

- [12] T. C. BRUCE & U. K. PANDIT, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 5859 (1960).
- [13] HOUBEN-WEYL, *loc. cit.* [10], Bd. XI/1, S. 939; A. FLEISCHER, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **9**, 995 (1876); W. KELBE, *ibid.* **16**, 1199 (1883); F. JUST, *ibid.* **19**, 1202 (1886); M. FREUND & B. B. GOLDSMITH, *ibid.* **21**, 2461 (1888); H. R. HIRST & J. B. COHEN, *J. chem. Soc.* **67**, 830 (1895); A. GALAT & G. ELION, *J. Amer. chem. Soc.* **65**, 1566 (1943).
- [14] D. KLAMANN, *Mh. Chem.* **84**, 924 (1953); R. JAUNIN, *Helv.* **35**, 1414 (1952); R. JAUNIN, M. BERETTA PICCOLI & T. CHARALAMBOUS, *ibid.* **37**, 216 (1954).
- [15] M. E. SMITH & H. ADKINS, *J. Amer. chem. Soc.* **60**, 657 (1938).
- [16] B. C. BARRASS & D. T. ELMORE, *J. chem. Soc.* **1957**, 4830.
- [17] R. W. HOLLEY & A. D. HOLLEY, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 3069 (1952).
- [18] O. WIDMAN, *J. prakt. Chem.* [2] **47**, 343 (1893).
- [19] H. L. WHEELER, *Amer. chem. J.* **27**, 270 (1902).
- [20] C. J. M. STIRLING, *J. chem. Soc.* **1958**, 4531.
- [21] L. F. FIESER & M. FIESER, «Advanced Organic Chemistry», Reinhold Publishing Corp., New York 1961, S. 519–520.

202. Synthèse de l'Ala¹-Ala⁶-Arg⁸-vasopressine et de l'Ala¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressine, ainsi que de la (désamino-Ala)¹-Ala⁶-Arg⁸-vasopressine et de la (désamino-Ala)¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressine

par R. L. Huguenin et St. Guttmann

(28 IX 65)

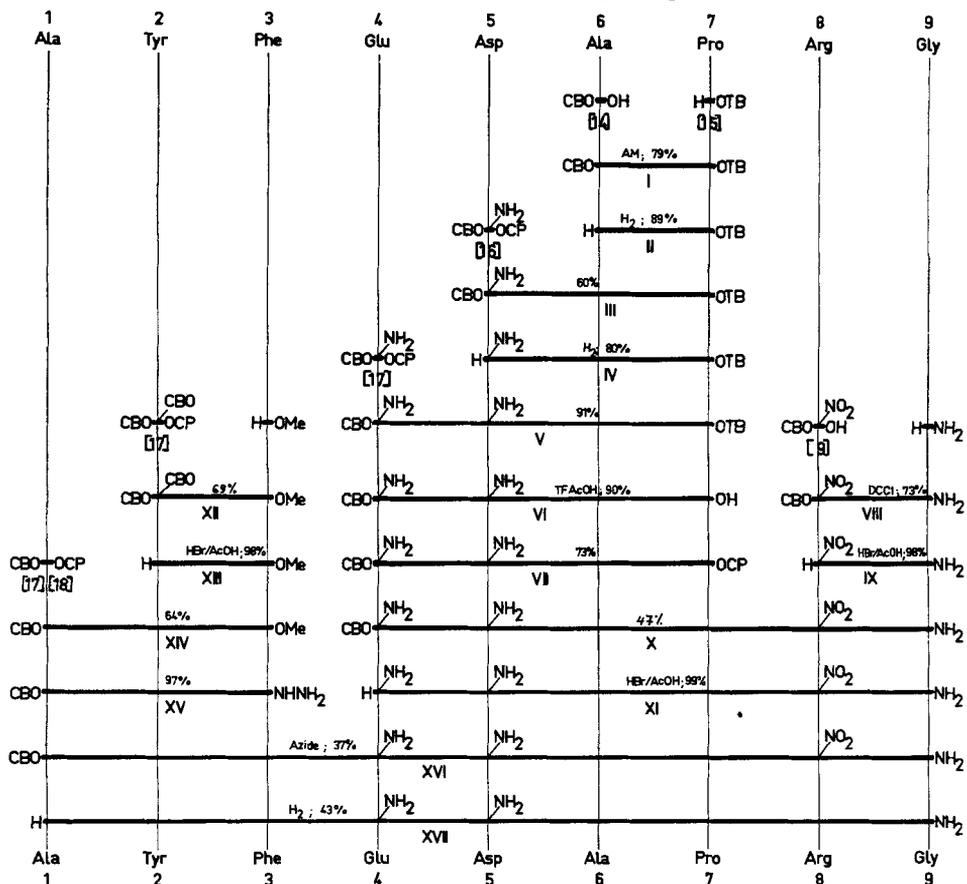
Un grand nombre d'analogues de l'oxytocine et des vasopressines ont été synthétisés jusqu'ici, en vue de déterminer quels éléments de structure étaient indispensables à l'activité biologique de ces hormones (revue: [1]). L'importance du cycle à 20 atomes, fermé par un groupe disulfure, est démontrée par le fait que l'Ala¹-Ala⁶-oxytocine, obtenue par désulfuration de l'oxytocine au moyen de nickel de RANEY [2], ou par synthèse totale [3], est dépourvue d'activité biologique. Il n'est même pas nécessaire de supprimer les atomes de soufre pour obtenir une disparition de l'activité. Déjà la simple ouverture du cycle de l'oxytocine par réduction du groupe disulfure en deux fonctions thiol donne un produit inactif, l'oxytocéine [4]. Par contre, le remplacement d'un des atomes de soufre par un groupe méthylène dans la molécule biologiquement très active de la désamino-oxytocine conduit à un dérivé encore doué d'activités oxytociques appréciables [5], ce qui montre que c'est la présence d'un cycle et non celle d'un pont disulfure qui est indispensable à l'action biologique et ce qui réfute en même temps l'hypothèse selon laquelle l'oxytocine se fixerait sur des groupes thiol de récepteur [6].

Récemment, d'autre part, FONG et coll. [7] ont rapporté que l'Ala¹-Ala⁶-arginine-vasopressine obtenue par désulfuration de l'arginine-vasopressine au moyen de nickel RANEY, bien que dénuée d'activité antidiurétique, posséderait toutefois une activité pressorique encore relativement importante. Comme ce résultat nous semblait en contradiction avec les observations rapportées ci-dessus dans la série de l'oxytocine, nous avons décidé de vérifier celui-ci par une méthode évitant tout risque de contamination par de l'arginine-vasopressine non désulfurée. Nous avons synthétisé l'Ala¹-

Ala⁶-Arg⁸-vasopressine à partir des acides aminés constituants. Par la même occasion, nous avons aussi préparé son dérivé α -désaminé, la (désamino-Ala)¹-Ala⁶-Arg⁸-vasopressine, car il est connu que le groupe α -amino N-terminal n'est pas indispensable à l'activité biologique de l'oxytocine et des vasopressines [8]; nous avons également synthétisé les deux dérivés correspondants dans la série de la lysine-vasopressine: l'Ala¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressine et la (désamino-Ala)¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressine. Ces différents corps ont été préparés pour mettre en évidence l'importance de la structure cyclique pour la manifestation de l'activité biologique ou d'un effet inhibiteur éventuel.

Les méthodes de condensation ont été choisies de manière à éviter tout risque de racémisation. La synthèse de ces analogues a été effectuée selon un même plan (schémas 1 à 4), consistant à condenser, par la méthode à l'azide, l'hexapeptide C-terminal

Schéma 1. Synthèse de l'Ala¹-Ala⁶-Arg⁸-vasopressine



Abréviations: CBO- = benzyloxycarbonyle; CTB- = *t*-butyloxycarbonyle; Prop.- = propionyle; -CP = trichloro-2,4,5-phényle; -TB = *t*-butyle; AM = condensation par anhydride mixte; DCCI = condensation par dicyclohexyl-carbodiimide; H₂ = hydrogénation catalytique; AcOH = acide acétique; TFACOH = acide trifluoroacétique.

