble dans HCl 1-n.

$C_{17}H_{25}O_7N_5$ (411,4)	Calculé C 49,6 Trouvé „ 48,6	H 6,1 „ 6,2	O 27,2 „ 27,5	N 17,0% „ 17,0%
---------------------------------	---------------------------------	----------------	------------------	--------------------

B) Séquence Glu-Mét

N-Phtalyl-L-méthionine (XVI). Un mélange intime finement pulvérisé de 10,0 g (67 mmoles) de L-méthionine et de 9,6 g (65 mmoles) d'anhydride phtalique est agité doucement en récipient ouvert dans un bain d'huile chauffé à 180–185°. Lorsque la température intérieure atteint 130°, la masse devient fluide. On laisse encore 10 min dans le bain, refroidit à 80° et dissout dans 250 ml de méthanol. Après adjonction sous très forte agitation de 750 ml d'eau, filtration, lavage et séchage des cristaux qui se forment, on obtient 16,6 g (92%) de N-phtalyl-L-méthionine de F. 124°. $[\alpha]_D^{23} = -75,5 \pm 0,5$ (c = 4,7; diméthylformamide); $-47,5 \pm 0,5$ (c = 5,2; méthanol). Soluble dans les solvants

organiques sauf l'éther de pétrole. Insoluble dans l'eau. Réaction positive au chloro-platinate-iodure³⁹⁾.

$C_{13}H_{13}O_4NS$ (279,3)	Calculé C 55,9	H 4,7	O 22,9	N 5,0	S 11,5%	p. équiv. 279
	Trouvé ,, 56,1	,, 5,0	,, 22,8	,, 5,1	,, 11,6%	,, 280

γ -L-Glutamate de benzyle (XVII). A 500 ml d'éther ordinaire, on ajoute 50 ml d'acide sulfurique à 98% puis 500 ml d'alcool benzylique exempt d'aldéhyde⁴⁰⁾, évapore l'éther au vide et dissout par petites portions 73,5 g (500 mmoles) d'acide L-glutamique. La solution obtenue est gardée 20 h à 20°, additionnée de 1000 ml d'éthanol 96% et, sous forte agitation, de 250 ml de pyridine. La cristallisation commence immédiatement. Après 10 h à 0°, on filtre, essore, lave à l'éther sec et obtient 98 g d'un produit contenant encore des traces d'acide glutamique. Par recristallisation de 950 ml d'eau bouillante contenant 10 ml de pyridine, repos de 6 h à 0°, filtration et séchage au vide à température ordinaire, on obtient 90,0 g (76%) de γ -L-glutamate de benzyle pur de F. 189° (litt. 169–170°⁴¹⁾ et 174°⁴²⁾. $[\alpha]_D^{23} = +19,6^\circ \pm 0,2^\circ$ (c = 6,0; acide acétique); + 27,7° ± 0,5° (c = 2,5; HCl 1-n.) (litt. 42) $[\alpha]_D^{25} = +19,5^\circ$ (c = 7,2; acide acétique). $Rf_M^0 = 0,47$. Très peu soluble dans les solvants organiques et l'eau froide. Modérément soluble dans l'eau bouillante. Stable plus d'un an à température ordinaire⁴³⁾.

$C_{12}H_{18}O_4N$ (237,3)	Calculé C 60,8	H 6,4	O 27,0	N 5,9%
	Trouvé ,, 61,1	,, 5,9	,, 26,8	,, 6,0%

