

191. Synthèses de la Phé²-arginine-vasopressine et de la Phé²-arginine-vasotocine et nouvelles synthèses de l'arginine-vasopressine et de l'arginine-vasotocine

par R. L. HUGUENIN et R. A. BOISSONNAS

(6 VI 62)

Le remplacement de la tyrosine par la phénylalanine dans l'oxytocine, c'est-à-dire la suppression de l'hydroxyle phénolique de cette hormone, conduit à la Phé²-oxytocine (désoxy-oxytocine), dont la synthèse a été réalisée indépendamment par notre groupe^{1) 2)} et par celui de DU VIGNEAUD³⁾.

Lorsque cette même modification est effectuée sur la lysine-vasopressine, on obtient la Phé²-lysine-vasopressine, dont la synthèse a aussi été accomplie par notre groupe⁴⁾ et, peu après, par celui de DU VIGNEAUD⁵⁾.

Afin d'étudier l'effet de la suppression de cet hydroxyle phénolique chez la lysine-vasotocine (Lys⁸-oxytocine)^{6) 7) 8)} et l'oxypressine (Phé³-oxytocine)¹⁰⁾, analogues dont les structures sont intermédiaires entre celles de l'oxytocine et de la lysine-vasopressine, nous avons synthétisé, il y a quelque temps, la Phé²-lysine-vasotocine (Phé²-Lys⁸-oxytocine)¹¹⁾ et la Phé²-oxypressine (Phé²-Phé³-oxytocine)¹³⁾.

Le remplacement de la tyrosine par la phénylalanine provoque dans tous ces cas une baisse appréciable des activités biologiques, certaines d'entre elles étant néanmoins plus affectées que d'autres. Ainsi, les actions sur la glande mammaire ou sur la pression sanguine sont chaque fois diminuées dans des proportions moindres que celles sur l'utérus ou, respectivement, sur la diurèse (voir tableau).

Afin de pouvoir étendre à la famille de l'arginine-vasopressine les observations sur les conséquences de la suppression du groupe hydroxyle phénolique que nous

1) P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **42**, 788 (1959).

2) H. KONZETT & B. BERDE, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* **14**, 333 (1959).

3) M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 1258, 6072 (1959).

4) R. A. BOISSONNAS & ST. GUTTMANN, *Helv.* **43**, 190 (1960).

5) J. MEIENHOFER & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 6336 (1960).

6) R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, *Helv.* **43**, 182 (1960).

7) R. D. KIMBROUGH & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **236**, 778 (1961).

8) Une nouvelle synthèse de la lysine-vasotocine basée sur la condensation du N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle⁹⁾ avec le L-glutaminy-L-asparaginy-L-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N- ϵ -tosyl-L-lysyl-glycinamide⁶⁾ nous a donné un produit possédant des activités plus élevées que celles indiquées dans notre travail précédent⁶⁾ et comparables à celles obtenues par KIMBROUGH & DU VIGNEAUD⁷⁾ pour un produit préparé par la méthode récurrente.

9) P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **45**, 1462 (1962).

10) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, *Helv.* **39**, 1421 (1956); B. BERDE, W. DOEPFNER & H. KONZETT, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* **12**, 209 (1957); P. G. KATSOYANNIS, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 109 (1957).

11) P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, résultats non publiés, cités dans ¹²⁾.

12) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, B. BERDE & H. KONZETT, *Experientia* **17**, 377 (1961).

13) R. A. BOISSONNAS & ST. GUTTMANN, *Helv.* **43**, 190 (1960).

avons faites dans la famille de l'oxytocine et celle de la lysine-vasopressine, nous avons maintenant préparé la Phé²-arginine-vasopressine (XII) et la Phé²-arginine-vasotocine (Phé²-Arg⁹-oxytocine) (XV). Par la même occasion, nous avons réalisé également deux nouvelles synthèses de l'arginine-vasopressine (XIX) ainsi qu'une nouvelle synthèse de l'arginine-vasotocine (XXI).

Les méthodes de synthèse que nous avons suivies sont indiquées dans les schémas 1 à 5. Nous avons employé le groupe tosyl pour la protection du groupe guanido de l'arginine¹⁴), comme dans nos synthèses récentes de la bradykinine¹⁵) et de la kallidine¹⁶).

Le N-CBO-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (VI) a été préparé soit par condensation au trichlorure de phosphore dans la pyridine¹⁷) de la N-CBO-G-tosyl-L-arginine¹⁴) avec le glycinate d'éthyle, scission du groupe CBO du dipeptide, condensation avec la N-CBO-L-proline¹⁸) par la méthode à l'anhydride mixte¹⁹) et amidification de l'ester tripeptidique III obtenu, soit par condensation par la méthode à l'anhydride mixte¹⁹) de la N-CBO-L-proline¹⁸) avec le G-tosyl-L-arginate de *p*-nitrophényle (préparé à partir du N-CBO-G-tosyl-L-arginate de *p*-nitrophényle¹⁵) par scission du groupe CBO) et réaction du dipeptide V obtenu avec le glycinamide. Après scission du groupe CBO, l'amide tripeptidique VII obtenu a été condensé avec le N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-azide²⁰), de façon à livrer l'hexapeptide VIII qui, par scission du groupe CBO, a fourni le L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (IX).

Pour réaliser la synthèse de la Phé²-arginine-vasopressine (XII), nous avons d'abord condensé la N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanine¹⁾ ³⁾ ¹³⁾ avec le L-phénylalaninate de *p*-nitrophényle²¹) par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide²²) en N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-phénylalaninate de *p*-nitrophényle (X). Par réaction de celui-ci avec l'hexapeptide IX, nous avons ensuite obtenu le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (XI) qui, après scission des groupes protecteurs par le sodium dans l'ammoniac liquide²³), oxydation à l'air et purification par distribution en contre-courant, a fourni la Phé²-arginine-vasopressine (XII) dont les propriétés biologiques²⁴) sont indiquées dans le tableau. Nous voyons que la suppression de l'hydroxyle phénolique affecte plus

¹⁴) E. SCHNABEL & C. H. LI, J. Amer. chem. Soc. 82, 4576 (1960).

¹⁵) ST. GUTTMANN, J. PLESS & R. A. BOISSONNAS, Helv. 45, 170 (1962).

¹⁶) J. PLESS, E. STÜRMER, ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, Helv. 45, 394 (1962).

¹⁷) ST. GOLDSCHMIDT & H. LAUTENSCHLAGER, Liebigs Ann. Chem. 580, 68 (1953).

¹⁸) A. BERGER, J. KURTZ & E. KATCHALSKI, J. Amer. chem. Soc. 76, 5552 (1954); M. ZAORAL, Chem. Listy 48, 1583 (1954); W. GRASSMANN & E. WÜNSCH, Chem. Ber. 91, 462 (1958).

¹⁹) 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).

²⁰) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, Helv. 38, 1491 (1955).

²¹) M. GOODMAN & K. C. STUEBEN, J. Amer. chem. Soc. 81, 3980 (1959).

²²) J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

²³) V. DU VIGNEAUD, CH. RESSLER, J. M. SWAN, C. W. ROBERTS & P. G. KATSOYANNIS, J. Amer. chem. Soc. 76, 3115 (1954).