(4-9) avec le tripeptide (resp. propionyl-dipeptide) N-terminal synthétisé par la méthode récurrente à l'esther actif. L'hexapeptide C-terminal (4-9) a été lui-même préparé par condensation, par la méthode à l'esther actif, du tétrapeptide 4-7 au niveau de la proline avec un dipeptide-amide 8-9, l'acide aminé en position 8 étant l'arginine ou la lysine. L'absence de cystéine a permis d'utiliser, pour la protection du groupe guanidino de l'arginine, le groupe nitro [9], éliminable en fin de synthèse par hydrogénation catalytique et permettant intermédiairement la scission sélective des groupes benzyloxycarbone par le gaz bromhydrique dans l'acide acétique. Pour la protection de la chaîne latérale de la lysine, nous avons employé le groupe *t*-butyloxy-

Schéma 2. Synthèse de l'Ala¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressine

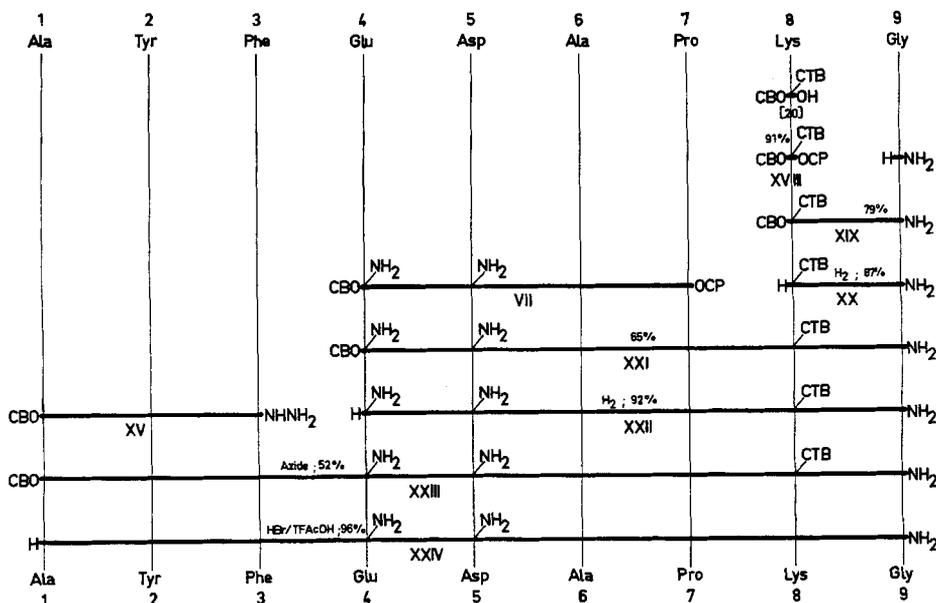


Schéma 3. Synthèse de la (désamino-Ala¹)-Ala⁶-Arg⁸-vasopressine

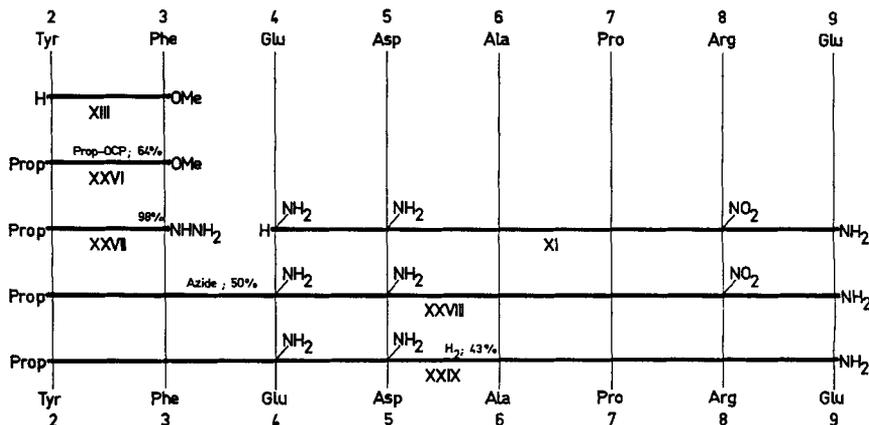
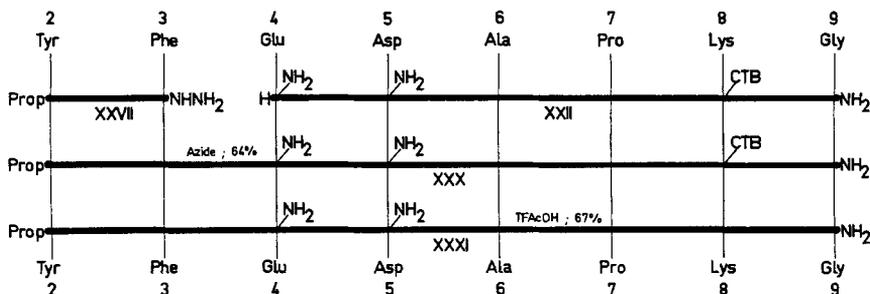


Schéma 4. Synthèse de la (désamino-Ala)¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressine

Abréviations: voir schéma 1.

carbonyle [10], permettant l'enlèvement sélectif de groupes benzyloxycarbonyle par hydrogénation catalytique au cours de la synthèse, lui-même étant éliminable par traitement acide en fin de synthèse. Après scission de tous les groupes protecteurs, les nonapeptides (resp. propionyl-octapeptides) libres ont été soumis à une distribution en contre-courant.

Les essais pharmacologiques (voir tableau) ont été effectués par les Drs B. BERDE et E. STÜRMEER de notre Département de recherches médico-biologiques (Dir. Dr A. CERLETTI). Aucun des quatre analogues ne présente pratiquement d'activité biologique, ni ne possède d'effet inhibiteur envers l'oxytocine ou les vasopressines.

On peut supposer que le cycle à 20 atomes de l'oxytocine et des vasopressines, limite le nombre de formes stériques que peuvent prendre ces molécules et facilite ainsi leur fixation sur leurs récepteurs respectifs. S'il en est ainsi, l'absence de cycle dans les quatre analogues décrits dans ce travail devrait leur conférer une telle liberté de forme, que la probabilité qu'ils adoptent une configuration favorable à leur fixation sur leur récepteur serait fortement réduite. Ainsi pourrait s'expliquer l'absence d'activité ou d'effet inhibiteur de ces quatre analogues.

Partie expérimentale¹⁾

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 CRAIG [11]. Les chromatographies ont été effectuées selon la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040 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° sans scission préalable; Rf^a après scission des groupes benzyloxycarbonyle et *t*-butyloxycarbonyle par séjour de 40 min à 20° dans une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre.

Les électrophorèses sur papier ont été effectuées dans l'appareil à électrophorèse sous haute tension de WIELAND & PFLEIDERER [12]: à pH 1,9 ($E_{1,9}$) dans le mélange acide formique/acide acétique/eau (15:10:75); à pH 5,8 ($E_{5,8}$) dans le mélange pyridine/acide acétique/eau (9:1:90). $E_{1,9} = 0,8$ His indique qu'à pH 1,9, la substance migre 0,8 fois la distance que migre l'histidine. Les exposants a et o ont la même signification que pour les chromatogrammes.

Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et des phérogrammes ont été décrits précédemment [13].

¹⁾ Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr W. SCHÖNIGER).

