

sind wohlbekannt¹⁸⁾. Bei der Gleichstromverstärker-Messung wird die Gitter- und damit Kollektorspannung wegen der negativen Rückkopplung im wesentlichen konstant gehalten, so dass kein Unterschied zwischen den beiden Messreihen existieren sollte.

Unser genauestes Resultat sei mit demjenigen NIER¹⁹⁾ verglichen:

$$\begin{array}{ll} {}^{87}\text{Rb}/{}^{86}\text{Rb} = 0,3860 \pm 0,0009 & \text{diese Arbeit} \\ & 0,3860 \pm 0,0005 \quad \text{NIER} \end{array}$$

d. h. das Gerät arbeitet innerhalb der Messgenauigkeit diskriminationsfrei. Dieser Befund wird durch die beiden Resultate mit Gleichstromverstärker, einer unabhängigen Elektronik, bestätigt.

Beim Bau dieses Instrumentes durfte ich die Hilfe und Mitarbeit vieler Stellen erhalten, denen ich bestens danken möchte:

der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung des Bundesamtes für Industrie, Gewerbe und Arbeit* für die Finanzierung (Gesuch von Herrn Prof. K. CLUSIUS und dem Autor);

Herrn Prof. Dr. K. CLUSIUS für den Laborraum und sein unermüdliches Interesse;

Herrn HANSJÜRGEN SCHÄRER, der den grössten Teil des mechanischen Aufbaus und fast die gesamte Elektronik hergestellt und geprüft hat;

Herrn Prof. Dr. M. G. INGRAM, Chicago, für Einsicht in Detailzeichnungen eines 12"-Massenspektrometers und dafür, dass er mich in viele Einzelheiten der Massenspektrometrie eingeführt hat;

den Herren Dr. P. DE HALLER, Dr. P. SULZER und Ing. KÜNZLI, GEBR. SULZER AG., Winterthur, für die Bearbeitung des Magneten, Überlassung des Antikorodal-Gestells und Herstellung der Bieg- und Presslehren für das Analysatorrohr;

der Firma ESCHER-WYSS AG., besonders Herrn Oberingenieur STAUFFER, für die geschenkwertige Ausführung eines grossen Teiles der Argonarc-Schweissungen;

den Herren E. SPALINGER, P. PEIKER, U. UTZINGER und J. WELKER für Mitarbeit bei verschiedenen Stadien des Aufbaus.

Chemisches Institut der Universität Zürich

¹⁸⁾ E. W. BECKER, E. DÖRNENBURG & W. WALCHER, *Z. angew. Physik* **2**, 261 (1950); M. G. INGRAM & R. J. HAYDEN, *loc. cit.*¹⁾, p. 39.

¹⁹⁾ A. O. NIER, *Physic. Rev.* **77**, 789 (1950); **79**, 450 (1950).

133. Synthèse de l' α -Mélanotropine (α -MSH) de Porc¹⁾

par St. Guttman et R. A. Boissonnas

(24 IV 59)

Il a été montré récemment par HARRIS & LERNER²⁾ et par HARRIS³⁾⁴⁾ que l' α -MSH (*melanocyte-stimulating hormone*), qui semble être la principale hormone de l'hypophyse de Porc provoquant l'étalement des mélanocytes⁵⁾⁶⁾, est un tridé-

¹⁾ Une communication préliminaire sur cette synthèse a été donnée au IV^e Congrès de Biochimie (Vienne, 1–6 sept. 1958). cf. R. A. BOISSONNAS & ST. GUTTMANN, *Résumés des communications*, Section 1, Nr. 3.

²⁾ J. I. HARRIS & A. B. LERNER, *Nature* **179**, 1346 (1957).

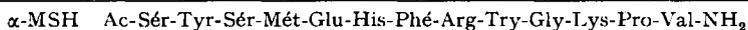
³⁾ J. I. HARRIS, *Symposium on Protein Structure*, Methuen & Co., Ltd., London, pp. 333–337 (1958).

