

16. Synthèse du glycyL-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle, un peptide représentant la séquence 10 à 20 de l'ACTH

par **R. A. Boissonnas, St. Guttmann, P.-A. Jaquenoud, Ed. Sandrin et J.-P. Waller**

(2 XII 60)

Nous avons publié en 1956 une communication préliminaire¹⁾ rapportant la synthèse d'un eicosapeptide représentant la séquence 1 à 20 de l'ACTH: le N-CBO-L-séryl-L-tyrosyl-L-séryl-L-méthionyl- γ -O-benzyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-phénylalaninyl-L-arginyl-L-tryptophanyl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle.

La scission des groupes protecteurs de cet eicosapeptide par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique en présence de méthyléthylsulfure avait fourni un produit, qui, à l'état brut, possédait déjà une activité ACTH non négligeable, démontrant ainsi pour la première fois qu'un peptide synthétique ne contenant que les 20 premiers acides aminés de la séquence de l'ACTH était déjà doué d'activité biologique. Par la suite, nous montrâmes que l'emploi d'acide acétique comme solvant lors de cette scission des groupes protecteurs conduisait à des réactions secondaires sur les restes sérines en position 1 et 3²⁾, réactions qu'on pouvait éviter en remplaçant l'acide acétique par l'acide trifluoroacétique³⁾.

Une partie seulement du contenu de notre communication préliminaire sur la synthèse de cet eicosapeptide avait fait jusqu'ici l'objet de publications détaillées subséquentes, qui entraient toutes dans le cadre de notre synthèse de l' α -MSH³⁾ et concernaient, entre autres, la synthèse des séquences 1 à 5²⁾, 6 à 9⁴⁾ et 10 à 13⁴⁾.

L'intérêt manifesté récemment par d'autres groupes de recherche pour ce domaine nous incite maintenant à rapporter en détails dans le présent travail la synthèse de la séquence 10 à 20. Dans un mémoire suivant, nous décrirons d'une manière approfondie la synthèse de la séquence 1 à 20 biologiquement active.

Le schéma de synthèse que nous avons suivi est résumé ci-contre. Il ne présente aucune modification par rapport à celui que nous avons donné dans notre communication préliminaire¹⁾.

La N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysine décrite précédemment⁴⁾ a été condensée avec le N^ε-CBO-L-lysinate de méthyle⁴⁾ par la méthode à l'anhydride mixte⁵⁾ et par la

¹⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, J.-P. WALLER & P.-A. JAQUENOUD, *Experientia* 12, 446 (1956).

²⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 41, 1852 (1958).

³⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 42, 1257 (1959).

⁴⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, R. L. HUGUENIN, P.-A. JAQUENOUD & ED. SANDRIN, *Helv.* 41, 1867 (1958).

⁵⁾ 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).

méthode au dicyclohexyl-carbodiimide⁶⁾ en opérant à froid et en utilisant dans les deux cas le tétrahydrofuranne comme solvant⁷⁾. Les propriétés du N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysinate de méthyle (XC) obtenu ont été les mêmes en suivant les deux voies, et les rendements ont été équivalents (67–68%). Par saponification, on obtient avec un rendement de 91% la N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysine (XCI).

Par condensation de la N-CBO-L-arginine⁴⁾ avec le dibromhydrate de L-arginate de méthyle⁴⁾ au moyen du dicyclohexyl-carbodiimide dans la pyridine à 0°, on obtient le dibromhydrate de N-CBO-L-arginyl-L-arginate de méthyle (XCII) avec un rendement de 81% et sans formation notable d'acylurée accessoire. Le dibromhydrate de N-CBO-L-arginyl-L-arginine (XCIII), obtenu par saponification avec un rendement de 95%, est directement condensé avec le L-prolyl-L-valinate de méthyle⁴⁾ par le dicyclohexyl-carbodiimide dans le diméthylformamide à 0° en dibromhydrate de N-CBO-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle (XCIV) avec un rendement de 51%. Par scission du groupe CBO par une solution d'acide bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, on obtient avec un rendement de 81% le tribromhydrate correspondant XCV, qui est condensé dans le diméthylformamide à 0°, en présence de dicyclohexyl-carbodiimide et de tri-n-butylamine, avec la N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysine (XCI) obtenue ci-dessus. Le dibromhydrate de l'heptapeptide XCVI ainsi formé est transformé en base libre correspondante et celle-ci est convertie en dichlorhydrate. Sous ces trois formes, l'heptapeptide donne des analyses élémentaires correctes. Le rendement total de la condensation et de ces diverses transformations est de 50%. La scission du reste trityle par chauffage dans l'acide acétique contenant 10% d'eau, suivie de purification par contre-courant, conversion en base libre et addition de deux équivalents d'acide chlorhydrique, conduit avec un rendement global de 51% au dichlorhydrate de glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle (XCVII), dont la pureté a été vérifiée par analyse élémentaire, analyse des acides aminés composants, examens chromatographiques et électrophorétiques dans plusieurs systèmes et dégradations enzymatiques par la trypsine et la leucine-aminopeptidase.