N-Carbo-t-butoxy-L-méthionylhydrazide (XIX). Dans une suspension de 30,0 g (150 mmoles) de chlorhydrate de L-méthionate de méthyle⁴⁴⁾ dans 500 ml de toluène à ébullition on fait barboter un courant de phosgène jusqu'à ce que tout le chlorhydrate ait passé en solution. Après encore 30 min de chauffage à reflux, la solution est évaporée à sec sous vide. Les 28,8 g d'huile obtenus sont dissous dans 60 ml de t-butanol, chauffés à reflux pendant 30 min, gardés à 20° pendant 12 h et évaporés à sec. L'huile résultante est dissoute dans 150 ml d'éther. Après lavage à l'eau, séchage et évaporation à sec, on obtient 27,2 g (68%) de N-carbo-t-butoxy-L-méthionate de méthyle huileux qui sont directement transformés en hydrazide par dissolution dans 150 ml de méthanol et adjonction de 15 ml d'hydrate d'hydrazine. Après 3 j à 20°, on évapore à sec au vide, reprend l'huile résultante dans 500 ml de chloroforme, lave quatre fois à l'eau, sèche sur Na_2SO_4 et évapore à sec. Par trituration avec de l'éther de pétrole, on obtient rapidement des cristaux, qui, après filtration, lavage et séchage, donnent 21,1 g (53% à partir du chlorhydrate de L-méthionate de méthyle) de N-carbo-t-butoxy-L-méthionylhydrazide de F. 74°. $[\alpha]_D^{23} = -12,4^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,5; méthanol); - 4,0° ± 0,5° (c = 2,5; diméthylformamide). $Rf_M^c = 0,95$ (révélation par ninhydrine, FOLIN et iodoplatinate). Soluble dans tous les solvants organiques sauf l'éther de pétrole.

$C_{10}H_{21}O_3N_3S$ (263,4)	C 45,6	H 8,0	O 18,2	N 16,0	S 12,2%	p. équiv. 263
	,, 45,3	,, 7,8	,, 18,3	,, 16,0	,, 12,3%	,, 266

N-carbo-t-butoxy-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle (XX). A une solution de 13,2 g (50 mmoles) de N-carbo-t-butoxy-L-méthionylhydrazide (XIX) dans 90 ml de HCl 2-n. refroidie à - 5°, on ajoute 60 ml de $NaNO_2$ 1-n. également refroidis à - 5°. L'azide précipite de suite sous forme d'une huile épaisse. Après 10 min, on extrait l'azide par 200 ml d'éther, lave par du $NaHCO_3$ 1-m. et ajoute à une solution de 23,7 g (100 mmoles) de γ -L-glutamate de benzyle (XVII) et de 42 ml (300 mmoles) de triéthylamine dans 300 ml de diméthyl-

³⁹⁾ G. TOENNIES & J. KOLB, Anal. Chemistry **23**, 824 (1951).

⁴⁰⁾ J. MEISENHEIMER, Ber. deutsch. chem. Ges. **41**, 1420 (1908).

⁴¹⁾ W. E. HANBY, S. G. WALEY & J. WATSON, J. chem. Soc. **1950**, 3239 (1950).

⁴²⁾ E. R. BLOUT & R. H. KARLSON, J. Amer. chem. Soc. **78**, 944 (1956).

⁴³⁾ L'instabilité notée par BLOUT & KARLSON⁴²⁾ est probablement due au fait que le produit préparé par ces auteurs n'était pas aussi pur que le nôtre.

⁴⁴⁾ M. BRENNER & R. W. PFISTER, Helv. **34**, 2085 (1951).

formamide et 150 ml d'eau. L'éther est éloigné sous vide. Après 2 j à 20°, on neutralise par addition de 15 ml d'acide acétique, filtre du γ -L-glutamate de benzyle en excès, qui cristallise, et évapore le filtrat au vide. Le résidu est repris dans 250 ml de HCl 1-n. et le dipeptide qui se sépare sous forme huileuse est extrait par 300 ml d'acétate d'éthyle. Celui-ci est extrait à son tour par cinq fois 100 ml de NH_4OH 1-n. Après acidification au pH2 par HCl 4-n. le dipeptide qui précipite est extrait par 300 ml d'éther. L'éther est lavé par dix fois 50 ml d'eau, séché et évaporé à sec. Après séchage au vide poussé on obtient 15,2 g (65%) de N-carbo-t-butoxy-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle sous forme d'une huile non cristallisable. $[\alpha]_D^{20} = -13,3^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,0; méthanol); $-13,8^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 1,5; diméthylformamide). $Rf_M^e = 0,68$. Soluble dans tous les solvants organiques sauf l'éther de pétrole.