⁴⁾ J. I. HARRIS, *Biochem. J.* **71**, 451 (1959).

⁵⁾ A. B. LERNER & T. H. LEE, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1066 (1955).

⁶⁾ Pour une revue de la littérature sur ce sujet voir l'article de C. H. LI dans *Advances in Protein Chemistry* **12**, 269 (1957).

capeptide possédant la séquence des 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).



Schéma

Nous décrivons dans le présent travail la vérification par synthèse de cette structure.

Par la méthode à la dicyclohexyl-carbodiimide⁷⁾ nous avons condensé le N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -L-glutamate de benzyle⁸⁾ avec le L-histidyl-L-phénylalaninyl-L-argininyl-L-tryptophanyl-glycyl- ϵ -N-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valylamide⁹⁾ en N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -O-benzyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-phénylalaninyl-L-argininyl-L-tryptophanyl-glycyl- ϵ -N-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valylamide, dont la pureté a été mise en évidence par l'obtention d'un composant unique à la chromatographie, à l'électrophorèse et au contre-courant. L'examen du spectre UV. et des produits d'hydrolyse acide a donné le rapport attendu des acides aminés composants.

Ce tridécapeptide protégé ne se distingue de l' α -MSH que par la présence d'un groupe ester benzylique sur la fonction γ -carboxylique de l'acide glutamique en position 5 et d'un groupe carbobenzoxy- sur la fonction ϵ -amino de la lysine en position 11. Il possède un peu moins du millième de l'activité mélanostimulante¹⁰⁾ que l'on obtient après scission des groupes protecteurs. Cette faible activité n'est pas augmentée après un séjour de deux heures à température ambiante dans la soude caustique diluée¹¹⁾.

La scission des deux groupes protecteurs de la molécule par hydrogénation catalytique ou par le sodium dans l'ammoniac liquide n'est pas réalisable sans destruction partielle de la méthionine en position 4. Nous avons donc étudié la scission de ces groupes protecteurs par l'acide bromhydrique dans différentes conditions dont les principales sont indiquées dans le tableau. L'absence de toute trace de brome dans l'acide bromhydrique utilisé est indispensable pour éviter la destruction du trypto-

⁷⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

⁸⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, Helv. **41**, 1852 (1958).

⁹⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, R. L. HUGUENIN, P.-A. JAQUENOUD & ED. SANDRIN, Helv. **41**, 1867 (1958).

¹⁰⁾ Les dosages d'activité biologique ont été effectués par le P. D. Dr E. FLÜCKIGER de notre Département pharmacologique (Dir.: Dr A. CERLETTI) selon la méthode *in vivo* de LANDGREBE & WARING (Hormone Assay, Academic Press, p. 141 (1950)) et selon la méthode *in vitro* de SHIZUME, LERNER & FITZPATRICK (Endocrinology **54**, 553 (1954)). Les deux méthodes ont donné des résultats concordants. L'unité d'activité que nous avons employée est celle définie par LANDREBE & WARING, c'est-à-dire l'activité mélanostimulante de 0,5 mg de poudre hypophysaire ayant la même activité oxytocique, vasopressique et antidiurctique que le standard international de poudre d'hypophyse postérieure. Selon LI⁶⁾ 1 unité de LANDGREBE & WARING correspond à 10⁴ unités définies selon SHIZUME, LERNER & FITZPATRICK. La limite d'erreur de nos dosages biologiques est de $\pm 25\%$.

¹¹⁾ Dans une communication préliminaire récente, HOFMANN et coll. (J. Amer. chem. Soc. **80**, 6458 (1958)) indiquent qu'ils ont préparé un N-CHO-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl-L-glutaminy-L-histidyl-L-phénylalaninyl-L-argininyl-L-tryptophanyl-glycyl- ϵ -N-tosyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valylamide qui ne possède qu'un centième de l'activité de l' α -MSH de porc.

phane. En outre la présence de diéthylphosphite permet de fixer toute trace de brome qui pourrait se former dans le mélange de scission.