Par condensation de cet heptapeptide XCVII avec la N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valine décrite dans un travail antérieur⁴⁾, au moyen du dicyclohexyl-carbodiimide dans un mélange de diméthylformamide et d'acétonitrile à –3°, on obtient après purification par contre-courant le dichlorhydrate de N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle (XCVIII) avec un rendement de 52%. La scission du groupe trityle par l'acide acétique contenant 2% d'eau à 100° donne avec un rendement de 95% le dichlorhydrate de glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle (XCIX) dont la synthèse faisait l'objet de ce travail. La pureté et l'identité de ce produit ont été confirmées par analyse élémentaire, analyse des acides aminés composants, examens chromatographiques et électrophorétiques dans une

⁶⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

⁷⁾ J. R. VAUGHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 6137 (1952); **75**, 5556 (1953); G. W. ANDERSON & F. M. CALLAHAN, *ibid.* **80**, 2902 (1958).

série de systèmes, et dégradations enzymatiques par la trypsine et la leucine-amino-peptidase. Ces dernières indiquent que le produit obtenu n'a pas subi de racémisation décelable.

Partie expérimentale⁸⁾

Les F. sont corrigés (précision $\pm 1^\circ$). Les séchages au vide ont été effectués sous 10^{-2} à 10^{-3} Torr (16 h à 60° pour les analyses). Les évaporations sous vide ont été conduites dans l'évaporateur rotatif de CRAIG⁹⁾.

Les chromatographies sur papier ont été effectuées selon la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040b lavé». Rf_M dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:20); Rf_P dans le mélange n-butanol/acide acétique/eau (70:10:20); Rf_A dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/eau (35:35:30). Rf^a après scission préliminaire du groupe CBO- par séjour de 40 min à 20° dans une solution de HBr à 20% dans l'acide acétique glacial, évaporation au vide et reprise dans le solvant de chromatographie ou d'électrophorèse; Rf^b après scission préliminaire du groupe trityle par chauffage de 10 min à 100° dans l'acide acétique aqueux à 80%, évaporation et reprise comme ci-dessus; Rf⁰ sans traitement préalable.

Les électrophorèses sur papier ont été effectuées dans l'appareil à électrophorèse sous haute tension de WIELAND & PFLEIDERER¹⁰⁾: au pH 1,9 (E_{1,9}) dans le mélange acide formique/acide acétique/eau (15:10:75); au pH 5,8 (E_{5,8}) dans le mélange pyridine/acide acétique/eau (9:1:10). E_{1,9} = 0,8. On indique qu'à pH 1,9 la substance migre 0,8 fois la distance que migre l'histidine. Les exposants a, b et 0 ont la même signification que pour les chromatogrammes.

Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et des phérogrammes ont été décrits précédemment¹¹⁾.

N-Trityl-glycyl-*N*^e-CBO-L-lysyl-*N*^e-CBO-L-lysinate de méthyle (XC). – a) *Par anhydride mixte*. On dissout 58,0 g (100 mmoles) de *N*-trityl-glycyl-*N*^e-CBO-L-lysine⁴⁾ dans un mélange de 240 ml de tétrahydrofuranne et de 23,8 ml (100 mmoles) de tri-*n*-butylamine, refroidit à -10° et ajoute en 20 min 10,0 ml (104 mmoles) de chloroformiate d'éthyle. Après 10 min d'agitation supplémentaire, on ajoute une solution de 36,3 g (110 mmoles) de chlorhydrate de *N*^e-CBO-L-lysinate de méthyle⁴⁾ et de 26,4 ml (111 mmoles) de tri-*n*-butylamine dans 120 ml de tétrahydrofuranne. Après 3 h à 23° , on évapore au vide, reprend par 300 ml d'acétate d'éthyle et 150 ml d'éther, lave par l'eau, par H₂SO₄ 1N (rapidement et à 0°), par NH₄OH 1N, par l'eau et par NaCl 30%, sèche sur Na₂SO₄ et évapore au vide. Le résidu (77,3 g) est dissous dans 200 ml de méthanol et additionné d'un mélange de 1000 ml d'éther et de 800 ml d'ether de pétrole. Après 3 jours à 0° , on filtre, lave à l'éther de pétrole, sèche au vide et obtient ainsi 57,5 g (67%) de *N*-trityl-glycyl-*N*^e-CBO-L-lysyl-*N*^e-CBO-L-lysinate de méthyle de F. 110° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -7,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; méthanol), $-7,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; pyridine), $-3,4^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide). Rf_M^a = 0,90; Rf_A^b = 0,85 (révélation par ninhydrine et chlore).