²⁴) Les dosages biologiques ont été effectués par les Drs B. BERDE et E. STÜRMER de notre Département de recherches médico-biologiques (Dir.: Dr A. CERLETTI).

fortement l'activité pressorique que l'activité antidiurétique, alors qu'on observe le contraire dans le cas de la Phé²-lysine-vasopressine^{4) 5)}, analogue correspondant de la famille de la lysine-vasopressine.

La synthèse de la Phé²-arginine-vasotocine (XV) a été effectuée de manière analogue. Nous avons condensé la N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanine^{1) 3) 13)} avec le L-isoleucinate de *p*-nitrophényle⁹⁾ par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide²²⁾ en N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalaninyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle (XIII). Par réaction de celui-ci avec l'hexapeptide IX, nous avons obtenu le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalaninyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-arginyl-glycinamide (XIV) qui, après scission des groupes protecteurs par le sodium dans l'ammoniac liquide²³⁾, oxydation à l'air et purification par distribution en contre-courant, a fourni la Phé²-arginine-vasotocine (XV) dont les propriétés biologiques²⁴⁾ sont indiquées dans le tableau. La suppression de l'hydroxyle phénolique provoque, dans ce cas, une baisse parallèle des activités pressorique et antidiurétique, alors que chez l'analogue correspondant de la famille de la lysine-vasopressine, la Phé²-lysine-vasotocine¹¹⁾, on observe, comme chez la Phé²-lysine-vasopressine^{4) 5)} mentionnée ci-dessus, une baisse plus considérable de l'activité antidiurétique que de l'activité pressorique.

Nous avons également, selon le même principe, réalisé deux nouvelles synthèses de l'arginine-vasopressine. Cette hormone avait déjà été synthétisée par le groupe de DU VIGNEAUD selon d'autres schémas de synthèse²⁵⁾ dans lesquels le groupe guanido de l'arginine n'était pas constamment protégé par un groupe protecteur, mais simplement salifié²⁶⁾. Dans les nouvelles synthèses que nous proposons, il est au contraire protégé jusqu'au stade final par un groupe tosyl, ce qui facilite grandement l'isolement des produits intermédiaires. Dans la première de nos synthèses, la N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosine^{20) 27)} a été condensée avec le L-phénylalaninate de *p*-nitrophényle²¹⁾ par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide²²⁾ en N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de *p*-nitrophényle (XVI) qui, par condensation avec l'hexapeptide IX, a fourni le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-arginyl-glycinamide (XVII). Dans la seconde de nos synthèses, nous avons condensé le N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-azide²⁸⁾ avec l'hexapeptide IX en N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-arginyl-glycinamide (XVIII). Après scission des groupes protecteurs des nonapeptides protégés XVII ou XVIII par traitement au sodium dans l'ammoniac liquide²³⁾, oxydation à l'air et distribution en contre-courant, nous avons obtenu dans les deux cas de

²⁵⁾ P. G. KATSOYANNIS, D. T. GISH & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 79, 4516 (1957); V. DU VIGNEAUD, D. T. GISH, P. G. KATSOYANNIS & G. P. HESS, *ibid.* 80, 3355 (1958); R. O. STUDER & V. DU VIGNEAUD, *ibid.* 82, 1499 (1960).

²⁶⁾ D. T. GISH & F. H. CARPENTER, J. Amer. chem. Soc. 75, 5872 (1953); G. W. ANDERSON, *ibid.* 75, 6081 (1953); R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, J.-P. WALLER & P.-A. JAQUENOUD, *Experientia* 12, 446 (1956).

²⁷⁾ C. R. HARRINGTON & R. V. PITT RIVERS, *Biochem. J.* 38, 417 (1944); C. W. ROBERTS, J. Amer. chem. Soc. 76, 6203 (1954).

²⁸⁾ P. G. KATSOYANNIS, D. T. GISH, G. P. HESS & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 80, 2558 (1958).

Tableau des activités biologiques

Formule chimique et désignation	Activités oxytociques en unités internationales par mg de base libre			Activités vasopressives en unités internationales par mg de base libre	
	Contraction de l'utérus isolé de Rat	Baisse de la pression sanguine du Coq	Augmentation de la pression interne de la glande mammaire du Lapin	Augmentation de la pression du sang du Rat	Inhibition de la diurèse du Rat
H-Cys-Tyr- <u>Phé-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂</u> arginine-vasopressine = Phé ⁶ -Arg ⁸ -oxytocine (XIX)	16 (± 4)	57 (± 6)	64 (± 8)	380 (± 38)	429 (± 42)
H-Cys- <u>Phé-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂</u> Phé ² -arginine-vasopressine = Phé ² -Phé ⁶ -Arg ⁸ -oxytocine (XII)	~ 0,2	< 1	3 (± 0,4)	122 (± 13)	~ 350
H-Cys-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)- <u>Asp(NH₂)-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂</u> arginine-vasotocine = Arg ⁸ -oxytocine (XXI)	155 (± 15)	285 (± 40)	~ 210	245 (± 15)	250 (± 35)
H-Cys- <u>Phé-Ile-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂</u> Phé ² -arginine-vasotocine = Phé ² -Arg ⁸ -oxytocine (XV)	2 (± 0,4)	~ 10	~ 10	125 (± 15)	109 (± 13)
H-Cys-Tyr- <u>Phé-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Cys-Pro-Lys-Gly-NH₂</u> lysine-vasopressine = Phé ⁶ -Lys ⁸ -oxytocine ⁶⁾ 12)	5 (± 0,5)	40 (± 5)	60 (± 10)	270 (± 20)	~ 250
H-Cys- <u>Phé-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Cys-Pro-Lys-Gly-NH₂</u> Phé ² -lysine-vasopressine = Phé ² -Phé ⁶ -Lys ⁸ -oxytocine ⁴⁾ 5)	~ 0,3	~ 0,15	~ 2,5	55 ± 7	20 ± 2

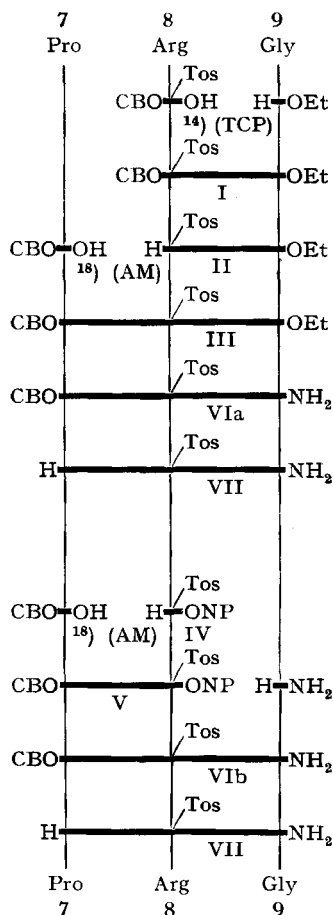
Tableau des activités biologiques (Suite)