Essais préliminaires de scission des groupes protecteurs
Pour chaque essai on a utilisé 1,0 mg de tridécapptide protégé

| N° | Solvant | Conditions de scission | Activité en U/mg |
|----|--|--|------------------|
| 1 | 0,3 ml diéthylphosphite | courant de HBr de 120 min à -5° | 200 |
| 2 | 0,3 ml diéthylphosphite | courant de HBr de 60 min à -5° repos de 120 min à 20° | 200 |
| 3 | 0,3 ml diéthylphosphite 0,06 ml méthyléthylsulfure | courant de HBr de 120 min à -5° | 200 |
| 4 | 0,3 ml acide acétique 0,1 ml diéthylphosphite | courant de HBr de 60 min à -5° repos de 120 min à 20° | 600 |
| 5 | 0,3 ml acide acétique 0,1 ml diéthylphosphite 0,1 ml eau | courant de HBr de 60 min à -5° repos de 120 min à 20° | 300 |
| 6 | 1,0 ml ac. trifluoroacétique 0,25 ml diéthylphosphite | courant de HBr de 60 min à -5° repos de 120 min à 20° | 850 |
| 7 | 1,0 ml ac. trifluoroacétique 0,25 ml diéthylphosphite 0,25 ml méthyléthylsulfure | courant de HBr de 20 min à -5° repos de 120 min à 20° | 1300 |
| 8 | <i>idem</i> | courant de HBr de 20 min à -5° repos de 360 min à 20° | 1200 |
| 9 | <i>idem</i> | courant de HBr de 60 min à -5° repos de 120 min à 20° | 1250 |
| 10 | <i>idem</i> | courant de HBr de 120 min à -5° | 1200 |
| 11 | <i>idem</i> | courant de HBr de 360 min à -5° | 1200 |
| 12 | <i>idem</i> | courant de HBr de 60 min à 0° | 850 |
| 13 | <i>idem</i> | courant de HBr de 60 min à 20° | 350 |

L'emploi de diéthylphosphite seul comme solvant¹²⁾ n'a conduit qu'à une activité restreinte (tableau, essais 1 et 2), due, comme une étude sur des substances modèles l'a montré, à une scission incomplète du groupe O-benzyle estérifiant la fonction γ -carboxylique de l'acide glutamique. La prolongation du temps de scission ou l'élévation de la température n'ont pas amélioré le résultat.

En présence d'acide acétique la scission est plus complète. Par contre des études sur des substances de référence⁸⁾ ont montré que dans ces conditions les hydroxyles de la sérine en position 1 et 3 s'acétylent partiellement. L'addition d'un peu d'eau diminue l'acétylation mais provoque par contre une destruction partielle de la molécule, visible au contre-courant.

Une étude sur divers peptides de la sérine⁸⁾ nous a montré que l'emploi d'acide trifluoroacétique à la place d'acide acétique comme solvant ne conduit pas à une acylation des groupes hydroxyle de la sérine. Par contre, alors que le diéthylphosphite seul ou en présence d'acide acétique fixe le bromure de benzyle formé au cours de la scission et l'empêche de former un dérivé sulfonium avec la méthionine en position 4⁸⁾,

¹²⁾ G. W. ANDERSON & A. C. MCGREGOR, J. Amer. chem. Soc. **79**, 6180 (1957).

il n'empêche plus cette réaction secondaire de se produire lorsque l'on travaille dans l'acide trifluoroacétique. La formation de dérivé sulfonium n'est alors empêchée que par addition de sulfure de méthyl-éthyle au mélange de scission⁸⁾13).