C ₅₀ H ₅₇ O ₈ N ₅	Calc.	C 70,2	H 6,7	O 15,0	N 8,2%
(856,0)	Tr.	,, 70,6	,, 6,9	,, 15,2	,, 8,4%

b) *Par dicyclohexyl-carbodiimide*. On dissout 36,3 g (110 mmoles) de chlorhydrate de *N*^e-CBO-L-lysinate de méthyle⁴⁾ et 26,2 ml (110 mmoles) de tri-*n*-butylamine dans 300 ml de tétrahydrofuranne, ajoute 58,0 g (100 mmoles) de *N*-trityl-glycyl-*N*^e-CBO-L-lysine⁴⁾, refroidit à -10° et ajoute encore 25,8 g (125 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide. Après 2 h à -10° et 16 h à 23° , on filtre, évapore à sec, triture avec de l'éther de pétrole, dissout dans un mélange de 300 ml d'acétate d'éthyle et 150 ml d'éther, et lave comme ci-dessus. Une seconde fraction de dicyclohexylurée précipite encore pendant le lavage et est éloignée par filtration. Par recristallisation comme ci-dessus, on obtient 58,5 g (68%) de *N*-trityl-glycyl-*N*^e-CBO-L-lysyl-*N*^e-CBO-L-lysinate de méthyle de mêmes propriétés que le produit obtenu par la méthode à l'anhydride mixte.

⁸⁾ Les microanalyses ont été effectuées dans notre Laboratoire microanalytique (Dr. W. SCHÖNIGER).

⁹⁾ L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, *Analyt. Chemistry* 22, 1462 (1950).

¹⁰⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 67, 257 (1955).

¹¹⁾ R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, *Helv.* 43, 186 (1960); ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *ibid.* 43, 205 (1960).

N-Trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysine (XCI). On dissout 42,8 g (50 mmoles) d'ester tripeptidique XC dans 150 ml de méthanol et ajoute en 10 min à 20° sous forte agitation 50 ml de NaOH 4N. On laisse encore 1 h à la même température, refroidit à 0° et ajoute lentement du HCl 6N jusqu'à ce que le pH descende à 2,5. Après addition de 150 ml d'eau et repos de 15 min, on filtre, lave par 150 ml d'eau, dissout dans 250 ml d'acétate d'éthyle, lave par l'eau, puis par NaCl 30%, sèche sur Na₂SO₄ et évapore au vide. Par addition d'éther, filtration et lavage à l'éther de pétrole, on obtient 38,3 g (91%) de *N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysine* de F. 80°. $[\alpha]_D^{25} = +2,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; méthanol), $+0,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide), $+1,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; pyridine). $Rf_A^a = 0,60$; $Rf_M^a = 0,20$; $E_{5,8}^a = 1,5$ His (révélation par ninhydrine).

$C_{49}H_{55}O_8N_5$ (842,0)	Calc. C 69,9	H 6,6	N 8,3%	p. équiv. 842
	Tr. „ 69,7	„ 7,0	„ 8,3%	„ 840