I. Synthèse de l'Ala¹-Ala⁶-Arg⁸-vasopressine. — *N-Benzoyloxycarbonyl-L-alanyl-L-prolinate de t-butyle (I)*. On dissout 30,9 g (150 mmoles) de N-CBO-L-alanine [14] dans 200 ml d'acétate d'éthyle, ajoute 21,0 ml (150 mmoles) de triéthylamine, refroidit à -10° , ajoute sous forte agitation 14,5 ml (150 mmoles) de chloroformiate d'éthyle, agite 10 min, ajoute 36,0 g (200 mmoles) de L-prolinate de *t*-butyle [15], agite encore 3 h à 25° , lave successivement par H₂O, H₂SO₄ 1N, NH₄OH 1N et évapore au vide. On obtient ainsi 44,6 g (79%) de N-CBO-L-alanyl-L-prolinate de *t*-butyle sous forme d'une huile qui ne cristallise pas. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -90,5^{\circ}$ ($c = 1,0$; méthanol); $-93,2^{\circ}$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-58,4^{\circ}$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_{\text{M}}^{\text{a}} = 0,2$; $Rf_{\text{P}}^{\text{a}} = 0,2$; $Rf_{\text{A}}^{\text{a}} = 0,3$; $E_{1,9}^{\text{a}} = 1,2$ Glu; $E_{5,8}^{\text{a}} = 0,0$ (révélation par ninhydrine et chlore).

C₂₀H₂₈O₅N₂ (376,5) Calc. C 63,8 H 7,5 N 7,4% Tr. C 64,0 H 7,8 N 7,2%

N-Benzoyloxycarbonyl-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolinate de t-butyle (III). A une solution de 44,6 g (119 mmoles) d'ester dipeptidique I dans un mélange de 630 ml de méthanol et 70 ml d'eau on ajoute 10 g de catalyseur à 10% de palladium sur charbon actif et hydrogène à pression ordinaire. On filtre, évapore à sec, dissout le résidu dans du méthanol et évapore à sec. On répète cette opération trois fois. On dissout le résidu dans l'éther et ajoute de l'éther de pétrole jusqu'à début de cristallisation. Après 16 h à 0° on filtre, lave le précipité à l'éther de pétrole et sèche. On obtient ainsi 25,6 g (89%) de L-alanyl-L-prolinate de *t*-butyle (II) [F. 79–81°; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -92,3^{\circ}$ ($c = 1,0$; méthanol); $-102,8^{\circ}$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-62,7^{\circ}$ ($c = 1,0$; diméthylformamide)] que l'on dissout immédiatement dans 100 ml de diméthylformamide. On ajoute 44,5 g (100 mmoles) de N-CBO-L-asparaginate de trichloro-2,4,5-phényle [16] dissous dans 100 ml de dioxanne chaud et agite 16 h à 25° . Un dépôt cristallin se forme. On filtre, lave le précipité au dioxanne chaud, puis à l'éther, et sèche. On obtient 29,0 g (60%) de N-CBO-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolinate de *t*-butyle de F. 178°. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -82,0^{\circ}$ ($c = 1,0$; méthanol). $Rf_{\text{M}}^{\text{a}} = 0,03$; $Rf_{\text{P}}^{\text{a}} = 0,1$; $Rf_{\text{A}}^{\text{a}} = 0,2$; $E_{1,9}^{\text{a}} = 1,2$ Try; $E_{5,8}^{\text{a}} = 0$ (révélation par ninhydrine et chlore).

C₂₄H₃₄O₇N₄ Calc. C 58,8 H 7,0 N 11,4 O 22,8%
(490,6) Tr. „ 58,6 „ 7,1 „ 11,6 „ 22,6%

L-Asparaginyll-L-alanyl-L-prolinate de t-butyle (IV). On dissout 27,0 g (55 mmoles) d'ester tripeptidique III dans 700 ml de méthanol contenant 12 ml d'acide acétique, ajoute 6,0 g de catalyseur à 10% de palladium sur charbon actif et hydrogène à pression ordinaire. On filtre, évapore à sec, redissout le résidu huileux dans 200 ml de dioxanne chaud et laisse cristalliser à 25° . Il se produit une prise en masse. Après filtration, lavage à l'éther et séchage, on obtient 15,5 g (80%) de L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolinate de *t*-butyle de F. 156°. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -113,6^{\circ}$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_{\text{M}}^{\text{o}} = 0,6$; $Rf_{\text{P}}^{\text{o}} = 0,7$; $Rf_{\text{A}}^{\text{o}} = 0,5$; $E_{1,9}^{\text{o}} = 0,9$ Try; $E_{5,8}^{\text{o}} = 0,8$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

C₁₆H₂₈O₅N₄ Calc. C 53,9 H 7,9 N 15,7 O 22,4%
(356,4) Tr. „ 53,7 „ 8,0 „ 15,8 „ 22,6%

N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolinate de t-butyle (V). On suspend 14,5 g (40 mmoles) d'ester tripeptidique IV et 23,0 g (50 mmoles) de N-CBO-glutamate de trichloro-2,4,5-phényle [17] dans 50 ml de diméthylformamide, agite jusqu'à dissolution totale (env. 20 min) et laisse reposer 16 h à 25° . La masse cristalline formée est triturée dans l'acétate d'éthyle, puis, après filtration, lavée par suspension dans l'acétate d'éthyle à ébullition. Après filtration et séchage, on obtient 22,5 g (91%) de N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolinate de *t*-butyle de F. 185°. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -83,0^{\circ}$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $Rf_{\text{M}}^{\text{a}} = 0,02$; $Rf_{\text{P}}^{\text{a}} = 0,06$; $Rf_{\text{A}}^{\text{a}} = 0,1$; $E_{1,9}^{\text{a}} = 0,9$ Try; $E_{5,8}^{\text{a}} = 0$ (révélation par ninhydrine et chlore).

C₂₈H₄₂O₉N₆, 1/2 H₂O Calc. C 55,5 H 6,8 N 13,4 O 24,2%
(627,7) Tr. „ 55,6 „ 6,9 „ 13,3 „ 23,8%

N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-proline (VI). On dissout 6,3 g (10 mmoles) d'ester térapeptidique V dans 63 ml d'acide trifluoracétique, laisse reposer 1 h à 25° , évapore à sec, triture dans l'acétate d'éthyle jusqu'à pulvérisation complète, filtre, redissout dans 20 ml de diméthylformamide en chauffant légèrement, précipite à l'acétate d'éthyle, filtre et sèche.

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 sanguine du Rat	Inhibition de la diurèse du Rat
H-CyS-Tyr-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Arg-Gly-NH ₂ [] Arginine vasopressine	~20	~60	~400	~400
H-Ala-Tyr-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Ala-Pro-Arg-Gly-NH ₂ Ala ¹ -Ala ⁶ -Arg ⁸ -vasopressine (XVII)	< 0,2*	< 0,1*	0,025	0,08 ± 0,02
Propionyl-Tyr-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Ala-Pro-Arg-Gly-NH ₂ (Désamino-Ala ¹ -Ala ⁶ -Arg ⁸ -vasopressine (XXIX))	< 0,2*	< 0,1*	0,041	0,20 ± 0,03
H-CyS-Tyr-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂ [] Lysine vasopressine	5(± 0,5)	40(± 5)	270(± 20)	~250
H-Ala-Tyr-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Ala-Pro-Lys-Gly-NH ₂ Ala ¹ -Ala ⁶ -Lys ⁸ -vasopressine (XXIV)	< 0,2*	< 0,1*	0,012	0,05 ± 0,01
Propionyl-Tyr-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Ala-Pro-Lys-Gly-NH ₂ (Désamino-Ala ¹ -Ala ⁶ -Lys ⁸ -vasopressine (XXXI))	< 0,2*	< 0,1*	0,008	0,05 ± 0,01

* Aucune activité observée.

On obtient ainsi 5,0 g (90%) de N-CBO-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-proline de F. 172–175°. $[\alpha]_D^{20} = -68,4^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). Rf^a et E^a comme pour V.