$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_7\text{N}_2\text{S}$	Calculé C 56,4	H 6,9	O 23,9	N 6,0	S 6,9%	p. équiv. 469
(468,6)	Trouvé ,, 56,6	,, 7,2	,, 24,2	,, 5,8	,, 7,1%	,, 472

L-Méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle (XXI). – a) *A partir de N-phtalyl-L-méthionine.* Une solution refroidie à -5° de 11,2 g (40 mmoles) de N-phtalyl-L-méthionine (XVI) et de 5,6 ml (40 mmoles) de triéthylamine dans 100 ml de tétrahydro-furanne, on ajoute goutte à goutte 3,8 ml (40 mmoles) de chloroformiate d'éthyle. Après 10 min, on introduit 14,9 g (63 mmoles) de γ -L-glutamate de benzyle (XVII) dissous dans un mélange de 100 ml de tétrahydro-furanne, 100 ml d'eau et 14 ml (100 mmoles) de triéthylamine. Après 4 h d'agitation à 20°, on ajoute 6 ml d'acide acétique, filtre et récupère ainsi 7,85 g de γ -L-glutamate de benzyle n'ayant pas réagi. Le filtrat est concentré au vide pour en éloigner le tétrahydro-furanne et le résidu est repris dans 250 ml d'acétate d'éthyle, lavé deux fois par HCl 1-n. et sept fois par l'eau. Par séchage sur Na_2SO_4 , évaporation au vide et séchage, on obtient une huile visqueuse incolore qui contient encore environ 30% de N-phtalyl-L-méthionine. Les 19 g d'huile sont dissous dans 190 ml de méthanol et additionnés de 5,0 ml d'hydrate d'hydrazine et gardés 24 h à 20°. Une partie du phtalylhydrazide cristallise déjà pendant la scission. On filtre et évapore à sec à 35° sous vide. Le résidu est repris dans un mélange de 100 ml d'acétate d'éthyle, 50 ml d'eau et 3,6 ml d'acide acétique glacial, agité 30 min puis débarrassé du reste de phtalylhydrazide par filtration. Après séparation des phases, on lave encore l'acétate d'éthyle par 5×30 ml d'eau et on réunit les couches aqueuses qui contiennent la totalité du dipeptide scindé, contaminé par un peu de méthionine. Pour le purifier, on extrait la solution aqueuse par 20×30 ml de n-butanol et on lave ce dernier par 3×30 ml d'eau. La solution butanolique qui contient le dipeptide pur est concentrée à 50 ml sous vide à 35°. Déjà par concentration le dipeptide commence à cristalliser. Après 12 h à 0°, on filtre, lave le précipité par l'éthanol absolu et sèche sous vide. Du filtrat, par évaporation à sec et trituration répétée du résidu avec de l'éthanol absolu, on obtient encore du produit aussi pur que la première fraction. On obtient ainsi au total 6,17 g (42%) de L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle de F. 182° instantané et 168° après préchauffage. $Rf_M^e = 0,65$. $E_{5,8}^o = 1,0$ Mét. $[\alpha]_D^{22} = +16,1^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 1,9; HCl 1-n.). Insoluble dans les solvants organiques, peu soluble dans l'eau froide, très soluble dans les acides et alcalis dilués.

$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$	Calculé C 55,4	H 6,6	O 21,7	N 7,6	S 8,7%
(368,4)	Trouvé ,, 55,3	,, 6,3	,, 21,7	,, 7,6	,, 9,0%

Le produit se saponifie rapidement dans NaOH 1-n. en acide L-méthionyl-L-glutamique. Un traitement de 2 h par une solution de HBr dans l'acide acétique glacial en présence de méthyl-éthyl-sulfure est nécessaire pour conduire au même produit par acidolyse totale du groupe benzyle.