Formule chimique et désignation	Activités oxytociques en unités internationales par mg de base libre			Activités vasopressiques en unités internationales par mg de base libre	
	Contraction de l'utérus isolé de Rat	Baisse de la pression sanguine du Coq	Augmentation de la pression interne de la glande mammaire du Lapin	Augmentation de la pression sanguine du Rat	Inhibition de la diurèse du Rat
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂ lysine-vasotocine = Lys ⁶ -oxytocine ^{7) 8)}	78 (± 10)	210 (± 3)	180 (± 25)	130 (± 13)	24 (± 3)
H-CyS-Phe-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂ Phe ² -lysine-vasotocine = Phe ² -Lys ⁶ -oxytocine ¹¹⁾	1,0 (± 0,1)	~ 8	12 (± 3)	32 (± 6)	1,0 (± 0,1)
H-CyS-Tyr-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂ oxypressine = Phe ³ -oxytocine ¹⁰⁾	~ 20	~ 30	~ 60	~ 3	~ 30
H-CyS-Phe-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Phe ² -oxypressine = Phe ² -Phe ³ -oxytocine ¹³⁾	3,3 (± 0,3)	5,4 (± 0,9)	24,6 (± 9,0)	~ 0,9	5,7 (± 0,6)
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂ oxytocine ¹²⁾	450 (± 30)	450 (± 30)	450 (± 30)	5 (± 1)	5 (± 1)
H-CyS-Phe-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Phe ² -oxytocine ^{1) 2) 3)}	32 (± 2)	63 (± 9)	141 (± 21)	~ 0,4	~ 0,5

l'arginine-vasopressine présentant les propriétés biologiques de l'hormone naturelle pure^{12) 29)}.

Notre nouvelle synthèse de l'arginine-vasotocine diffère de celle réalisée antérieurement par KATSOYANNIS & DU VIGNEAUD³⁰⁾ par le fait que nous avons utilisé, comme pour nos autres synthèses mentionnées ci-dessus, le groupe tosyle pour la protection du groupe guanido de l'arginine, alors que ces auteurs ont simplement salifié²⁶⁾ ce groupe guanido, comme ils l'avaient fait dans leurs synthèses de l'arginine-vasopressine²⁵⁾. Par condensation du N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle⁹⁾ avec l'hexapeptide IX, nous avons obtenu le N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-

Schéma 1. Synthèses du L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide

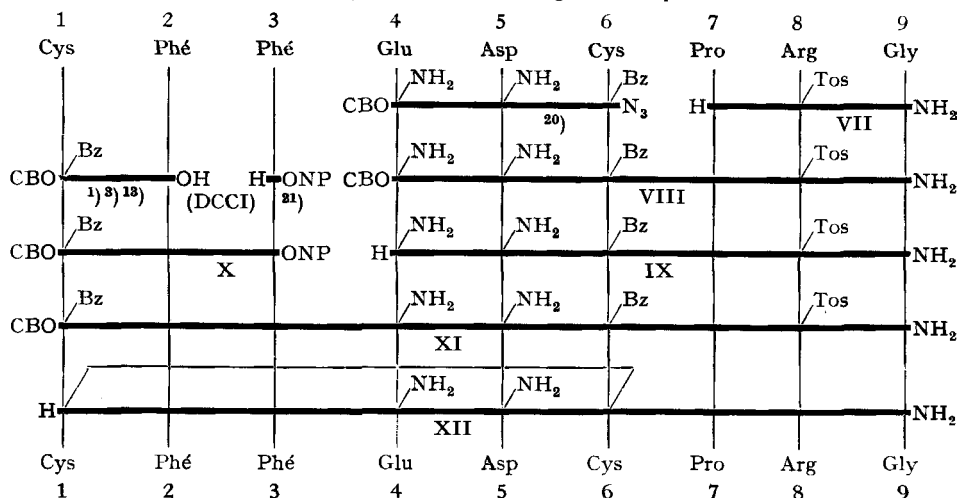


Abbréviations: CBO- = carbobenzoxy-; Tos- = tosyl- = *p*-toluène-sulfonyl-; -NP = *p*-nitrophényle; AM = condensation par la méthode à l'anhydride mixte; TCP = condensation par la méthode au trichlorure de phosphore dans la pyridine.

²⁹⁾ R. ACHER, A. LIGHT & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* 233, 116 (1958).

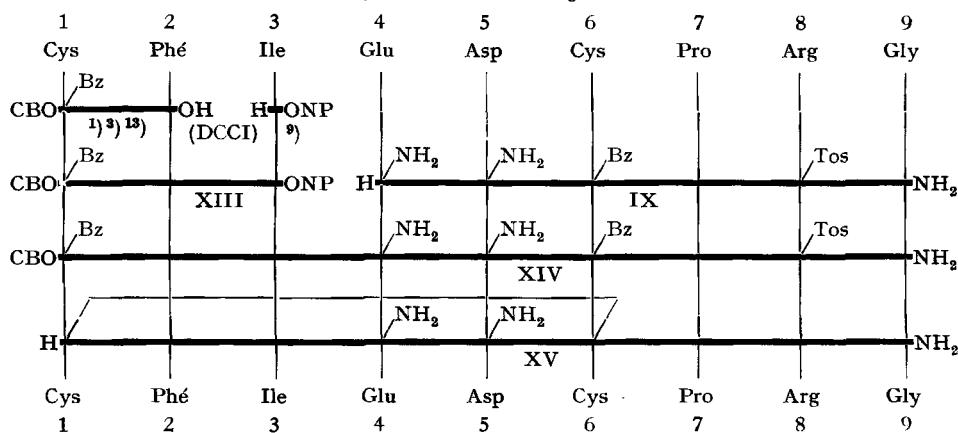
³⁰⁾ P. G. KATSOYANNIS & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* 233, 1352 (1958).

Schéma 2. Synthèse de la Phé²-arginine-vasopressine



Abréviations: cf. schéma 1; en outre: Bz- = benzyl-; DCCI = condensation par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide.

Schéma 3. Synthèse de la Phé²-arginine-vasotocine

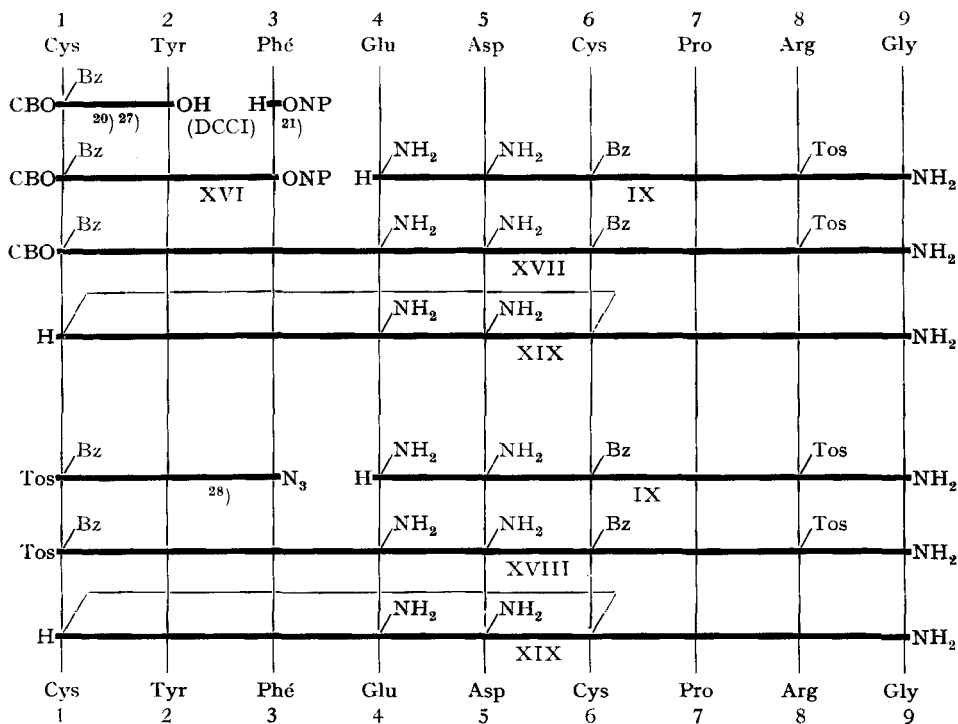


Abréviations: cf. schémas 1 et 2.