$C_{25}H_{34}O_9N_6, H_2O$	Calc. C 51,8	H 6,2	N 14,5	O 27,5%
(580,6)	Tr. „ 51,9	„ 6,5	„ 14,9	„ 27,1%

N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolinate de trichloro-2,4,5-phényle (VII). On dissout 4,80 g (8,5 mmoles) de tétrapeptide VI dans 20 ml de pyridine absolue en chauffant à 50°, évapore à sec, redissout le résidu dans 20 ml de pyridine absolue, ajoute 5,00 g (8,1 mmoles) de tri-(trichloro-2,4,5-phényl)-phosphite [17] et agite 16 h à 25°. Après 2 h déjà, il se produit une prise en masse. On triture dans l'acétate d'éthyle, filtre, lave successivement à l'acétone, l'éther et l'éther de pétrole, puis sèche. On obtient ainsi 4,60 g (73%) de N-CBO-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolinate de trichloro-2,4,5-phényle de F. 191°. $[\alpha]_D^{20} = -71,8^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol). $E_{1,9}^a = 1,0$ Try; $E_{3,8}^a = 0$ (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{31}H_{35}O_9N_6Cl_3$	Calc. C 50,2	H 4,8	N 11,3	Cl 14,3%
(742,0)	Tr. „ 50,0	„ 5,2	„ 11,6	„ 14,3%

N-Benzoyloxycarbonyl-G-nitro-L-arginyl-glycinamide (VIII). A une solution de 15,7 g (44,5 mmoles) de N α -CBO-G-nitro-L-arginine [9] dans 50 ml de tétrahydrofurane on ajoute 3,30 g (44,5 mmoles) de glycinamide, dissous dans 40 ml d'acétonitrile/eau (4:1), refroidit à -10° , ajoute 9,20 g (44,5 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide, agite 16 h à 0°, ajoute 100 ml de pyridine, filtre et évapore à sec, reprend le résidu dans 200 ml du mélange *n*-butanol/acétate d'éthyle 1:1, porte à ébullition, filtre, lave à l'acétate d'éthyle et sèche. On obtient ainsi 13,2 g (73%) de N α -CBO-G-nitro-L-arginyl-glycinamide de F. 151°. $[\alpha]_D^{20} = -2,7^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,2$; $Rf_P^a = 0,1$; $Rf_A^a = 0,3$; $E_{1,9}^a = 1,1$ Glu; $E_{5,8}^a = 1,0$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{16}H_{23}O_6N_7$	Calc. C 46,9	H 5,7	N 23,9	O 23,4%
(409,4)	Tr. „ 47,1	„ 6,2	„ 24,0	„ 23,3%

N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-G-nitro-L-arginyl-glycinamide (X). On dissout 2,86 g (7,0 mmoles) d'ester dipeptidique VIII dans 30 ml d'une solution 4,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, laisse reposer 1 h à 25°, évapore à sec, triture à l'éther, filtre, lave à l'acétate d'éthyle, sèche, redissout dans 100 ml de méthanol, traite par 20 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle basique) et évapore à sec. On obtient ainsi 1,89 g (6,8 mmoles) de *G-nitro-L-arginyl-glycinamide (IX)* qu'on dissout dans 20 ml de diméthylformamide. Après addition de 4,50 g (6,0 mmoles) d'ester tétrapeptidique VII, on laisse séjourner la solution 96 h à 25°, puis ajoute 200 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave le précipité à l'acétone, redissout dans 70 ml de mélange dioxanne/eau 4:1, traite la solution ainsi obtenue par 15 g de Dowex 50W-X2 (cycle H⁺), évapore à sec et lave le résidu à l'acétone bouillante, à plusieurs reprises. On obtient ainsi 2,32 g (47%) de N-CBO-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-G-nitro-L-arginyl-glycinamide de F. 153–156°. $[\alpha]_D^{20} = -74,6^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,05$; $Rf_P^a = 0,04$; $Rf_A^a = 0,2$; $E_{1,9}^a = 0,7$ Try; $E_{5,8}^a = 0,2$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{33}H_{49}O_{12}N_{13}, H_2O$	Calc. C 47,3	H 6,1	N 21,7	O 24,8%
(837,8)	Tr. „ 47,0	„ 6,1	„ 21,6	„ 24,6%

L-Glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-G-nitro-L-arginyl-glycinamide (XI). On dissout 2,31 g (2,8 mmoles) d'amide hexapeptidique X dans 30 ml d'une solution 4,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, maintient 1 h à 25°, évapore à sec, triture dans l'éther, filtre, redissout le précipité dans 60 ml de méthanol et traite la solution obtenue par 25 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle basique). Dès que le pH de la solution dépasse 7, le produit commence à cristalliser. On ajoute 10 ml de diméthylformamide, filtre rapidement, lave la résine par 10 ml de diméthylformamide et évapore à sec les filtrats réunis. On recristallise le résidu dans 10 ml d'éthanol. On obtient ainsi 1,91 g (99%) de L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-G-nitro-L-arginyl-glycinamide de F. 170° (avec ramollissement à 164°). $[\alpha]_D^{20} = -67,8^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $E_{1,9}^a = 0,7$ Try (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{26}H_{43}O_{10}N_{13}$	Calc. C 43,8	H 6,3	N 26,6	O 23,3%
(685,7)	Tr. „ 43,7	„ 6,7	„ 26,5	„ 23,5%

O, N-Di-benzoyloxycarbonyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle (XII). A une solution, refroidie à 0°, de 44,3 g (205 mmoles) de chlorhydrate de L-phénylalaninate de méthyle dans 100 ml d'eau on ajoute une solution, refroidie également, de 24 g de carbonate de potassium dans 100 ml d'eau, extrait à l'acétate d'éthyle refroidi (3×75 ml), sèche rapidement sur sulfate de magnésium puis évapore l'acétate d'éthyle au vide à +5°. Au résidu (34,2 g) on ajoute 250 ml de diméthylformamide et 113,0 g (180 mmoles) de O, N-di-CBO-L-tyrosinate de trichloro-2, 4, 5-phényle [17] et secoue à 20°. La solution devient rapidement très épaisse. Après une nuit à 20°, on dilue la suspension par 150 ml d'acétate d'éthyle, filtre et lave le précipité par 350 ml d'acétate d'éthyle (le filtrat est placé à la glacière), puis successivement par de l'éther, HCl 1N et H₂O. Après séchage au vide poussé à 40°, on obtient 66,2 g de produit de F. 185–186°. De la liqueur-mère conservée à la glacière cristallisent encore 17,0 g de produit de même F. Les deux fractions réunies sont suspendues dans 1,25 l d'acétonitrile bouillant, puis laissées 3 h à la glacière. Après filtration, lavage à l'acétonitrile et séchage au vide poussé à 50°, on obtient 76,2 g (69%) de O, N-di-CBO-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle de F. 187–188°. $[\alpha]_D^{22} = -15,5 \pm 1^\circ$ ($c = 2,5$; diméthylformamide).

$C_{35}H_{34}O_6N_2$	Calc.	C 68,8	H 5,7	N 4,6	O 21,0%
(610,7)	Tr.	„ 68,8	„ 5,5	„ 4,8	„ 20,7%

L-Tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle, HBr (XIII). On dissout 60,0 g (98 mmoles) d'ester dipeptidique XII dans 600 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à 20°, évapore à sec au vide à 30°, reprend à trois reprises dans du méthanol anhydre en évaporant chaque fois à sec, triture le résidu dans l'éther pour le rendre pulvérisant, filtre, lave à l'éther et sèche au vide poussé à 20°. On obtient ainsi 40,9 g (98%) de L-tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle, HBr. $[\alpha]_D^{22} = +4,5 \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,1$; méthanol). $Rf_M^0 = 0,99$; $Rf_P^0 = 0,8$; $Rf_A^0 = 0,9$; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,8$ His (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN).