Les scissions des groupes protecteurs du tridécapeptide donnant les meilleurs rendements en activité ont été obtenues en conduisant un courant de gaz bromhydrique sec et pur, à -5° et à l'obscurité, dans une solution de ce tridécapeptide dans un mélange d'acide trifluoroacétique, de diéthylphosphite et de sulfure de méthyl-éthyle (tableau, essais 7 à 11). La prolongation du temps de scission ou l'élévation postérieure de la température à 20° ne modifient pas d'une manière appréciable les activités obtenues. Par contre, si la scission est conduite dès le début à 20° ou même à 0° , l'activité obtenue est plus basse (essais 12 et 13).

Nous avons répété, sur 385 mg de tridécapeptide protégé, la scission au gaz bromhydrique dans un mélange d'acide trifluoroacétique, de diéthylphosphite et de sulfure de méthyl-éthyle et avons obtenu un total de 775000 U, ce qui correspond à 2000 U par mg de produit de départ. Après un contre-courant de 400 transferts dans le système *sec*-butanol/acide trichloracétique aqueux 0,5%, le produit brut de scission s'est séparé en un sommet mineur inactif de $K = 5,7$ et en un sommet principal actif de $K = 1,9$. Les tubes centraux du sommet actif ont donné, après élimination de l'acide trichloracétique par passage sur résine, 192 mg d'un produit isolable sous forme de poudre blanche et contenant 2100 U/mg. Une partie de ce produit a été soumise à un contre-courant supplémentaire dans le même système. La courbe de répartition obtenue¹⁴⁾ coïncide exactement avec la courbe de répartition théorique d'un produit de $K = 1,9$. Cette valeur correspond à celle que nous avons calculée à partir de la courbe donnée par LEE & LERNER¹⁵⁾ pour la répartition dans le même système de l' α -MSH de l'hypophyse de porc. Le produit obtenu après le contre-courant de 400 transferts est apparu comme homogène à la chromatographie sur papier dans trois systèmes de solvants et à l'électrophorèse sur papier à pH 1,9. Par contre l'électrophorèse sur papier à pH 5,8 a montré une seconde tache plus faible migrant plus lentement.

Nous avons alors soumis le produit résultant du contre-courant à une électrophorèse préparative sur papier à pH 5,8. L'activité du produit ainsi purifié est montée à 3300 U/mg, ce qui correspond, dans les limites d'erreur des dosages biologiques et de la conversion d'un système d'unité dans un autre, à l'activité de l' α -MSH de porc naturelle¹⁰⁾15)16).

Ce tridécapeptide purifié s'est montré homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse à pH 1,9, 5,8, 8,4, 10,2 et 11,3 après révélation au réactif de FOLIN-

¹³⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, J.-P. WALLER & P.-A. JAQUENOUD, *Experientia* **12**, 446 (1956).

¹⁴⁾ Par dosage colorimétrique selon O. H. LOWRY, N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 (1951).

¹⁵⁾ T. H. LEE & A. B. LERNER, *J. biol. Chemistry* **221**, 943 (1956).

¹⁶⁾ Le Dr A. B. LERNER a eu l'amabilité de bien vouloir tester un de nos produits bruts (tableau, essai 9), choisi pour sa stabilité et ayant dans notre laboratoire une activité de 1250 U/mg. Il a trouvé que ce produit possédait par mg la moitié de l'activité d'un α -MSH de porc récemment isolé dans son laboratoire après chromatographie sur CM-cellulose (cf. S. L. STEELMAN, R. N. ANDERSEN & R. M. MCGREGOR, *Biochim. biophys. Acta* **33**, 256 (1959)). Nous pouvons donc admettre que notre tridécapeptide purifié à 3300 U/mg est aussi actif que l' α -MSH de porc naturel.