cystéinyl-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (XX) qui, après réduction au sodium dans l'ammoniac liquide²³⁾, oxydation à l'air et distribution en contre-courant, a donné de l'arginine-vasotocine (XXI) analytiquement pure, dont les activités biologiques²⁴⁾, sont indiquées dans le tableau. Il ressort de celles-ci que notre produit est sensiblement plus actif que celui préparé par KATSOYANNIS & DU VIGNEAUD. Les valeurs inférieures obtenues par ces auteurs peuvent vraisemblablement être expliquées par une stabilité limitée de l'arginine-vasotocine sous certaines conditions³¹⁾.

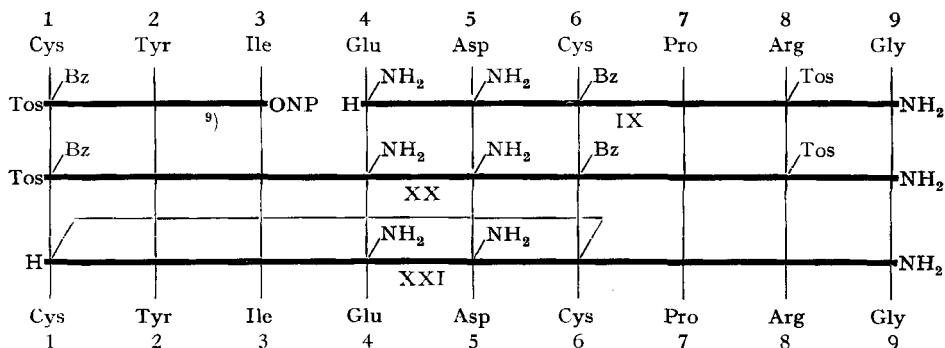
³¹⁾ Nous avons observé que, conservé à l'état solide (sous forme d'acétate), un échantillon d'arginine-vasotocine n'a pas perdu d'activité après séjour de deux mois à 4°.

Schéma 4. Synthèses de l'arginine-vasopressine



Abréviations: cf. schémas 1 et 2.

Schéma 5. Synthèse de l'arginine-vasotocine



Abréviations: cf. schémas 1 et 2.

Partie expérimentale³²⁾

Les conditions générales de travail sont déjà indiquées dans un article précédent⁹⁾. Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et des phérogrammes ont également été décrits précédemment⁶⁾. En outre, la révélation du groupe guanido- par la réaction de SAKA-

³²⁾ Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr W. SCHÖENIGER).

GUCHI a été effectuée selon BHATTACHARYA³³). Les chromatographies sur couche mince sont indiquées par Rfm. L'adsorbant et le solvant sont indiqués dans chaque cas particulier (hauteur de développement: 10 à 12 cm). Les exposants ont la même signification que pour les chromatogrammes sur papier.

N-α-CBO-G-Tosyl-L-arginyl-glycinate d'éthyle (I). A une solution, refroidie à -10° , de 3,42 g (33,2 mmoles) de glycinate d'éthyle dans 100 ml de pyridine anhydre, on ajoute goutte à goutte 20,0 ml (10 mmoles) d'une solution 0,5 M de PCl_3 dans la pyridine, laisse reposer 15 min à température ordinaire, ajoute 13,4 g (29,0 mmoles) de *N-α-CBO-G-tosyl-L-arginine*¹⁴), chauffe 4 h à 100° , évapore au vide, dissout le résidu dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'eau, lave la phase organique par $\text{HCl } 1\text{N}$, H_2O , $\text{NH}_4\text{OH } 1\text{N}$, sèche sur Na_2SO_4 et évapore au vide à 30° . Le solide obtenu contient une impureté se comportant, en chromatographie sur couche mince, comme l'anhydro-dérivé décrit par SCHNABEL & LI¹⁴), dérivé que nous avons préparé selon leurs indications: $\text{Rfm}^{\circ} = 0,9$ (Al_2O_3 , chloroforme/méthanol 9:1; révélation par chlore). Pour purifier le dipeptide, on le dissout dans 200 ml de benzène bouillant; l'huile se déposant par refroidissement est séparée par décantation et soumise une seconde fois au même traitement. Après séchage au vide poussé à 25° , on obtient 9,7 g (61%) de *N-α-CBO-G-tosyl-L-arginyl-glycinate d'éthyle* sous forme d'un solide non cristallisé. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -5,6^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1,7$; acide acétique à 95%). $\text{Rfm}^{\circ} = 0,6$ (Al_2O_3 ; chloroforme/méthanol 9:1; révélation par chlore); $\text{Rf}_{\text{P}}^{\circ} = 0,6$; $\text{Rf}_{\text{A}}^{\circ} = 0,75$; $\text{E}_{1,9}^{\circ} = 0,9$ Try; $\text{E}_{5,8}^{\circ} = 0,65$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_7\text{N}_5\text{S}$	Calc. C 54,8	H 6,1	O 20,5	N 12,8	S 5,9%
(547,6)	Tr. ,, 54,9	,, 6,3	,, 20,1	,, 12,5	,, 6,0%

N-CBO-L-Prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinate d'éthyle (III). Dans 25 ml d'acide acétique glacial, on dissout 9,35 g (17,1 mmoles) de dipeptide I, ajoute 50 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à 25° puis fait couler la solution dans 0,5 l d'éther sec sous vigoureuse agitation. Le précipité est essoré, lavé à l'éther et séché au vide. On obtient 9,33 g de produit scindé qu'on dissout dans 2,5 ml de diméthylformamide et 30 ml de tétrahydrofurane, en chauffant légèrement. Après refroidissement à 0° , on ajoute 4,54 ml de triéthylamine (32,4 mmoles; quantité correspondant aux ions Br^- présents, déterminés par argentométrie) et introduit aussitôt la solution ainsi obtenue dans celle, préparée au moment de l'emploi par dissolution, dans 40 ml de tétrahydrofurane anhydre, de 3,71 g (14,9 mmoles) de *N-CBO-L-proline*¹⁸) et de 2,06 ml (14,7 mmoles) de triéthylamine, refroidissement à -10° , adjonction de 1,47 ml (15,3 mmoles) de chloroformiate d'éthyle et séjour de 10 min à -10° . On agite 1 nuit à 25° , sépare le précipité d'halogénure de triéthylamine, évapore le filtrat au vide à 25° , dissout le résidu dans l'acétate d'éthyle et lave par $\text{HCl } 1\text{N}$, H_2O , $\text{NH}_4\text{OH } 1\text{N}$ et H_2O , sèche sur Na_2SO_4 , évapore au vide et sèche au vide poussé à 25° . On obtient 8,38 g (88%) de *N-CBO-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinate d'éthyle* solide, commençant à fondre vers 70° . $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -49^{\circ} \pm 0,5$ ($c = 1,7$; acide acétique à 95%). $\text{Rfm}^{\circ} = 0,7$ (Al_2O_3 ; chloroforme/méthanol 9:1); 0,9 (Al_2O_3 ; chloroforme/méthanol 7:3; révélation par chlore); $\text{Rf}_{\text{M}}^{\circ} = 0,65$; $\text{Rf}_{\text{P}}^{\circ} = 0,65$; $\text{Rf}_{\text{A}}^{\circ} = 0,7$; $\text{E}_{1,9}^{\circ} = 0,9$ Try; $\text{E}_{5,8}^{\circ} = 0,7$ His (révélation par isatine, chlore et ninhydrine).