N-CBO-L-arginyl-L-arginate de méthyle, 2HBr (XCII). On suspend 154 g (500 mmoles) de *N-CBO-L-arginine*⁴) et 193 g (550 mmoles) de dibromhydrate de *L-arginate* de méthyle⁴) dans 1500 ml de pyridine anhydre, agite pendant 20 min et introduit à 0° 124 g (600 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide. Après 16 h à 20°, on filtre de la dicyclohexylurée formée, évapore au vide, triture avec de l'éther, puis plusieurs fois avec de l'acétone, et reprend par 1000 ml d'eau. Après filtration, le filtrat est évaporé à sec au vide à basse température. On sèche au vide poussé, triture avec de l'éther sec jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent, sèche au vide et obtient ainsi 259 g (81%) de *N-CBO-L-arginyl-L-arginate* de méthyle, 2HBr de F. 115–120° (déc.). $[\alpha]_D^{21} = -10,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; méthanol), $-5,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,30$; $Rf_A^a = 0,30$; $Rf_B^a = 0,10$; $E_{1,9}^a = 1,1$ His; $E_{5,8}^a = 2,0$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{21}H_{36}O_5N_8Br_2$ (640,4)	Calc. C 39,4	H 5,7	N 17,5	Br 25,0%
	Tr. „ 40,3	„ 6,0	„ 17,5	„ 25,0%

N-CBO-L-arginyl-L-arginine, 2HBr (XCIII). On dissout 256 g (400 mmoles) de *N-CBO-L-arginyl-L-arginate* de méthyle, 2HBr (XCII) dans 1450 ml de KOH 1N, laisse 75 min à 20°, refroidit à 0° et acidifie à pH 3 par HBr 66%. On concentre au vide à 30°, sèche au vide poussé, reprend par 400 ml de méthanol, filtre du KBr qui précipite, évapore au vide, triture avec de l'éther et sèche au vide. On obtient 252 g de *N-CBO-L-arginyl-L-arginine*, 2HBr contenant encore 7% de KBr (rendement en dipeptide: 95%), qui sont directement utilisés pour le stade suivant. $Rf_M^a = 0,10$.

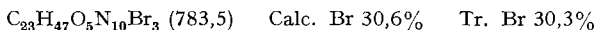
N-CBO-L-Arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle (XCIVa). On dissout 72,1 g (115 mmoles) de *N-CBO-L-arginyl-L-arginine*, 2HBr (XCIII), 39,3 g (127 mmoles) de *L-prolyl-L-valinate* de méthyle, HBr⁴) et 27,4 ml (125 mmoles) de tri-*n*-butylamine dans 200 ml de diméthylformamide à 40°, refroidit rapidement à 0°, ajoute 29,7 g (144 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide et agite encore 20 h à 20°. On filtre, évapore au vide, triture avec de l'éther, de l'acétate d'éthyle et de l'acétone et sèche au vide. On soumet le produit obtenu à un contre-courant de 190 transferts dans le système *n*-butanol/acide acétique/eau 4:1:5 et recueille le produit de $K = 0,72$ se trouvant dans les tubes 65 à 95. (Une impureté ne donnant que de l'arginine, sans proline ni valine, par hydrolyse acide se trouve rassemblée dans les tubes 110 à 140 et a un $K = 1,7$.) Après évaporation au vide, reprise dans 500 ml de méthanol, passage sur une résine basique sous forme libre (Amberlite IRA-410), concentration à un volume de 200 ml et précipitation par l'éther, on obtient 39,6 g (51%) de *N-CBO-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate* de méthyle de F. 170–175°. $[\alpha]_D^{22} = -46^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$; méthanol), $-26^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$; diméthylformamide), $-43^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$; acide acétique 95%). $E_{1,9}^a = 1,0$ Glu; $E_{5,8}^a = 0,6$ His (révélation par chlore et SACAGUCHI); $E_{1,9}^a = 0,8$ His; $E_{5,8}^a = 1,1$ His (révélation par ninhydrine, chlore et SACAGUCHI).

$C_{31}H_{50}O_7N_{10} + 2H_2O$ (674,8 + 36,0)	Calc. C 52,4	H 7,7	O 20,3	N 19,7%
	Tr. „ 52,4	„ 7,8	„ 20,4	„ 20,3%

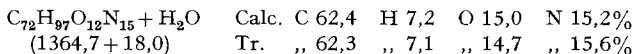
N-CBO-L-Arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle, 2HBr (XCIVb). Par dissolution du tétrapeptide précédent, XCIVa, dans deux parties de méthanol, addition de deux équivalents de HBr (sous forme d'une solution méthanolique 8N fraîchement préparée) et précipitation par l'éther, on obtient avec un rendement quantitatif le dibromhydrate de *N-CBO-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate* de méthyle de F. 195–200°, avec transition à 140°.