On peut également purifier le L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle par chromatographie sur colonne, mais le rendement est alors inférieur. Après hydrazinolyse dans les conditions décrites ci-dessus, le produit brut est purifié par deux chromatographies successives dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:25) sur une colonne 5×50 cm de cellulose WHATMAN. On obtient ainsi 3,8 g (26% à partir de la phtalyl-L-méthionine) de L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle de F. 150–160°. $Rf_M^e = 0,65$. Trouvé N 7,3%.

b) *A partir de N-carbo-t-butoxy-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle.* On dissout 9,37 g (20 mmoles) de N-carbo-t-butoxy-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle (XX) dans 200 ml d'éther anhydre 2,2-n. en HCl. Après séjour de 30 min à 20°, évaporation à sec, dissolution dans 100 ml d'eau et extraction par deux fois 100 ml d'éther, la phase aqueuse est traitée par la résine IRA-45 (cycle acétique) et extraite par 10 \times 70 ml de n-butanol. Par évaporation à sec du n-butanol et trituration avec de l'éther sec, on obtient 4,27 g (58%) de L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle de mêmes propriétés que sous a).

C) Séquence Sér-Tyr-Sér-Mét-Glu

N-Acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle (XXII). A une solution refroidie à -5° de 1,23 g (3,0 mmoles) de N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérylhydrazide (XV) dans 15 ml de diméthylformamide et 3,0 ml de HCl 4-n. on ajoute un mélange, également refroidi à -5° , de 0,8 ml de NaNO₂ 5-n. et 15 ml de diméthylformamide. On agite fortement pendant 5 min puis neutralise l'excès de HCl par 1,26 ml (9 mmoles) de triéthylamine et on sèche rapidement sur Na₂SO₄. Cette solution est filtrée dans une solution de 1,65 g (4,5 mmoles) de L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle (XXI) dans 15 ml de diméthylformamide et 1,26 ml (9 mmoles) de triéthylamine. Le pH est de 7,5 sur papier indicateur humide. Après 60 h à 0° le pH est descendu à 6. On évapore à sec sous vide à 60° et reprend le résidu par 150 ml de méthanol 50%. Après passage sur une colonne d'IRA 120 (pour éliminer la triéthylamine et le L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle) puis sur une colonne d'IRA 45 (en cycle acétique pour enlever le HCl), on obtient un produit qui, à côté du pentapeptide désiré, contient encore 25-30% d'un produit neutre. Après un contre-courant (50 tubes, 50 transferts) dans le système n-butanol-eau, le contenu des tubes 40 à 49 est évaporé à sec, le résidu est dissous dans 3 ml de méthanol et précipité par adjonction de 20 ml d'éther. On obtient ainsi 744 mg (33%) de N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle de F. 170-172° (déc.). $Rf_M^0 = 0,95$. $E_{5,8}^0 = 0,5$ Glu; $E_{5,8}^a = 0,7$ Glu. Négatif à la ninhydrine. Positif au FOLIN-CIOCALTEU et au PAULY. $[\alpha]_D^{25} = -28,0^\circ \pm 0,5^\circ$ (c = 2,1; méthanol). Spectre UV.: $\lambda_{max} = 280$ m μ (log $\epsilon = 3,30$), 286 m μ (log $\epsilon = 3,25$) dans diméthylformamide-tributylamine (96:4). Soluble dans les alcools et le diméthylformamide. Peu soluble dans l'eau. Insoluble dans l'éther et l'éther de pétrole. L'hydrolyse acide donne de la sérine, de la tyrosine, de la méthionine et de l'acide glutamique dans le rapport 2:1:1:1⁴⁵).

$C_{34}H_{46}O_{12}N_5S$	Calculé C 54,6	H 6,1	O 25,7	N 9,4	S 4,3%
(744,8)	Trouvé ,, 53,8	,, 6,4	,, 25,8	,, 9,1	,, 4,2%