$\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{N}_6\text{S}$	Calc. C 55,9	H 6,3	O 19,9	N 13,0	S 5,0%
(644,7)	Tr. ,, 55,9	,, 6,5	,, 20,2	,, 13,2	,, 5,1%

N-CBO-L-Prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (VI). – a) On dissout 8,0 g (12,4 mmoles) d'ester tripeptidique III dans 180 ml d'éthanol absolu, refroidit à 0° et sature la solution de NH_3 . On laisse reposer 2 jours à température ordinaire, évapore au vide à 30° et sèche au vide poussé. En chromatographie sur couche mince (Al_2O_3 ; chloroforme/méthanol 7:3; révélation par chlore), la substance présente deux impuretés, éliminables par le traitement suivant: le produit est dissous dans 100 ml de chloroforme et la solution est lavée 3 fois par 20 ml d'acide acétique à 50%, 1 fois par 60 ml d'eau, puis par NaHCO_3 1N pour éliminer l'acide acétique, enfin par de l'eau. On sèche sur Na_2SO_4 , concentre à 25 ml au vide à 30° puis fait couler la solution dans 100 ml d'acétate d'éthyle sous vigoureuse agitation. On lave le précipité à l'acétate d'éthyle et sèche au vide poussé à 30° . On obtient ainsi 4,78 g (63%) de *N-CBO-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide* commençant à fondre vers 100° . $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -45^{\circ} \pm 1,5^{\circ}$ ($c = 1,1$; acide acétique à 95%). $\text{Rfm}^{\circ} =$

³³) K. R. BHATTACHARYA, J. DATTA & D. K. ROY, Arch. Biochemistry Biophysics 77, 297 (1958).

0,6 (silicagel; chloroforme/méthanol 7:3); Rfm° = 0,4 (Al₂O₃; chloroforme/méthanol 7:3; révélation par chlore).

C ₂₈ H ₃₇ O ₇ N ₇ S (615,7)	Calc. C 54,6 Tr. ,, 54,9	H 6,1 ,, 6,2	O 18,2 ,, 18,0	N 15,9 ,, 15,3	S 5,2% ,, 5,4%
----------------------------------------------------------------------------	-----------------------------	-----------------	-------------------	-------------------	-------------------

b) A une solution de 3,25 g (5,56 mmoles) de N- α -CBO-G-tosyl-L-arginate de *p*-nitrophényle¹⁵) dans 15 ml d'acide acétique, on ajoute 30 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à 20° puis fait couler la solution dans 400 ml d'éther vivement agité. Le précipité est recueilli, lavé à l'éther, séché au vide à 20°, sur KOH. Les 3,09 g de produit obtenus sont dissous dans 20 ml d'acétone, additionnés, après refroidissement à 0°, de 1,30 ml de triéthylamine (9,3 mmoles; quantité correspondant aux ions Br⁻ présents, déterminés par argentométrie) et ajoutés aussitôt à une solution, préparée au moment de l'emploi par dissolution, dans 12 ml d'acétone anhydre, de 1,30 g (5,20 mmoles) de N-CBO-L-proline¹⁸) et de 0,71 ml (5,07 mmoles) de triéthylamine, refroidissement à -5°, adjonction de 0,50 ml (5,21 mmoles) de chloroformiate d'éthyle et séjour de 5 min à -5°. On agite la solution 3 h à +10°, éloigne le précipité de chlorhydrate de triéthylamine et évapore le filtrat au vide à 20°. Le résidu est repris dans 100 ml de chloroforme et lavé successivement par HCl 1N, H₂O, NaHCO₃ 1N, H₂O, séché sur Na₂SO₄ et évaporé au vide à 25°. Au résidu d'évaporation, on ajoute une solution de 378 mg (5,10 mmoles) de glycineamide dans 8 ml de diméthylformamide et laisse reposer 20 h à 20°. L'addition de 120 ml d'éther fait précipiter un produit huileux qu'on sépare, dissout dans 100 ml de chloroforme et lave successivement par HCl 1N, Na₂CO₃ 1N, NaOH 0,2N et H₂O jusqu'à neutralité; par séchage sur Na₂SO₄ de la solution chloroformique, évaporation au vide puis séchage au vide poussé à 30°, on obtient 1,63 g (52%) de N-CBO-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide présentant les mêmes caractéristiques que le produit obtenu sous a).

L-Prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (VII). On dissout 4,44 g (7,21 mmoles) d'amide tripeptidique VI dans 10 ml d'acide acétique, ajoute 20 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à 20°, puis fait couler la solution dans 500 ml d'éther sec sous vigoureuse agitation. Le précipité essoré, lavé à l'éther et séché au vide à 20° est dissous dans 70 ml d'eau; une petite quantité de produit non dissous est séparée par filtration. Au filtrat, on ajoute 70 ml de méthanol et la solution est passée sur 60 ml d'Amberlite IRA-410 (forme basique); on lave la résine par 100 ml de méthanol à 50%, évapore les filtrats réunis au vide à 30°, reprend plusieurs fois le résidu par un mélange d'éthanol et de benzène absolus, en évaporant chaque fois au vide. Après séchage au vide poussé à 40°, on obtient 3,35 g (96%) de L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide commençant à fondre vers 72°. [α]_D²¹ = -23° ± 1,5° (c = 1,5; acide acétique à 95%). R_M⁰ = 0,58; R_F⁰ = 0,36; R_F⁰ = 0,54 (en présence d'un équivalent de HBr); E_{1,9}⁰ = 0,9 Try; E_{8,8}⁰ = 0,7 His (révélation par isatine, chlore et ninhydrine).

C ₂₀ H ₃₁ O ₅ N ₇ S (481,6)	Calc. C 49,9 Tr. ,, 48,8	H 6,5 ,, 6,7	O 16,6 ,, 17,7	N 20,4 ,, 19,4	S 6,7% ,, 6,1%
C ₂₀ H ₃₁ O ₅ N ₇ S, 1/2 H ₂ O (490,6)	Calc. ,, 49,0 Tr. ,, 48,8	,, 6,6 ,, 6,7	,, 17,9 ,, 17,7	,, 20,0 ,, 19,4	,, 6,5% ,, 6,1%

CBO-L-Glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (VIII). Dans 28 ml de diméthylformamide, on dissout successivement 2,86 g (5,94 mmoles) de tripeptide VII et 3,57 g (5,83 mmoles) de CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-azide²⁰). La solution est secouée 22 h à 20°, sous lente concentration au vide, puis additionnée de 180 ml d'acétone. Le gel formé est essoré, lavé deux fois par 20 ml de mélange diméthylformamide/acétone 1:8, deux fois par 20 ml d'acétone puis séché au vide poussé à 40°. On obtient 3,98 g (65%) de CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide de F. 184-186°. [α]_D²² = -47° ± 1° (c = 1,7; acide acétique à 95%). Rfm° = 0,8 (Al₂O₃; acide acétique à 95%; révélation par chlore).