$C_{31}H_{52}O_7N_{10}Br_2$ (836,7)	Calc. N 16,7	Br 19,1%	Tr. N 16,8	Br 19,7%
-------------------------------------	--------------	----------	------------	----------

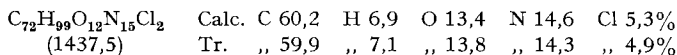
L-Arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle, 3HBr (XCIV). On dissout 41,8 g (50 mmoles) d'ester tétrapeptidique XCIVb dans 150 ml d'une solution 2N de HBr dans l'acide acétique glacial, laisse 75 min à 20°, évapore au vide, redissout dans 100 ml de méthanol, évapore au vide, dissout dans 100 ml d'eau, extrait deux fois par 50 ml d'éther, évapore la solution aqueuse au vide à 30° et évapore encore trois fois après addition de 100 ml de toluène et trituration de façon à éloigner entièrement l'humidité restante. Le résidu est dissous dans 50 ml de méthanol anhydre et reprécipité par addition de 300 ml de chlorure de méthylène. En renouvelant encore une fois cette précipitation et en travaillant les liqueurs-mères, on obtient un résidu huileux qui, après trituration avec de l'éther de pétrole et séchage au vide donne 31,7 g (81%) de tribromhydrate de L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle très hygroscopique. $E_{1,9}^0 = 0,8$ His; $E_{8,8}^0 = 1,1$ His (révélation par ninhydrine).



N-Trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle (XCVIa). On dissout 42,1 g (50 mmoles) de N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysine (XCI) et 39,2 g (50 mmoles) de L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle, 3HBr (XCIV) dans 90 ml de diméthylformamide, ajoute 11,9 ml (50 mmoles) de tri-n-butylamine, refroidit à 0° et ajoute 12,4 g (60 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide. Après 2 h à 0° et 16 h à 20°, on refroidit à -20°, filtre de la dicyclohexylurée qui a cristallisé (12,5 g), ajoute 700 ml d'éther et triture plusieurs fois le précipité formé avec de l'éther. Après dissolution dans 60 ml de méthanol, précipitation par 600 ml d'éther, dissolution dans 70 ml de méthanol, reprécipitation à 0° par 300 ml d'eau, séchage au vide, trituration à l'éther et à l'éther de pétrole et séchage au vide poussé, on obtient 49,7 g (65%) d'heptapeptide sous forme de dibromhydrate (calc. N 13,8%; Br 10,5%; tr. N 13,8%; Br 10,3%) de F. 150° (déc.). Ce produit est soumis à un contre-courant de 30 transferts dans le système méthanol/eau/NH₄OH 1N/CHCl₃/CCl₄ 8:2:1:7:3. Le contenu des tubes 9 à 22 est réuni. Après évaporation à sec et dissolution dans 200 ml de méthanol et 100 ml d'eau, on passe sur résine basique libre (Amberlite IRA-410), évapore à sec, triture avec de l'éther et sèche. On obtient ainsi 35,5 g (51% global) de N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle.



N-Trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle, 2HCl (XCVIb). On dissout 27,7 g (20 mmoles) de l'heptapeptide précédent, XCVIa, dans 180 ml de méthanol, ajoute 40 ml de HCl 1N méthanolique, évapore au vide, triture à l'éther et sèche au vide poussé. On obtient ainsi 28,4 g (99%) de dichlorhydrate de N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle de F. 150° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -22,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; méthanol), $-16,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide). $Rf_M^{10} = 0,64$; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Glu (révélation par ninhydrine).



Glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle, 2HCl (XCVII). On dissout 15,0 g (10,4 mmoles) de dichlorhydrate de trityl-heptapeptide XCVIb dans un mélange de 45 ml d'acide acétique glacial et de 5 ml d'eau, porte pendant 10 min à 100°, évapore à sec au vide, triture avec de l'éther jusqu'à l'obtention d'un produit pulvérulent, dissout dans 20 ml de méthanol, ajoute 4 ml d'une solution 3,5N de HCl dans l'éther et précipite par addition d'éther. Après filtration, trituration dans l'éther et séchage on obtient 13,2 g de trichlorhydrate d'heptapeptide qui sont soumis à un contre-courant de 290 transferts dans le système n-butanol/acide acétique/eau 4:1:5. Le contenu des tubes 80 à 125 est réuni. Après évaporation à sec et trituration du résidu avec de l'éther jusqu'à l'obtention d'un produit pulvérulent (F. 175° avec déc.), on dissout celui-ci dans 150 ml de méthanol et passe sur une résine sous forme de base libre (Amberlite IRA-410). Le filtrat est évaporé à sec, pesé, redissous dans 50 ml de méthanol, additionné de deux équivalents de HCl sous forme de solution méthanolique, évaporé à sec, trituré avec de l'éther et séché. On obtient ainsi 6,3 g (51%) de dichlorhydrate de glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle cristallin de F. 170° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -36,6^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1$; méthanol), $-27,0^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1$; diméthyl-