N-CBO-L-Séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle (XXIII). On dissout 2,01 g (4 mmoles) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-sérylhydrazide (XII) dans un mélange de 20 ml de diméthylformamide et de 4,0 ml de HCl 4-n., refroidit à -5° , agite fortement et ajoute un mélange de 20 ml de diméthylformamide et de 1 ml de NaNO₂ 5-n. également refroidi à 0°. Après 5 min on neutralise l'excès de HCl par 1,54 ml (11 mmoles) de triéthylamine, sèche rapidement sur Na₂SO₄ et filtre cette solution dans une solution de 2,2 g (6 mmoles) de L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle (XXI) dans 20 ml de diméthylformamide et 1,68 ml (12 mmoles) de triéthylamine. On agite bien et garde la solution ainsi obtenue 36 h à 0°. On évapore à sec et reprend le résidu dans 30 ml de NH₄OH 0,5-n. Tout se dissout d'abord, puis brusquement la cristallisation commence. Après quelques minutes, on obtient une masse épaisse difficile à filtrer. On centrifuge rapidement pour éviter une saponification. Le solide est le sel d'ammonium du pentapeptide et le liquide surnageant contient les impuretés avec encore un peu de pentapeptide. On dissout le solide dans 500 ml de méthanol et fait passer cette solution sur une colonne d'IRA-120 puis sur une colonne d'IRA-45 (cycle acétique). On évapore à sec, dissout le résidu dans 10 ml de méthanol bouillant, concentre à 5 ml et ajoute 50 ml d'éther. Par filtration on obtient 1,69 g (51%) de N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle de F. 170°. Pour l'analyse on recrystallise encore deux fois dans méthanol-acétate d'éthyle et obtient un F. de 173°. $Rf_M^a = 0,6$; $Rf_A^a = 0,5$; $Rf_B^a = 0,1$. $E_{5,8}^0 = 0,7$ Glu; $E_{5,8}^a = 0,7$ Glu (scissions par

HBr dans l'acide acétique en présence de méthyl-éthyl-sulfure et d'eau, ou par HBr dans le diéthylphosphite). $[\alpha]_D^{23} = -23^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol), $-10^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,4$; diméthylformamide). Spectre UV.: $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,35$), $286 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,29$) dans diméthylformamide-tributylamine (96:4). Soluble dans les alcools et le diméthylformamide, peu soluble dans l'acétate d'éthyle et l'eau, insoluble dans l'éther. L'hydrolyse acide donne de la sérine, de la tyrosine, de la méthionine et de l'acide glutamique dans le rapport 2:1:1:1⁴⁵).

$\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{O}_{13}\text{N}_5\text{S}$ (839,9)	Calculé C 57,2	H 5,9	O 24,8	N 8,3	S 3,8%
	Trouvé ,, 56,3	,, 5,9	,, 24,8	,, 8,4	,, 3,8%

Après scission des groupes protecteurs, le peptide obtenu est entièrement scindé par la leucine-aminopeptidase²¹⁾ 22).

SUMMARY

N-CBO-L-Seryl-L-tyrosyl-L-serine methyl ester and L-methionyl- γ -benzyl-L-glutamate are prepared by different methods. Condensation by the hydrazide-azide procedure affords N-CBO-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionyl- γ -benzyl-L-glutamate, which is shown to be optically pure by leucine-aminopeptidase digestion. Transformation of the above N-CBO-tripeptide ester to the N-acetyl-tripeptide ester and condensation by the hydrazide-azide procedure with the above dipeptide gives N-acetyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionyl- γ -benzyl-L-glutamate. The effects produced in the course of fission of CBO- and benzyl-groups from peptides containing serine and methionine residues, using HBr and acetic acid, are studied.

Laboratoires de Chimie Pharmaceutique SANDOZ
(Dir.: Dr J. RENZ), Bâle

⁴⁵) Une partie de la méthionine apparaît sous forme de benzylhomocystéine (cf. 18)).

200. Synthèse de la L-histidyl-L-phénylalanyl-L-arginyl-L-tryptophanyl-glycyl- ϵ -CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valylamide

par R. A. Boissonnas, St. Guttmann, R. L. Huguenin,
P.-A. Jaquenoud et Ed. Sandrin

(27 VIII 58)

La séquence His-Phé-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val se retrouve en position 6 à 13 dans l' α -MSH de porc¹⁾ et dans toutes les différentes ACTH dont la structure a été établie jusqu'ici²⁾.

1) J. I. HARRIS & A. B. LERNER, Nature **179**, 1346 (1957).

2) Voir référence 1) du travail précédent: Helv. **41**, 1852 (1958).