C ₄₇ H ₆₂ O ₁₂ N ₁₂ S ₂ (1051,2)	Calc. C 53,7 Tr. ,, 53,9	H 5,9 ,, 6,4	O 18,3 ,, 18,1	N 16,0 ,, 16,3	S 6,1% ,, 6,0%
--------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------	-----------------	-------------------	-------------------	-------------------

L-Glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (IX). On dissout 3,87 g (3,68 mmoles) d'hexapeptide protégé VIII dans 20 ml d'acide acétique anhydre en chauffant légèrement, refroidit à 20°, ajoute 100 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à 20° puis fait couler la solution dans 500 ml d'éther sec vigoureusement agité. Le précipité est lavé à l'éther, séché au vide à 20° puis dissous dans

16 h à 110°), après oxydation à l'acide performique, fournit les acides aminés constituants dans les rapports attendus. Pour l'analyse, une prise est séchée 8 h à 100°.

$C_{46}H_{65}O_{11}N_{15}S_2$ (1068,3)	Calc.	C 51,7	H 6,1	O 16,5	N 19,7	S 6,0%
$C_{46}H_{65}O_{11}N_{15}S_2 \cdot \frac{1}{2}CH_3COOH$	„ „	51,4	„ 6,1	„ 17,5	„ 19,1	„ 5,8%
(1098,3)	Tr.	„ 51,2	„ 6,5	„ 17,1	„ 19,4	„ 5,7%

Activités biologiques, exprimées en unités internationales par mg de base libre: utérus isolé de Rat environ 0,2; baisse de la pression sanguine du Coq < 1; pression interne de la glande mammaire du Lapin 3 (\pm 0,4); pression sanguine du Rat 122 (\pm 13); inhibition de la diurèse du Rat environ 350.

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalaninyl-L-isoleucinate de p-nitrophényle (XIII). A une solution de 9,85 g (20,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanine^{1,3,13}) dans 40 ml de diméthylformamide, on ajoute 6,66 g (20,0 mmoles) de bromhydrate d'isoleucinate de *p*-nitrophényle⁹), refroidit à 0°, ajoute 2,80 ml (20,0 mmoles) de triéthylamine et aussitôt après 40 ml d'acétonitrile et 4,33 g (21,0 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide. Après 1 h d'agitation à 0° et 4 h à 20°, le précipité de dicyclohexylurée est essoré, et l'acétonitrile, éloigné au vide à 25°. La solution est additionnée de 400 ml d'acétate d'éthyle et lavée successivement par H₂O, HCl 1 N, NaCl 5%, NaHCO₃ 1 N et H₂O, séchée brièvement sur Na₂SO₄, évaporée au vide et séchée au vide poussé à 20°. Le produit obtenu (14,2 g) est secoué $\frac{1}{2}$ h dans 100 ml d'éthanol absolu, séparé par centrifugation, lavé à l'éthanol, à l'éther, puis séché au vide à 20°. On obtient ainsi 9,5 g (65%) de produit de F. 167–169°, qu'on cristallise en l'introduisant, finement pulvérisé, dans 400 ml d'éthanol absolu bouillant; on maintient l'ébullition 30 s puis filtre aussitôt, le filtrat étant immédiatement refroidi dans de la glace. La fraction non dissoute demeurée sur le filtre est traitée de même manière par 150 ml d'éthanol bouillant, dans lequel elle se dissout presque complètement. Les filtrats réunis sont conservés quelques heures à –15°. On essore le produit s'étant séparé, le lave successivement par de l'éthanol et de l'éther; on obtient ainsi, après séchage au vide poussé à 25°, 6,81 g (47%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalaninyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle de F. 172–175°, demeurant inchangé par recristallisation. $[\alpha]_D^{25} = -29^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,7$; acide acétique à 95%); $-38^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,6$; diméthylformamide). Rfm^o = 0,9 (Al₂O₃; chloroforme/méthanol 7:3; révélation par chlore). Rf_p^o = 0,95; E_{1,9}^a = 0,67 Try (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{39}H_{42}O_8N_4S$	Calc.	C 64,4	H 5,8	O 17,6	N 7,7	S 4,4%
(726,9)	Tr.	„ 64,8	„ 5,8	„ 17,5	„ 7,7	„ 4,5%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalaninyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-g-tosyl-L-arginyl-L-glycinamide (XIV). On dissout 1,37 g (1,49 mmole) d'hexapeptide IX dans 3 ml de diméthylformamide en chauffant légèrement, ajoute, après refroidissement, 1,09 g (1,50 mmole) d'ester tripeptidique XIII et laisse reposer une nuit à 25°. On triture la masse durcie dans 12 ml d'acétone, essore le précipité et le lave au moyen du mélange diméthylformamide/acétone 1:4 puis à l'acétone. Le solide obtenu (1,70 g) est suspendu pendant 30 s dans 8 ml de méthanol bouillant, essoré, puis soumis encore 2 fois au même traitement. On obtient ainsi 1,48 g (66%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalaninyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-g-tosyl-L-arginyl-L-glycinamide, F. 238–240°. $[\alpha]_D^{21} = -49^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,6$; acide acétique à 95%); $-39^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,8$; diméthylformamide). Rf_A^a = 0,72; E_{1,9}^a = 0,45 Try; E_{5,8}^a = 0,5 Try (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{72}H_{93}O_{15}N_{15}S_3$	Calc.	C 57,5	H 6,2	O 15,9	N 14,0	S 6,4%
(1504,9)	Tr.	„ 57,4	„ 6,6	„ 16,3	„ 14,1	„ 6,5%

Phé²-Ile³-Arg³-vasopressine (XV). On dissout 1,25 g (0,83 mmole) de nonapeptide protégé XIV dans 200 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute lentement du sodium jusqu'à persistance de la teinte bleue. Après adjonction de 900 mg de NH₄Cl, on évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 850 ml d'acide acétique 0,01 N, ajuste le pH à 8,0 et fait passer un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. On acidifie à pH 4,5, concentre à 200 ml au vide à 30°, adsorbe le peptide sur 65 ml d'Amberlite IRC-50 (XE-64) (forme acide), élimine les sels présents³⁴) par lavage de la résine avec 400 ml d'acide acétique à 5% puis élue la substance au moyen de 250 ml d'acide acétique à 50%. L'éluat est concentré au vide à 25° et le résidu sirupeux est soumis à une distribution en contre-courant dans le système *sec*-butanol/eau/

acide trifluoracétique 120:160:1. Après 201 transferts, on détermine sur des aliquotes³⁶⁾ la position du sommet principal ($K = 0,49$), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore le *sec*-butanol au vide à 25°, fait passer la solution résiduelle sur 50 ml d'Amberlite IR 45 (cycle acétate) pour éliminer l'acide trifluoracétique, évapore au vide à 25° et reprend le résidu dans 200 ml d'acide acétique 0,01 N. Cette solution contient 41,6 mg d'azote peptique, ce qui correspond à 205 mg de base libre de Ph²-Ile³-Arg⁸-vasopressine. $E_{1,9}^0 = 0,95$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,7$ His (révélation par chlore, SAKAGUCHI et ninhydrine). L'hydrolyse acide (HCl 6N, 16 h à 110°), après oxydation à l'acide performique, fournit les acides aminés constituants dans les rapports attendus. Pour l'analyse, on lyophilise une partie de la solution et sèche le résidu 8 h à 100°.