$C_{19}H_{23}O_4N_2Br$	Calc.	C 53,9	H 5,5	N 6,6	Br 18,9%
(423,3)	Tr.	„ 53,5	„ 5,4	„ 6,7	„ 18,8%

N-Benzoyloxycarbonyl-L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle (XIV). A une solution, refroidie à 0°, de 12,7 g (30,0 mmoles) de bromhydrate d'ester dipeptidique XIII dans 6 ml de diméthylformamide et 60 ml d'acétonitrile, on ajoute 4,20 ml (30,0 mmoles) de triéthylamine, 12,1 g (30,0 mmoles) de N-CBO-L-alaninate de trichloro-2, 4, 5-phényle [17] [18] et secoue une nuit à 25°. Le précipité formé est séparé, lavé par HCl 1N, H₂O, NaHCO₃ 1N, H₂O et séché au vide à 30° (fraction 1). Le filtrat diméthylformamide/acétonitrile est évaporé à sec au vide poussé à 30°, le résidu est dissous dans l'acétate d'éthyle, et la solution, lavée par HCl 1N, H₂O, NaHCO₃ 1N, H₂O, séché sur MgSO₄ et évaporée au vide (fraction 2). Les fractions 1 et 2 sont réunies, lavées soigneusement à l'éther, puis recristallisées dans l'acétonitrile. On obtient 10,5 g (64%) de N-CBO-L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle de F. 171°. $[\alpha]_D^{23} = -18^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,4$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,98$; $Rf_P^a = 0,7$; $Rf_A^a = 0,85$; $E_{1,9}^a = 0,9$ Try; $E_{5,8}^a = 0,8$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN et chlore).

$C_{30}H_{33}O_7N_3$	Calc.	C 65,8	H 6,1	N 7,7	O 20,5%
(547,6)	Tr.	„ 65,9	„ 6,2	„ 8,1	„ 20,6%

N-Benzoyloxycarbonyl-L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalananyl-hydrasid (XV). On dissout 10,0 g (18,3 mmoles) d'ester tripeptidique XIV dans 100 ml de méthanol anhydre chaud, refroidit à 30° environ, ajoute 10 ml d'hydrate d'hydrazine et laisse reposer une nuit à 25°. Le précipité formé est lavé au méthanol (6 fois 40 ml) et séché au vide poussé à 60°. On obtient ainsi 9,7 g (97%) de N-CBO-L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalananyl-hydrasid de F. 262°. $[\alpha]_D^{23} = -25^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$; diméthylformamide). $E_{1,9}^0 = 0,4$ Try (révélation par FOLIN et chlore).

$C_{29}H_{33}O_6N_5$	Calc.	C 63,6	H 6,1	N 12,8	O 17,5%
(547,6)	Tr.	„ 63,5	„ 6,2	„ 12,6	„ 17,7%

N-Benzoyloxycarbonyl-L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalananyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolyll-G-nitro-L-arginyll-glycinamide (XVI). Dans 8 ml de diméthylformamide chaud on dissout 0,78 g (1,42 mmole) de N-CBO-L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalananyl-hydrasid (XV), refroidit à 20°, ajoute 4,3 ml d'HCl aq. 1N, abaisse la température à 0° et introduit en 20 s, sous lente agitation,

0,30 ml (1,50 mmole) de NaNO_2 aq. 5N. On continue de remuer lentement, 5 min à 0°, la suspension épaisse obtenue, puis ajoute 7 ml d'acétate d'éthyle, ce qui provoque la dissolution du précipité, 0,49 ml (3,5 mmoles) de triéthylamine et 10 ml de NaCl aq. à 30%, secoue à 0°, sépare les deux phases et réextrait la phase aqueuse par 10 ml d'acétate d'éthyle glacé. Les phases organiques réunies sont rapidement séchées sur Na_2SO_4 , puis ajoutées à une solution de 0,69 g (1,0 mmole) d'hexapeptide XI dans 4,5 ml de diméthylformamide/ H_2O 2:1. L'acétate d'éthyle est évaporé au vide, et la solution résiduelle, conservée une nuit à la glacière. Au gel formé on ajoute 16 ml d'acétone, triture soigneusement, filtre, lave une fois par le mélange diméthylformamide/acétone 1:5 puis trois fois à l'acétone seule et sèche au vide. On traite le produit obtenu (0,62 g) 3 fois par 5 ml de méthanol bouillant, en filtrant à chaud chaque fois, et sèche au vide poussé à 40°. On obtient ainsi 0,46 g (37%) de N-CBO-L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalananyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolyl-L-arginyl-L-glycinamide de F. 237° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -41^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide). $E_{1,9}^a = 0,6$ Try; $E_{5,8}^a = 0,35$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN et chlore).

$\text{C}_{54}\text{H}_{72}\text{O}_{16}\text{N}_{16}, 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	Calc. C 52,8 H 6,2 N 18,2 O 22,8%
(1228,3)	Tr. ,, 52,8 ,, 6,1 ,, 18,5 ,, 23,2%

L-Alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalananyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolyl-L-arginyl-L-glycinamide (= Ala¹-Ala⁶-Arg⁸-vasopressine) (XVII). On hydrogène, 20 h à 25° et sous pression ordinaire, 360 mg (0,29 mmole) de nonapeptide protégé XVI en solution dans 10 ml d'acide acétique à 80%, en présence de 0,20 g de catalyseur à 10% de palladium sur charbon actif. Après éloignement du catalyseur et évaporation du filtrat au vide à 30°, le résidu est soumis à une distribution en contre-courant dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoroacétique 120:160:1. Après 207 transferts, on détermine sur des aliquotes [19] la position du sommet principal ($K = 0,285$), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore le *sec*-butanol au vide à 30°, secoue la solution aqueuse résiduelle avec 100 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle acétate) pour éliminer l'acide trifluoroacétique, fait passer le filtrat à travers une colonne contenant 100 ml de la même résine, lave par 500 ml d'acide acétique 0,01N et concentre à environ 20 ml au vide à 30°. La solution, légèrement trouble, est filtrée sur verre fritté (G5) et lyophilisée. On obtient ainsi 195 mg de poudre contenant 26,5 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 129 mg (43%) de base libre de L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalananyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolyl-L-arginyl-L-glycinamide. $[\alpha]_D^{25} = -79,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$ (base libre!); acide acétique 0,1N). $E_{1,9}^o = 1,05$ Try; $E_{5,8}^o = 0,73$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN, chlore et SAKAGUCHI). Un témoin d'arginine-vasopressine a donné les valeurs suivantes: $E_{1,9}^o = 0,90$ Try; $E_{5,8}^o = 0,60$ His. L'hydrolyse acide (HCl 6N, 16 h à 110°) fournit les proportions attendues des acides aminés constituants. Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau p. 1890. Pour l'analyse, un échantillon est séché au vide poussé 16 h à 60°.

$\text{C}_{46}\text{H}_{67}\text{O}_{12}\text{N}_{15}, 3\frac{1}{2}\text{CH}_3\text{COOH}, 3\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	Calc. C 49,1 H 6,8 N 16,2 O 27,8%
(1295,4)	Tr. ,, 48,8 ,, 7,4 ,, 16,3 ,, 27,7%

II. Synthèse de l'Ala¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressine. — N^α-Benzyloxycarbonyl-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysinate de trichloro-2,4,5-phényle (XVIII). A une solution, refroidie à -10°, de 19,0 g (50 mmoles) de N^α-CBO-N^ε-CTB-L-lysine [20] et de 12,8 g (65 mmoles) de trichloro-2,4,5-phénol dans 160 ml de chloroforme et 16 ml d'acétonitrile, on ajoute 10,3 g (50 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide, secoue 2 h à température ordinaire puis sépare le précipité de dicyclohexylurée et évapore le filtrat au vide. Le résidu est dissous dans l'éthanol, précipité à l'éther de pétrole, filtré et séché. Après recristallisation dans le mélange alcool/eau, on obtient 25,6 g (91%) de N^α-CBO-N^ε-CTB-L-lysinate de trichloro-2,4,5-phényle de F. 99°. $[\alpha]_D^{25} = -11,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$; diméthylformamide).