formamide). $Rf_M^0 = 0,52$; $Rf_A^0 = 0,50$; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Glu; $E_{5,8}^0 = 0,9$ His; $E_{1,9}^a = 1,0$ His; $E_{5,8}^a = 1,7$ His (révélation par ninhydrine).

$C_{53}H_{85}O_{12}N_{15}Cl_2$	Calc.	C 53,2	H 7,2	O 16,1	N 17,6	Cl 5,9%
(1195,2)	Tr.	,, 53,0	,, 7,3	,, 15,9	,, 17,4	,, 6,4%

L'hydrolyse totale de XCVII par HCl 6N (110°; 16 h) fournit les acides aminés composants dans les rapports attendus.

Pour les *attaques enzymatiques*, on soumet 3,7 mg de peptide à l'action de 0,5 ml d'une solution à 20% de HBr dans l'acide acétique glacial pendant 1 h à 20°, précipite par 5 ml d'éther, lave soigneusement par l'éther, sèche et dissout dans 0,2 ml d'acide acétique 1N. On porte à pH 8,5 par addition de NH_4OH 4N (env. 0,06 ml) et divise en deux parties égales, dont l'une est soumise à l'action de la trypsine (0,01 mg) et l'autre à celle de la leucine-aminopeptidase (0,2 unité; stade 3¹²) pendant 16 h à 20°. L'examen électrophorétique à pH 1,9 et 5,8 (révélation par ninhydrine, chlore, SACAGUCHI et isatine) montre que la leucine-aminopeptidase dégrade comme attendu le peptide en glycine, lysine, arginine, proline et valinate de méthyle, sans traces de peptides résiduels, et que la trypsine le scinde en lysine, arginine, glycylyl-lysine et arginyl-prolyl-valinate de méthyle, sans traces d'autres peptides résiduels.

N-Trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle, 2HCl (XCVIII). On dissout 4,67 g (6,0 mmoles) de N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valine⁴) et 7,86 g (6,6 mmoles) de dichlorhydrate de glycylyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle (XCVII) dans 36 ml de diméthylformamide, ajoute en agitant 30 ml d'acétonitrile, refroidit à -3° et ajoute encore 1,85 g (9,0 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide. On agite encore 4 h à -3° et 48 h à 20°. On éloigne l'acétonitrile au vide, refroidit à -20°, filtre de la dicyclohexylurée qui a cristallisé (1,93 g), ajoute 500 ml d'éther, laisse 16 h à 0°, filtre, lave à l'éther et sèche. Les 10,01 g de produit ainsi isolé sont dissous dans un mélange de 10 ml de méthanol et de 10 ml d'eau, puis additionnés de 100 ml d'eau. On ajoute alors 5 ml de NaCl 30% à la solution limpide obtenue. Il se forme immédiatement un précipité qui est séparé par centrifugation, redissous dans 10 ml de méthanol et additionné de 100 ml de NH_4OH 0,5N, puis de 10 ml de NaCl 30%. Le précipité obtenu est séparé par centrifugation, puis séché au vide. Il est alors soumis à un contre-courant de 200 transferts dans le système méthanol/eau/ NH_4OH 1N/ $CHCl_3/CCl_4$ 8:2:1:7:3. Le contenu des tubes 120 à 200 est réuni et évaporé au vide. Après dissolution dans 20 ml de méthanol et précipitation par 150 ml d'éther anhydre, filtration et séchage au vide poussé, on obtient 6,2 g (52%) de N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle, 2HCl de F. 190° (déc.). $Rf_M^0 = 0,61$; $Rf_A^0 = 0,63$; $Rf_P^0 = 0,78$; $E_{1,9}^b = 1,0$ Try; $E_{5,8}^b = 0,8$ His; $Rf_M^a = Rf_A^a = Rf_P^a = 0,1$; $E_{1,9}^a = 0,9$ His; $E_{5,8}^a = 1,6$ His (révélation par la ninhydrine).