$C_{43}H_{67}O_{11}N_{15}S_2$ (1034,3)	Calc. C 49,9	H 6,5	N 20,3	S 6,2%
$C_{48}H_{67}O_{11}N_{15}S_2, 1\frac{1}{2}CH_3COOH$ (1124,3)	Tr. „ 49,3	„ 6,7	„ 18,8	„ 5,4%
	„ „ 49,1	„ 6,5	„ 18,7	„ 5,7%

Activités biologiques, exprimées en unités internationales par mg de base libre: utérus isolé de Rat 2 ($\pm 0,4$); baisse de la pression sanguine du Coq environ 10; pression interne de la glande mammaire du Lapin environ 10; pression sanguine du Rat 125 (± 15); inhibition de la diurèse du Rat 109 (± 13).

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de p-nitrophényle (XVI). On dissout 5,09 g (10,0 mmoles) de *N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosine*²⁰⁾ 27) dans 30 ml de diméthylformamide, ajoute 100 ml d'acétonitrile, 3,67 g (10,0 mmoles) de bromhydrate de *L-phénylalaninate de p-nitrophényle*²¹⁾, refroidit à 0°, introduit encore 1,40 ml (10,0 mmoles) de triéthylamine et aussitôt après 2,30 g (11,1 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide. Après 1 h d'agitation à 0° et 4 h à 20°, on essore la dicyclohexylurée formée, évapore l'acétonitrile au vide à 35°, reprend dans 250 ml d'acétate d'éthyle, lave 4 fois par H₂O et NaHCO₃ 1N alternativement, puis par HCl 1N, NaCl 30%, sèche sur Na₂SO₄ et évapore au vide à 30°. Le résidu cristallin est recristallisé dans 300 ml de méthanol bouillant. Après un séjour de 4 h à 0°, essorage et lavage au méthanol puis à l'éther, on obtient 3,79 g de *N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de p-nitrophényle* de F. 169°. Du filtrat concentré au vide à 100 ml et laissé 1 nuit à 0°, on recueille une seconde fraction (0,81 g, F. 169°; rendement total 59%). Sans scission préalable, le produit est homogène en chromatographie sur couche mince de silicagel dans le système chloroforme/méthanol 9:1, après révélation au chlore et à l'ammoniac. $[\alpha]_D^{21} = -38^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide); $-26^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; acide acétique à 95%).

$C_{42}H_{40}O_9N_4S$ (776,9)	Calc. C 64,9	H 5,2	O 18,5	N 7,2	S 4,1%
	Tr. „ 64,6	„ 5,3	„ 18,5	„ 7,1	„ 4,1%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-protyll-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (XVII). Dans 3,5 ml de diméthylformamide, on dissout 1,83 g (2,00 mmoles) d'hexapeptide IX et 1,55 g (2,00 mmoles) d'ester tripeptidique XVI. Après un séjour de 60 h à 20°, le gel obtenu est trituré dans 14 ml d'acétone, essoré, lavé à l'acétone puis séché au vide poussé à 40°. Le produit (2,53 g) est purifié par triple suspension dans chaque fois 10 ml de méthanol bouillant, avec essorages intermédiaires. Après séchage au vide poussé à 40°, on obtient 1,86 g (60%) de *N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-protyll-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide* de F. 188° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -42,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,5$; acide acétique à 95%); $-37^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,5$; diméthylformamide). $Rf_M^A = 0,9$; $Rf_A^A = 0,75$; $E_{1,9}^A = 0,5$ Try (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{75}H_{91}O_{16}N_{15}S_3$ (1554,9)	Calc. C 57,9	H 5,9	O 16,5	N 13,5	S 6,2%
	Tr. „ 57,6	„ 6,0	„ 16,5	„ 13,2	„ 6,3%

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-protyll-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (XVIII). Dans 5 ml de diméthylformamide, on dissout 825 mg (0,90 mmole) d'hexapeptide IX et 630 mg (0,90 mmole) de *N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-azide*²⁸⁾ et agite 22 h à 20° sous lente concentration au vide. L'adjonction de 35 ml d'acétate d'éthyle fait précipiter le produit qu'on sépare par centrifugation, lave trois fois à l'acétate d'éthyle, sèche au vide à 20° et purifie en le suspendant 3 fois dans 10 ml

³⁶⁾ R. A. BOISSONNAS & G. PREITNER, *Helv.* 36, 875 (1953); K. SATAKE & J. M. LUCK, *Bull. Soc. chim. biol.* 40, 1743 (1958).

de méthanol bouillant, en essorant chaque fois. Après séchage au vide poussé à 40°, on obtient 533 mg (37%) de *N*-tosyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-tyrosyl-*L*-phénylalaninyl-*L*-glutaminy-*L*-asparaginyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-prolyl-*G*-tosyl-*L*-arginyl-glycinamide de F. 198–199° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -18,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-47^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,2$; acide acétique à 95%). Rfm° = 0,8 (Al₂O₃; acide acétique à 95%; révélation par chlore).

C ₇₄ H ₉₁ O ₁₆ N ₁₅ S ₄	(1574,9)	Calc.	C 56,4	H 5,8	O 16,3	N 13,3	S 8,1%
C ₇₄ H ₉₁ O ₁₆ N ₁₅ S ₄ ·1H ₂ O	(1592,9)	„	„ 55,8	„ 5,9	„ 17,1	„ 13,2	„ 8,1%
		Tr.	„ 55,5	„ 6,1	„ 17,2	„ 13,0	„ 8,3%

Arg⁸-vasopressine (XIX). On dissout 271 mg (0,170 mmole) de nonapeptide protégé XVIII dans 80 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute lentement du sodium jusqu'à persistance de la coloration bleue. Après adjonction de 0,26 ml d'acide acétique anhydre, on évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 180 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 7,6 et fait passer un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. On acidifie à pH 4,5, concentre à 50 ml au vide à 30°, ajoute 0,31 ml d'acide trifluoroacétique, équilibre avec du *sec*-butanol et introduit le mélange dans les 2 premiers tubes d'un appareil de distribution en contre-courant. Après 198 transferts dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoroacétique 120:160:1, on détermine sur des aliquotes³⁵) la courbe de répartition. Le contenu des tubes centraux du sommet principal ($K = 0,46$) est réuni et évaporé à sec au vide à 20°. Le résidu contient 18,5 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 95 mg de base libre d'*Arg⁸-vasopressine*. $E_{1,9}^0 = 0,95$ Try; $E_{9,8}^0 = 0,7$ His; $Rf_A^0 = 0,5$ (révélation par ninhydrine, chlore et Folin). L'hydrolyse totale (HCl 6N, 16 h à 110°), avec ou sans oxydation préalable à l'acide performique, fournit les acides aminés constituants dans les rapports attendus.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales par mg de base libre: utérus de Rat isolé 16 (± 4); baisse de la pression sanguine du Coq 57 (± 6); pression interne de la glande mammaire du Lapin 64 (± 8); pression sanguine du Rat 380 (± 38); inhibition de la diurèse du Rat 420 (± 42).