$\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_2\text{Cl}_3$	Calc. C 53,6 H 5,2 N 5,0 O 17,1 Cl 19,0%
(559,9)	Tr. ,, 53,8 ,, 5,4 ,, 5,2 ,, 17,3 ,, 18,5%

N^α-Benzyloxycarbonyl-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysyl-glycinamide (XIX). On dissout 16,8 g (30 mmoles) de N^α-CBO-N^ε-CTB-lysinate de trichloro-2,4,5-phényle (XVIII) et 2,7 g (36 mmoles) de glycinamide dans 50 ml de diméthylformamide, laisse séjourner la solution obtenue 16 h à 25°, ajoute 300 ml d'acétate d'éthyle, lave à l'eau, sèche et évapore à sec. On redissout le résidu dans 20 ml d'acétate d'éthyle chaud et laisse cristalliser à 0°. La solution se prend en une masse

crystalline. On essore, lave à l'acétate d'éthyle, refroidit à 0°, lave encore à l'éther et sèche. On obtient ainsi 10,3 g (79%) de N^α-CBO-N^ε-CTB-L-lysyl-glycinamide de F. 121–123°. $[\alpha]_D^{20} = -3,2^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-6,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-5,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,1$; $Rf_P^a = 0,1$; $Rf_A^a = 0,2$; $E_{1,9}^a = 1,1$ His; $E_{5,8}^a = 2,5$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{21}H_{32}O_6N_4$ (438,5)	Calc. C 57,5	H 7,8	N 12,8	O 21,9%
	Tr. ,, 57,3	,, 7,5	,, 13,2	,, 22,1%

N^ε-t-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-glycinamide (XX). On dissout 10,1 g (23 mmoles) d'amide dipeptidique XIX dans 200 ml de méthanol et hydrogène à pression normale en présence de 3,0 g de catalyseur à 10% de Pd sur charbon actif. On filtre, évapore à sec, reprend par du méthanol, évapore à sec, triture le résidu huileux dans l'acétate d'éthyle jusqu'à cristallisation, filtre, lave à l'acétate d'éthyle, puis à l'éther, et sèche. On obtient ainsi 6,0 g (87%) de N^ε-CTB-L-lysyl-glycinamide de F. 118°. $[\alpha]_D^{20} = +12,8^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $+40,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-10,8^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^o = 0,5$; $Rf_P^o = 0,6$; $Rf_A^o = 0,5$; $E_{1,9}^o = 1,1$ Try; $E_{3,8}^o = 0,9$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{13}H_{26}O_4N_4$ (302,4)	Calc. C 51,6	H 8,7	N 18,5	O 21,2%
	Tr. ,, 51,4	,, 8,8	,, 18,8	,, 21,5%

N-Benzoyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysyl-glycinamide (XXI). A une solution de 3,90 g (13 mmoles) d'amide dipeptidique XX dans 30 ml de diméthylformamide, on ajoute 7,50 g (10 mmoles) d'ester tétrapeptidique VII, agite jusqu'à dissolution complète puis laisse reposer à 25°. Au bout de deux heures, le mélange se solidifie. Après 16 h, on triture dans l'acétate d'éthyle, filtre, puis lave successivement par le mélange dioxanne/eau 2:1, puis au méthanol bouillant, à l'éther et sèche. On obtient ainsi 5,31 g (65%) de N-CBO-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-N^ε-CTB-L-lysyl-glycinamide de F. 236°. $[\alpha]_D^{20} = -72,0^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,05$; $Rf_P^a = 0,04$; $Rf_A^a = 0,1$; $E_{1,9}^a = 1,1$ Glu; $E_{3,8}^a = 1,2$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{38}H_{58}O_{12}N_{10}$ (846,9)	Calc. C 53,9	H 6,9	N 16,5	O 22,7%
	Tr. ,, 53,0	,, 6,9	,, 16,4	,, 22,9%

L-Glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysyl-glycinamide (XXII). On dissout 5,00 g (5,9 mmoles) d'amide hexapeptidique XXI dans 125 ml d'acide acétique/eau (4:1), ajoute 1,0 g de catalyseur à 10% de Pd sur charbon actif et hydrogène à pression ordinaire. Après l'absorption de 60 ml d'hydrogène (théorie: 136 ml) on ajoute encore 0,5 g de catalyseur et poursuit l'hydrogénation jusqu'à arrêt de l'absorption d'hydrogène (145 ml au total). On filtre, évapore à sec au vide poussé à 20°, reprend dans du dioxanne et évapore à sec. Après recristallisation dans le méthanol, on obtient 4,22 g (92%) de L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-N^ε-CTB-L-lysyl-glycinamide de F. 229–233°. $[\alpha]_D^{20} = -77,8^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $E_{1,9}^o = 0,72$ Try (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{30}H_{52}O_{10}N_{10}$ (712,8)	Calc. C 50,6	H 7,4	N 19,6	O 22,4%
	Tr. ,, 50,2	,, 7,4	,, 19,5	,, 22,4%

N-Benzoyloxycarbonyl-L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysyl-glycinamide (XXIII). A 1,93 g (2,71 mmoles) d'hexapeptide XXII, dissous dans 45 ml de diméthylformamide/H₂O 2:1, on ajoute une solution de N-CBO-L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-azide dans 50 ml d'acétate d'éthyle, préparée à partir de 1,96 g (3,58 mmoles) d'hydrazide XV comme cela a été décrit sous XVI. L'acétate d'éthyle est évaporé au vide et la solution résiduelle est conservée une nuit à la glacière. On triture le gel formé dans 120 ml d'acétone, filtre, lave au moyen du mélange diméthylformamide/acétone 1:5, puis trois fois à l'acétone seule, et sèche au vide. On traite le produit obtenu (2,59 g) cinq fois par 15 ml de méthanol bouillant, en filtrant à chaud chaque fois, et sèche au vide poussé à 40°. On obtient ainsi 1,74 g (52%) de N-CBO-L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-N^ε-CTB-L-lysyl-glycinamide de F. 235° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -43,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,9$; diméthylformamide). $E_{1,9}^a = 1,05$ Try; $E_{3,8}^a = 0,75$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN et chlore).

$C_{50}H_{81}O_{16}N_{13}$ (1228,4)	Calc. C 57,7	H 6,6	N 14,8%	Tr. C 57,6	H 7,1	N 14,8%
-------------------------------------	--------------	-------	---------	------------	-------	---------

L-Alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolyll-L-lysyl-glycinamide (= *Ala¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressine*) (XXIV). On dissout 1,50 g (1,22 mmole) de nonapeptide protégé XXIII dans 20 ml d'acide trifluoracétique, sature la solution de gaz bromhydrique en $\frac{3}{4}$ h, en maintenant la température à 10°, puis laisse encore séjourner 20 min à température ordinaire. La solution est concentrée au vide, 15 min à 20°, et le produit est précipité par addition d'un grand volume d'éther. On filtre, lave à l'éther, sèche au vide puis dissout dans 20 ml de diméthylformamide additionné de 5 ml d'acide acétique aq. 1N, agite $\frac{1}{4}$ h avec 20 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle acétate) pour éliminer l'acide trifluoracétique, fait passer la solution à travers une colonne contenant 10 ml de la même résine, qu'on lave encore par 40 ml de mélange diméthylformamide/acide acétique 1N 4:1; on évapore le filtrat au vide poussé à 30°. Après lavage du produit pulvérulent à l'éther et séchage au vide à 25°, on obtient 1,50 g de produit retenant de l'eau et de l'acide acétique et renfermant 1,16 g (96%) de base libre de *L-alanyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolyll-L-lysyl-glycinamide*. $[\alpha]_D^{25} = -87 \pm 2^\circ$ ($c = 1,5$ (base libre; calculé sur la base de l'azote peptidique présent); acide acétique 0,1 N). $E_{1,9}^0 = 1,05$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,77$ His (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN). Un témoin d'arginine-vasopressine a donné les valeurs suivantes: $E_{1,9}^0 = 0,90$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,60$ His. L'hydrolyse acide (HCl 6N, 16 h à 60°) a fourni les proportions attendues des acides aminés constituants. [Pour l'analyse, un échantillon est séché au vide poussé 16 h à 60° (perte de poids 5,9%).]