phanyl-glycyl- ϵ -N-CBO-L-lyssyl-L-prolyl-L-valylamide (LV)⁹) dans 2,5 ml de diméthylformamide et ajoute lentement en agitant 6 ml d'acétonitrile. La solution obtenue est additionnée de 206 mg (1,00 mmole) de dicyclohexyl-carbodiimide et agitée. Au bout de 12 h il se forme un précipité abondant qui se redissout partiellement après l'adjonction de 2 ml de diméthylformamide. On agite encore 12 h à 20° puis filtre après avoir gardé la solution 30 min à -20°. Après lavage du précipité (92 mg de dicyclohexylurée) par 1 ml de diméthylformamide-acétonitrile 1:4, on évapore l'acétonitrile sous vide à 40° et précipite le peptide formé par l'adjonction de 50 ml d'éther sec. Après filtration et séchage au vide on obtient 1206 mg d'un produit pulvérulent, qui est dissous dans 10 ml de pyridine et gardé 24 h à -20°. On filtre de la solution encore 39 mg de dicyclohexylurée (total: 131 mg = 0,58 mmole) et concentre à 5 ml sous vide. Après addition de 50 ml d'éther anhydre, le précipité est lavé à l'éther et séché au vide. On obtient ainsi 1037 mg (86,6%) de chlorhydrate de N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -O-benzyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-phénylalaninyl-L-arginyl-L-tryptophanyl-glycyl- ϵ -N-CBO-L-lyssyl-L-prolyl-L-valylamide de F. 180° (déc.). $[\alpha]_{25}^D = -33^\circ \pm 3^\circ$ (c = 1,9; méthanol); $-26^\circ \pm 1^\circ$ (c = 1,6; diméthylformamide). Spectre UV.: λ_{\max} : 275 m μ (log ϵ = 3,89), 281 m μ (log ϵ = 3,90), 291 m μ (log ϵ = 3,82) dans diméthylformamide-tri-n-butylamine 97:3. Mêmes valeurs dans méthanol-eau-triéthylamine 60:15:1. (Ces valeurs correspondent exactement à celles données par un mélange équimoléculaire de tyrosine et de tryptophane.) Réaction négative à la ninhydrine. Réaction positive sur papier au réactif de FOLIN-CIOCALTEU¹⁷) (tyrosine-tryptophane), au réactif de PAULY¹⁸) (tyrosine et histidine), au réactif de SAKAGUCHI¹⁹) (arginine), à l'iodoplatinate²⁵) (méthionine), au bleu de bromophénol selon DURRUM¹⁹), et au réactif au chlore-iodure-amidon²¹). Une tache sur papier est très légèrement fluorescente après séchage. Le produit est homogène à la chromatographie ($Rf_M^I = 0,95$, $Rf_A^I = 0,95$, $Rf_P^I = 0,95$), à l'électrophorèse sur papier ($E_{1,9}^I = 0,35$ His, 0,60 Glu, 0,73 Try), et au contre-courant (K = 15) dans le système *sec*-butanol-acide trichloracétique aqueux 0,5% (50 transferts).

| | |
|--|-------------------------------------|
| $C_{92}H_{122}O_{21}N_{21}ClS$ (1925,7) | Calculé C 57,3 H 6,4 O 17,5 N 15,3% |
| | Trouvé „ 57,6 „ 6,7 „ 17,6 „ 15,2% |

L'hydrolyse acide montre le rapport attendu des acides aminés composants: Sér 2,2, Tyr 1,0, Mét 1,0, Glu 1,0, His 1,0, Phé 1,0, Arg 1,0, Gly 1,0, Lys 1,0, Val 1,1 (Try par UV. avant l'hydrolyse: 1,0). Pour éviter l'altération de la tyrosine et de la méthionine par le chlorure de benzyle qui se forme à partir des groupes protecteurs, le produit est d'abord chauffé 2 h à 100° dans HCl 6-n. bidistillé, la solution est extraite à l'éther pour éloigner le chlorure de benzyle formé, et le chauffage est poursuivi à 110° pendant 16 h. L'hydrolysate obtenu est comparé⁸⁾²⁶⁾²⁷) avec un mélange artificiel de même composition soumis aux mêmes conditions d'hydrolyse.