$C_{98}H_{136}O_{18}N_{20}Cl_2 + 4H_2O$	Calc.	C 58,1	H 7,2	O 17,4	N 13,8	Cl 3,5%
(1953,2 + 72,1)	Tr.	,, 57,6	,, 7,2	,, 17,1	,, 14,5	,, 3,9%

Glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle, 3HCl (XCIX). On dissout 3,93 g (1,96 mmole) de l'endécapetide XCVIII dans un mélange de 19,6 ml d'acide acétique glacial et de 4,0 ml d'eau, chauffe 13 min à 100°, refroidit, évapore à sec au vide, évapore trois fois après addition chaque fois d'un mélange 1:1 de méthanol et de toluène, triture plusieurs fois avec de l'éther anhydre et sèche. Les 3,81 g ainsi obtenus sont dissous dans 200 ml de méthanol et passés sur une résine basique sous forme libre (Amberlite IRA-410). Par évaporation à sec et séchage au vide, on obtient 3,62 g qui sont dissous dans 15 ml de méthanol et additionnés de 5,8 ml de HCl 1N méthanolique. On précipite alors par addition de 200 ml d'éther anhydre. Après filtration et séchage au vide on obtient 3,32 g (95%) de trichlorhydrate de glycylyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valinate de méthyle cristallin de F. 175° (déc.). $Rf_M^0 = 0,62$; $Rf_A^0 = 0,63$; $Rf_P^0 = 0,75$; $E_{1,9}^0 = 1,1$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,8$ His (révélation par la ninhydrine); $[\alpha]_D^{25} = -25 \pm 1^\circ$ ($c = 1$; diméthylformamide).

$C_{79}H_{123}O_{18}N_{20}Cl_3$	Calc.	C 54,3	H 7,1	O 16,5	N 16,0	Cl 6,1%
(1747,3)	Tr.	,, 54,3	,, 7,0	,, 17,1	,, 15,5	,, 6,2%

¹²) Methods of Enzymology, Vol. II, p. 89, Academic Press 1955.

Le produit a aussi pu être isolé sous forme de tétrahydrate.

$C_{79}H_{123}O_{18}N_{20}Cl_3 + 4H_2O$	Calc. C 52,1	H 7,2	O 19,3	N 15,6	Cl 5,8%
(1747,3 + 72,1)	Tr. „ 52,0	„ 7,5	„ 19,3	„ 16,0	„ 5,5%

L'*hydrolyse totale* de XCIX par HCl 6N (110°; 16 h) fournit les acides aminés composants dans les rapports attendus.

Pour les *attaques enzymatiques*, on soumet 5,0 mg de peptide à l'action de 0,5 ml d'une solution de HBr à 20% dans l'acide acétique glacial pendant 1 h à 20°, précipite par 5 ml d'éther, lave soigneusement par l'éther, sèche et dissout dans 0,2 ml d'acide acétique 1N. On porte à pH 8,5 par addition de NH_4OH 4N (env. 0,06 ml) et divise en deux parties égales, dont l'une est soumise à l'action conjointe de la trypsine (0,01 mg) et de la leucine-aminopeptidase (0,2 unité; stade 3¹²) et l'autre à celle de la leucine-aminopeptidase seule (0,5 unité; stade 3¹²) pendant 16 h à 20°. L'examen électrophorétique à pH 1,9 et 5,8 (révélation par ninhydrine, chlore, SACAGUCHI et isatine) montre dans les deux cas une transformation dans les acides aminés composants, sans traces de peptides résiduels.

SUMMARY

N-CBO-L-arginyl-L-arginine is condensed with L-prolyl-L-valine methyl ester and, after splitting of the CBO group, L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valine methyl ester is obtained. This is condensed with N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysine and, after selective splitting of the trityl group, glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valine methyl ester is obtained. Condensation of this heptapeptide with N-trityl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valine yields an endecapeptide, which, after selective splitting of the trityl group, is converted into the trihydrochloride of glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-N^ε-CBO-L-lysyl-N^ε-CBO-L-lysyl-L-arginyl-L-arginyl-L-prolyl-L-valine methyl ester. The identity, the chemical purity and the optical homogeneity of this endecapeptide is evidenced by elementary and amino acid analyses, by chromatography and electrophoresis on paper, and by enzymatic degradation.

Laboratoires de chimie organique et pharmaceutique
de l'Université, Genève

Laboratoires de chimie pharmaceutique SANDOZ, Bâle