*N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminy-*L*-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-G-tosyl-L-arginyl-glycinamide (XX)*. Dans 4 ml de diméthylformamide, on dissout successivement 1,83 g (2,00 mmoles) d'hexapeptide IX et 1,53 g (2,00 mmoles) de *N*-tosyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucinate de *p*-nitrophényle⁸) et laisse séjourner 16 h à 20°. On triture le gel obtenu dans 16 ml d'acétone, centrifuge, décante, suspend le culot dans un mélange de diméthylformamide/acétone 1:6, puis 3 fois dans l'acétone, en centrifugeant et décantant chaque fois. On sèche au vide poussé à 30° et purifie la substance dans la suspensant 4 fois dans 10 ml de méthanol bouillant, en filtrant chaque fois. Après séchage au vide poussé à 60°, on obtient 1,64 g (53%) de *N*-tosyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucyl-*L*-glutaminy-*L*-asparaginyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-prolyl-*G*-tosyl-*L*-arginyl-glycinamide (XX) de F. 236–8°. $[\alpha]_D^{25} = -56^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,3$; acide acétique 95%); $-20^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide).

C ₇₁ H ₈₈ O ₁₆ N ₁₆ S ₄	(1540,9)	Calc.	C 55,3	H 6,1	O 16,6	N 13,6	S 8,3%
		Tr.	„ 55,1	„ 6,3	„ 17,0	„ 13,4	„ 8,4%

Arg⁸-vasotocine (XXI). On dissout 919 mg (0,596 mmole) de nonapeptide protégé XX dans environ 200 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute lentement du sodium jusqu'à persistance de la coloration bleue. Après adjonction de 0,60 g de NH₄Cl, on évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 600 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,2 et fait passer un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. On acidifie à pH 4,5, concentre au vide à 30° puis, à plusieurs reprises, reprend par de petites quantités d'eau et concentre à nouveau, pour éliminer la majeure partie de l'acide acétique. Après lyophilisation, le résidu est introduit dans les trois premiers tubes d'un appareil de distribution en contre-courant. Après 200 transferts dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoroacétique 120:160:1, on détermine sur des aliquotes³⁵) la courbe de répartition. Le contenu des tubes centraux du sommet principal ($K = 0,39$) est concentré au vide pour chasser le *sec*-butanol, puis on fait passer la solution aqueuse sur 130 ml d'Amberlite IRA-410 (forme acétate) et lave encore par 400 ml d'acide acétique 0,01N. L'analyse indiquant la présence de sels d'ammonium, on fait passer la solution sur 35 ml d'Amberlite IRC-50 (XE-64)³⁴), élue les sels par 250 ml d'acide acétique 0,2N puis la substance par 125 ml d'acide acétique à 50%. Après concentration au vide à 30°, plusieurs reprises par de petites quantités d'eau suivies de concentrations et, finalement, lyophilisation, on obtient 248 mg de poudre

blanche contenant 39 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 195 mg de base libre d'Arg⁸-vasotocine. Un échantillon de cette poudre, séché au vide 8 h à 100° (perte de poids: 12%), donne l'analyse d'un diacétate. Le produit est homogène à l'électrophorèse: $E_{2,8}^0 = 0,7$ His; $E_{1,9}^0 = 0,95$ Try (révélation par ninhydrine, FOLIN, chlore et SAKAGUCHI). La détermination selon MOORE & STEIN³⁷) des acides aminés présents, effectuée après hydrolyse totale (HCl 6N, 24 h à 110°, en l'absence d'oxygène), a fourni les résultats suivants³⁸) exprimés en rapports moléculaires (entre parenthèses les résultats calculés): cystine 0,94 (1,00); Tyr 0,94 (1,00); Ile 1,04 (1,00); Glu 1,09 (1,00); Asp 1,11 (1,00); Pro 1,05 (1,00); Arg 0,96 (1,00); Gly 1,02 (1,00); NH₃ 3,34 (3,00).

$C_{43}H_{67}O_{12}N_{15}S_2$ (1050,3)	Calc. C 49,2	H 6,4	O 18,3	N 20,0	S 6,1%
$C_{43}H_{67}O_{12}N_{15}S_2 \cdot 2CH_3COOH$ (1170,4)	„ „ 48,2	„ 6,5	„ 21,9	„ 18,0	„ 5,5%
	Tr. „ 48,5	„ 7,4	„ 22,2	„ 17,8	„ 5,7%

Activités biologiques, exprimées en unités internationales par mg de base libre: utérus isolé de Rat 115 (± 15); baisse de la pression sanguine du Coq 285 (± 40); pression interne de la glande mammaire du Lapin environ 210; pression sanguine du Rat 245 (± 15); inhibition de la diurèse du Rat 250 (± 35).

SUMMARY

Syntheses of arginine-vasopressin, arginine-vasotocin, and of their deoxy analogues, Phe²-arginine-vasopressin and Phe²-arginine-vasotocin, are described, in which a tosyl group is used for the transitory protection of the guanido group of the arginine residue. Absence of the phenolic hydroxyl group decreases the main biological activities, but in a lower extent than in the corresponding families of oxytocin and lysine-vasopressin.

Laboratoires de chimie pharmaceutique,
SANDOZ SA., Bâle

³⁷) ST. MOORE & W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 192, 663 (1951); 211, 893 (1954).

³⁸) Cette analyse a été effectuée par le Dr R. WEBER, de l'Institut de Chimie organique de l'Université, Bâle.

192. Pyridinderivate als Komplexbildner III. Komplexbildung des dreiwertigen Eisen-Ions mit 1,10-Phenanthrolin und α, α' -Dipyridyl¹⁾

von G. Anderegg

(6. VI. 62)

BLAU²⁾, der Entdecker von 1,10-Phenanthrolin, bemerkte schon vor ca. 60 Jahren, dass man zwei ganz verschieden gefärbte Verbindungen aus Phenanthrolin und dreiwertigem Eisen-Ion erhalten kann. Eine blaue Verbindung entsteht durch Oxydation

¹⁾ In der zweiten Publikation dieser Reihe (G. ANDEREGG, Helv. 43, 1530 (1960)) wurde irrtümlicherweise für die Stabilitätskonstante des zweiwertigen Eisen-Ions mit Dipicclinat β_2^{II} der Wert von $10^{10,86}$ anstatt der richtige von $10^{10,36}$ benützt. Vgl. G. ANDEREGG, Helv. 43, 414 (1960). Das durch diesen Wert berechnete β_2^{III} muss entsprechend korrigiert werden, d. h. $10^{16,63}$ anstatt $10^{17,13}$. Zusätzlich sind in derselben Arbeit folgende Korrekturen zu berücksichtigen:

a) in Gl. 4: $\sum_{r,s,t} s$ statt $\sum_{r,s,t} r$ b) in Gl. 10: E_0 statt E'_0
c) in Gl. (12): $s \log \frac{(Ox/c)^{1/r} c^{1/r}}{(1-Ox/c) c}$ statt $s \log \frac{(Ox^{1/r})/c c^{1/r}}{1-Ox/c c}$

d) in Tab. 1: $r = \infty$ statt $r = 4$

²⁾ F. BLAU, Mh. Chem. 19, 666 (1898).