Le dosage de l'activité MSH de ce tridécapptide bloqué indique une activité de 25 U/mg, soit un peu moins du millième de l'activité du tridécapptide débloqué (α -MSH) purifié ci-dessous. Cette activité n'est pas modifiée par un séjour de 2 h à 20° dans NaOH 0,3-n. Par contre un chauffage de 15 min à 100° dans NaOH 0,1-n. abaisse l'activité à 7 U/mg.

Etudes préliminaires sur la scission des groupes protecteurs. La scission des groupes protecteurs a été effectuée par le gaz bromhydrique dans les différents solvants indiqués dans le tableau. Le gaz bromhydrique est préparé selon Inorganic Syntheses²⁸) et est en outre lavé par passage dans deux flacons laveurs contenant de l'acide acétique saturé de phénol, puis dans du diéthylphosphite à -10° et enfin à travers une trappe à -70°. Le récipient contenant le mélange de scission est maintenu à l'obscurité. Pour chaque essai il a été utilisé 1 mg de tridécapptide protégé ci-dessus. A la fin des temps de scission indiqués dans le tableau, les solvants volatils sont évaporés sous vide poussé à 30°, le résidu est additionné d'éther anhydre, et le précipité obtenu est lavé encore plusieurs fois à l'éther anhydre pour enlever les dernières traces de diéthylphosphite. Les activités par mg obtenues sont indiquées dans le tableau. Les chromatogrammes et phérogrammes des produits de scission montrent dans tous les cas des taches inactives mineures

²⁵) G. TOENNIES & J. J. KOLB, Anal. Chemistry **23**, 823 (1951).

²⁶) R. A. BOISSONNAS, Helv. **33**, 1980 (1950); cf. aussi R. A. BOISSONNAS & G. PREITNER, Helv. **36**, 875 (1953).

²⁷) E. G. FISCHER & H. DÖRFEL, Biochem. Z. **324**, 563 (1953).

²⁸) Inorganic Syntheses, Vol. 11, p. 338.

à côté d'une tache principale contenant l'activité. L'analyse par contre-courant dans le système *sec*-butanol-acide trichloracétique aqueux 0,5% montre après 50 transferts et colorimétrie¹⁴) deux sommets principaux: A ($K = 1,9$) et B ($K = 5,7$). L'activité se trouve dans le sommet A. Dans les essais 1 à 3 le sommet A est beaucoup moins important que B. Dans l'essai 4 le sommet A représente 40% du total. Dans les essais 7 à 13 le sommet A représente plus de 60% du total. Dans l'essai 5 un nouveau sommet ($K = 1,0$) apparaît.

Influence d'un traitement postérieur basique. Une partie du produit obtenu dans l'essai 1 est reprise par NaOH 0,8-n. et agitée à 20° pendant 20 min. L'activité tombe de 200 U/mg à 60 U/mg, mais ne baisse pas davantage si l'on prolonge le temps du traitement alcalin à 60 min. La chromatographie et l'examen à contre-courant montrent une forte altération.

α -MSH. – a) *Scission des groupes protecteurs.* A une solution refroidie à -5° de 385 mg (0,2 mmole) de N-acétyl-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -O-benzyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-phénylalaninyl-L-argininyl-L-tryptophanyl-glycyl- ϵ -N-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valylamide (LVI) dans 20 ml d'acide trifluoroacétique, on ajoute 5 ml de diéthylphosphite et 5 ml de sulfure de méthyl-éthyle. En maintenant cette solution à -5° et à l'obscurité, on y fait barboter pendant 60 min un fort courant de gaz bromhydrique pur. Le récipient est alors bouché et placé 120 min à 20° à l'obscurité également. On évapore les solvants volatils à 30° au vide poussé dans un évaporateur rotatif. Le résidu est trituré dans 200 ml d'éther sec jusqu'à pulvérisation totale. On centrifuge, décante et répète ce traitement à l'éther encore trois fois. On dissout le solide obtenu dans 60 ml d'eau, ajuste le pH à 4,0 par NaOH 4-n., et fait barboter un courant d'hydrogène pour éloigner l'éther. Cette solution montre une activité de 775000 U au total, ce qui représente 2000 U/mg de produit de départ.