$C_{46}H_{67}O_{12}N_{13}$, 2CH ₃ COOH, 3H ₂ O (1168,3)	Calc. C 51,4 H 7,0 N 15,6 O 26,0%
	Tr. ,, 51,7 ,, 7,1 ,, 15,9 ,, 26,2%

L'homogénéité de la substance est confirmée au moyen d'une distribution en contre-courant (207 transferts) dans le système *sec*-butanol/ eau/acide trifluoracétique 120:160:1 (sommet unique, $K = 0,20$). Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau p. 1890.

III. Synthèse de la (désamino-Ala)¹-Ala⁶-Arg⁸-vasopressine. — *Propionate de trichloro-2,4,5-phényle* (XXV). A une solution, refroidie à -5°, de 22,0 g (297 mmoles) d'acide propionique et de 64,6 g (327 mmoles) de trichloro-2,4,5-phénol dans 180 ml d'acétate d'éthyle et 20 ml d'acétonitrile, on ajoute 61,3 g (297 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et secoue une nuit à température ordinaire. Le précipité de dicyclohexylurée est séparé (60,7 g; rdt. 91%), le filtrat est évaporé à sec au vide et le résidu est dissous dans 300 ml d'éthanol en présence de 0,1 ml d'acide propionique. Après un séjour de quelques heures à -15°, on essore les cristaux formés et sèche au vide. On obtient ainsi 45,8 g (61%) de propionate de trichloro-2,4,5-phényle de F. 40°, contenant encore un peu de trichlorophénol mais utilisable pour la suite de la synthèse. Pour l'analyse, on recristallise un échantillon dans l'éthanol; F. 44-45°.

$C_9H_7O_2Cl_3$ (253,5)	Calc. C 42,6 H 2,8 O 12,6 Cl 42,0%
	Tr. ,, 42,9 ,, 2,6 ,, 12,7 ,, 41,7%

N-Propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle (XXVI). On suspend 8,50 g (20 mmoles) de bromhydrate d'ester dipeptidique XIII dans 5 ml de diméthylformamide et ajoute 20 ml d'acétonitrile. La solution ainsi obtenue est refroidie à 10°, additionnée de 2,80 ml (20 mmoles) de triéthylamine et aussitôt de 5,10 g (20 mmoles) de propionate de trichloro-2,4,5-phényle (XXV), puis agitée une nuit à 25°. Après refroidissement à 0°, un petit précipité est séparé, lavé par de l'acétonitrile, HCl 1N et H₂O, puis séché au vide poussé. Après dissolution du produit (0,50 g) dans 50 ml d'acide acétique bouillant, addition de 50 ml d'eau, séjour d'une nuit à la glacière, filtration et séchage au vide poussé à 50° des cristaux formés, on obtient 0,26 g de *benzyl-3-(p-hydroxybenzyl)-6-pipérazinedione-2,5* de F. 318-320°, (Litt. [21]: F. 300°).

$C_{18}H_{18}O_3N_2$, $\frac{1}{6}$ H ₂ O (313,7)	Calc. C 69,0 H 5,9 N 8,9 O 16,2%
	Tr. ,, 69,1 ,, 6,2 ,, 8,6 ,, 16,2%

Le filtrat diméthylformamide/acétonitrile contenant le produit attendu est évaporé au vide à 30°. Le résidu, repris dans 100 ml d'acétate d'éthyle, est lavé successivement par HCl 1N, H₂O, NaHCO₃ 1N, H₂O, et séché sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, lavages répétés du

résidu à l'éther pour enlever le trichlorophénol, et séchage au vide, on obtient 5,11 g (64%) de N-propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle de F. 153–154°. Pour l'analyse, on recristallise 0,56 g dans 3 ml d'acétonitrile: 0,40 g, F. 156°. $[\alpha]_D^{23} = -14,5 \pm 1^\circ$ ($c = 1,7$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,99$; $Rf_P^0 = 0,97$; $Rf_A^0 = 0,97$; $E_{5,8}^0 = 0,5$ Try (révélation par FOLIN et chlore).

$C_{22}H_{26}O_5N_2$ (398,5)	Calc. C 66,3	H 6,6	N 7,0	O 20,1%
	Tr. ,, 65,9	,, 6,3	,, 7,3	,, 20,3%

N-Propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalanil-hydrazide (XXVII). On dissout 4,00 g (10 mmoles) d'ester dipeptidique XXVI dans 30 ml de méthanol anhydre, ajoute 4,0 ml d'hydrate d'hydrazine et laisse séjourner une nuit à 25°. Le précipité d'aiguilles est essoré, lavé abondamment au méthanol et séché au vide poussé à 60°. On obtient ainsi 3,91 g (98%) de N-propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalanil-hydrazide de F. 268–269° (inchangé par recristallisation dans le mélange diméthylformamide/méthanol). $[\alpha]_D^{23} = -22 \pm 1^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,99$; $Rf_P^0 = 0,97$; $Rf_A^0 = 0,97$; $E_{1,9}^0 = 0,65$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,5$ Try (révélation par FOLIN et chlore).

$C_{21}H_{26}O_4N_4$ (398,5)	Calc. C 63,3	H 6,6	N 14,1	O 16,1%
	Tr. ,, 63,4	,, 6,4	,, 14,2	,, 16,2%

N α -Propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalanil-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-G-nitro-L-arginyl-glycinamide (XXVIII). On suspend 0,57 g (1,43 mmole) d'hydrazide XXVII dans 7 ml de diméthylformamide, ajoute 4,3 ml d'HCl aq. 1N et secoue jusqu'à dissolution. La solution est ensuite refroidie à 0° et additionnée, en 20 s, de 0,30 ml (1,50 mmole) de NaNO₂ aq. 5N, sous lente agitation. Après 5 min on ajoute 7 ml d'acétate d'éthyle glacé, 0,49 ml (3,5 mmoles) de triéthylamine et 5 ml de NaCl aq. à 30%, secoue, sépare, extrait encore une fois par 7 ml d'acétate d'éthyle. Les deux phases organiques sont réunies et rapidement séchées sur Na₂SO₄, puis ajoutées à une solution de 0,69 g (1,0 mmole) d'hexapeptide XI dans 4 ml de diméthylformamide et 2 ml d'eau. L'acétate d'éthyle est évaporé au vide et la solution résiduelle, conservée une nuit à la glacière. Le gel obtenu est soigneusement trituré dans 16 ml d'acétone, puis lavé une fois par le mélange diméthylformamide/acétone 1:5 et trois fois à l'acétone seule. On sèche le produit au vide (0,03 g), puis le traite à trois reprises par 5 ml de méthanol bouillant, en filtrant à chaud chaque fois. Après séchage au vide poussé à 40°, on obtient 0,53 g (50%) de N α -propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalanil-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-G-nitro-L-arginyl-glycinamide de F. 235–237° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -43 \pm 1^\circ$ ($c = 2,2$; diméthylformamide). Le produit ne migre pas à l'électrophorèse.