b) *Purification par partage à contre-courant.* La solution ci-dessus est additionnée de 300 mg d'acide trichloracétique et équilibrée avec 60 ml de *sec*-butanol. La solution obtenue est placée dans les trois premiers tubes d'un appareil à contre-courant de 200 tubes et répartie dans le mélange *sec*-butanol-acide trichloracétique aqueux 0,5%. Après 200 transferts la courbe de répartition est déterminée par colorimétrie¹⁴). Les 100 premiers tubes, qui ne contiennent pas de substances peptidiques, sont vidés et remplis à nouveau par du solvant frais. Le tube 200 est connecté au tube 1 et la répartition est poursuivie pendant encore 200 transferts (au total 400 transferts effectués en 48 h). La courbe de répartition obtenue par colorimétrie¹⁴) montre un sommet principal de $K = 1,9$ et un sommet secondaire de $K = 5,7$. Le contenu des tubes 230 à 276 (= 30 à 76) est réuni et homogénéisé par l'addition de 200 ml de méthanol. La solution obtenue est passée sur une colonne de 400 ml d'Amberlite IRA-45 en cycle acétate. Le pH de la solution passe de 2 à 4. La solution est concentrée sur un évaporateur rotatif à 30° jusqu'à un volume de 500 ml et à 25° jusqu'à 50 ml. Le volume est complété à 125 ml par de l'eau. On prélève 25 ml que l'on lyophilise. Après séchage de 3 h au vide poussé sur P_2O_5 , on obtient 38,5 mg de poudre blanche possédant 2100 U/mg, homogène à un second partage à contre-courant dans le même système ($K = 1,9$), à la chromatographie ($Rf_M^0 = 0,2$; $Rf_A^0 = 0,4$; $Rf_P^0 = 0,3$), et à l'électrophorèse à pH 1,9. Par contre à l'électrophorèse à pH 5,8 on obtient une forte tache de $E_{5,8}^0 = 0,68$ His et une légère tache de $E_{5,8}^0 = 0,26$ His (révélation par la ninhydrine²⁰), le réactif de FOLIN-CIOCALTEU¹⁷), le réactif au chlore-iodure-amidon²¹) et le bleu de bromophénol¹⁹).

c) *Purification par électrophorèse.* On lyophilise 19,5 ml (30,0 mg) de la solution ci-dessus et redissout le résidu dans 1 ml de tampon pyridine-acide acétique-eau 9:1:90 de pH 5,8. 0,5 ml de cette solution tamponnée sont portés sur une feuille de papier MENCHERY & NAGEL N° 214 (30 × 38 cm), préalablement lavée à l'acide acétique 10%, séchée 2 h à 100° et imbibée du même tampon. Après 120 min sous 90 mA et 1400 V, des bandes latérales de 2 mm sont découpées et révélées à la ninhydrine²⁰), au chlore-iodure-amidon²¹) et au bleu de bromophénol¹⁹) de façon à permettre la localisation des taches sur le reste du papier. La tache principale de $E_{5,8}^0 = 0,68$ His est éluée par l'acide acétique 10% à 20° sans dessiccation intermédiaire du papier. L'opération est répétée avec les seconds 0,5 ml de solution tamponnée. Les éluats sont lyophilisés: 13,2 mg. Afin de ne pas maintenir le produit obtenu trop longtemps à l'état solide, on le dissout immédiatement après la pesée dans 25 ml d'eau, ajuste le pH à 3,5 et congèle à -20° . Des aliquotes sont prélevées pour les analyses ci-dessous.

L'activité biologique, déterminée 10 jours après l'isolement, est de 3300 U/mg.

La *stabilité* de ce produit purifié est limitée. En solution aqueuse à pH 3,5 à 4², l'activité passe de 3300 U/mg à 2200 U/mg après 15 j et à 1800 U/mg après 30 j. (Dans les mêmes conditions le produit de scission brut et le produit obtenu après contre-courant n'ont pas accusé de baisse d'activité après 30 j.)

A la *chromatographie sur papier* le produit est homogène au réactif de FOLIN-CIOCALTEU¹⁷⁾, au réactif de PAULY¹⁸⁾, au réactif de SAKAGUCHI¹⁹⁾, au bleu de bromophénol¹⁹⁾ et au réactif au chlore-iodure-amidon²¹⁾. $Rf_M^0 = 0,2$; $Rf_A^0 = 0,4$; $Rf_B^0 = 0,3$.

A l'électrophorèse sur papier le produit est homogène aux mêmes réactifs aux pH 1,9, 5,8, 8,4, 10,2 et 11,3. $E_{1,9}^0 = 1,1$ Try, 0,9 Glu; $E_{5,8}^0 = 0,7$ His, 1,8 Try. Point isoélectrique par rapport au dextrane: 10,6 (litt.¹⁵⁾: 10,5–11,0).

L'*hydrolysat* acide donne les valeurs suivantes par rapport à un mélange artificiel traité dans les mêmes conditions: Sér 2,0, Tyr 1,1, Mét 0,8, Glu 1,0, His 1,0, Phé 0,9, Arg 1,0, Gly 1,1, Lys 1,0 et Val 1,0. (Try et Pro n'ont pas été déterminés.)

L'*attaque par la trypsine* a été effectuée par l'action de 0,0625 mg de trypsine cristallisée (NUTRITIONAL BIOCHEMICALS Co., Cleveland) sur 0,53 mg de peptide dans 1,25 ml de tampon acétate d'ammonium de pH 8,0 pendant 1 h à 25°. Après addition d'acide acétique jusqu'à pH 3,0 et lyophilisation, l'électrophorèse sur papier à pH 5,8 montre une scission complète en deux fragments migrant, l'un plus vite que le peptide de départ et l'autre moins vite. Le premier donne après hydrolyse acide: Gly, Lys, Pro, Val²⁰⁾; le second Sér, Tyr, Mét, Glu, His, Phé, Arg. HARRIS⁴⁾ obtient le même résultat dans des conditions similaires.

L'*attaque par la chymotrypsine* a été suivie au pH-stat (RADIOMETER, Copenhague) par l'action de 0,125 mg de chymotrypsine cristallisée (NUTRITIONAL BIOCHEMICALS Co., Cleveland) sur 1,06 mg de peptide dissous dans 2,5 ml de tampon de pH 8,5 pendant 5 h à 25°. Après addition d'acide acétique jusqu'à pH 3,0 et lyophilisation, l'électrophorèse sur papier à pH 5,8 montre une scission complète en quatre fragments correspondant à ceux indiqués par HARRIS⁴⁾ pour une attaque dans des conditions similaires.

SUMMARY

N-Acetyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionyl- γ -O-benzyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophanyl-glycyl- ϵ -N-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valylamide has been obtained by condensing N-acetyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-seryl-L-methionyl- γ -benzyl-L-glutamate with L-histidyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophanyl-glycyl- ϵ -N-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valylamide. After splitting the N-CBO and the O-benzyl protecting groups by hydrogen bromide in trifluoroacetic acid, a free acetyl-tridecapeptide-amide has been obtained, which, after purification by counter-current and paper electrophoresis, has been found by several methods to be homogeneous and to possess the physical, chemical and biological properties of the natural hog α -MSH.

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

²⁰⁾ Try est identifié avant hydrolyse.