$C_{46}H_{65}O_{14}N_{15}, 1H_2O$ (1070,2)	Calc. C 51,6	H 6,3	N 19,6%	Tr. C 51,5	H 6,2	N 19,8%
--	--------------	-------	---------	------------	-------	---------

N α -Propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalanil-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-L-arginyl-glycinamide [= (désamino-Ala)¹-Ala⁶-Arg⁸-vasopressine] (XXIX). On hydrogène, 20 h à 25° et sous pression ordinaire, 405 mg (0,38 mmole) d'octapeptide protégé XXVIII en solution dans 10 ml d'acide acétique à 80%, en présence de 0,2 g de catalyseur à 10% de palladium sur charbon actif. Après éloignement du catalyseur et évaporation du filtrat au vide à 30°, le résidu est soumis à une distribution en contre-courant dans le système *sec*-butanol/eau/acide acétique 120:160:1. Après 200 transferts, on détermine sur des aliquotes [19] la position du sommet principal ($K = 0,22$), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, concentre au vide à 30°, filtre et lyophilise. On obtient ainsi 201 mg de poudre contenant 31,7 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 163 mg (43%) de base libre de N α -propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalanil-L-glutaminy-L-asparaginy-L-alanyl-L-prolyl-L-arginyl-glycinamide. $[\alpha]_D^{23} = -89 \pm 2^\circ$ ($c = 0,5$ (base libre); acide acétique 0,1N). $E_{1,9}^0 = 0,50$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,30$ His (révélation par FOLIN, SAKAGUCHI et chlore). Un témoin d'oxytocine a donné les valeurs suivantes: $E_{1,9}^0 = 0,55$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,35$ His. L'hydrolyse acide (HCl 6N, 16 h à 110°) fournit les proportions attendues des acides aminés constituants. Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau p. 1890. Pour l'analyse, un échantillon est séché au vide poussé 16 h à 60°.

$C_{46}H_{66}O_{12}N_{14}, 1CH_3COOH, 3H_2O$ (1121,2)	Calc. C 51,4	H 6,8	N 17,5	O 24,3%
	Tr. ,, 51,2	,, 6,8	,, 17,4	,, 24,5%

IV. Synthèse de la (désamino-Ala)¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressine. – *N^α-Propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolyl-N^ε-t-butylloxycarbonyl-L-lysyl-glycinamide (XXX)*. A 1,93 g (2,71 mmoles) d'hexapeptide XXII, dissous dans 20 ml de diméthylformamide/H₂O 2:1, on ajoute une solution de N-propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-azide dans 50 ml d'acétate d'éthyle, préparée (comme cela a été décrit sous XXVIII) à partir de 1,42 g (3,56 mmoles) d'hydrazide XXVII. L'acétate d'éthyle est évaporé au vide et la solution résiduelle est conservée une nuit à la glacière. Le gel formé est trituré soigneusement dans 90 ml d'acétone, puis lavé une fois par le mélange diméthylformamide/acétone 1:5 et trois fois à l'acétone seule. On sèche le produit au vide (2,21 g), puis le traite à quatre reprises par 15 ml de méthanol bouillant, en filtrant à chaud chaque fois. Après séchage au vide poussé à 40°, on obtient 1,90 g (64%) de N^α-propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolyl-N^ε-CTB-L-lysyl-glycinamide de F. 237–238° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -45^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,9$; diméthylformamide). $E_{1,9}^a = 0,5$ Try; $E_{5,8}^a = 0,4$ His (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN).

C₅₁H₇₄O₁₄N₁₂·1H₂O (1097,3) Calc. C 55,8 H 7,0 N 15,3% Tr. C 55,5 H 7,2 N 15,6%

N^α-Propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolyl-L-lysyl-glycinamide [= (désamino-Ala)¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressine] (XXXI). On dissout 1,62 g (1,48 mmole) d'octapeptide protégé XXX dans 10 ml d'acide trifluoroacétique, secoue 1 h à 25°, filtre (quelques particules sont demeurées insolubles) et évapore le filtrat au vide à 30°. Le sirop obtenu est trituré dans l'éther jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent qu'on dissout dans 32 ml de diméthylformamide et 8 ml d'acide acétique aq. 1N. Pour éliminer l'acide trifluoroacétique, on fait passer cette solution à travers une colonne contenant 10 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle acétate), qu'on lave ensuite par 25 ml de même solvant. Le filtrat est évaporé au vide à 30° et le résidu est soumis à une distribution en contre-courant dans le système *sec*-butanol/eau/acide acétique 120:160:1. Après 200 transferts, on détermine sur des aliquotes [19] la position du sommet principal ($K = 0,25$), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, concentre au vide à 30°, filtre et lyophilise. On obtient ainsi 1,12 g de poudre contenant 167 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 971 mg (67%) de base libre de N^α-propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-alanyl-L-prolyl-L-lysyl-glycinamide. $[\alpha]_D^{23} = -93^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,6$ (base libre!); acide acétique 0,1N). $E_{1,9}^o = 0,52$ Try; $E_{5,8}^o = 0,42$ His (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN). Un échantillon d'oxytocine a donné les valeurs $E_{1,9}^o = 0,55$ Try; $E_{5,8}^o = 0,35$ His. L'hydrolyse acide (HCl 6N, 16 h à 110°) fournit les proportions attendues des acides aminés constituants. Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau p. 1890. Pour l'analyse, un échantillon est séché au vide poussé 16 h à 60°.

C₄₆H₆₆O₁₂N₁₂·1CH₃COOH, 2¹/₂H₂O (1084,2) Calc. C 53,2 H 7,0 N 15,5%
Tr. .. 53,4 .. 6,9 .. 15,8%

SUMMARY

Ala¹-Ala⁶-Arg⁸-vasopressin, Ala¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressin, (Deamino-Ala)¹-Ala⁶-Arg⁸-vasopressin and (Deamino-Ala)¹-Ala⁶-Lys⁸-vasopressin were prepared by condensation of a tripeptide azide or, respectively, a propionyl-dipeptide azide with a hexapeptide amide, both fragments having been synthesized by methods excluding racemization. These peptides represent analogues of arginine-vasopressin, lysine-vasopressin and of their deamino derivatives, in which the ring is open and the sulphur atoms are replaced by hydrogen atoms. The new peptides were found to be devoid of any biological activity and did not inhibit the corresponding natural hormones. The significance of this observation is discussed.

Laboratoires de chimie pharmaceutique
SANDOZ S. A., Bâle

BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. BERDE & R. A. BOISSONNAS, dans: «The Pituitary Gland» 3, p. 624 (Ed.: G. W. HARRIS; Butterworths, London 1965).
- [2] R. A. TURNER, J. G. PIERCE & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* 193, 359 (1951); Z. BERÁNKOVÁ & F. ŠORM,¹ *Coll. czechoslov. chem. Commun.* 26, 2557 (1961).
- [3] K. JOŠT, V. G. DEBABOV, H. NESVADBA & J. RUDINGER, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* 29, 419 (1964).
- [4] L. AUDRAIN & H. CLAUSER, *Biochim. biophysica Acta* 30, 191 (1958).
- [5] J. RUDINGER & K. JOŠT, *Experientia* 20, 570 (1964).
- [6] Résumé: I. L. SCHWARTZ, H. RASMUSSEN, L. M. LIVINGSTON & J. MARC-AURELE, dans «Oxytocin, Vasopressin and their Structural Analogues», *Proc. 2nd intern. pharmacol. Meeting* (Pergamon Press, 1964), vol. 10, p. 125.
- [7] C. T. O. FONG, L. SILVER & D. D. LOUIE, *Biophysica biochem. Res. Commun.* 14, 302 (1964).
- [8] V. DU VIGNEAUD, G. WINESTOCK, V. V. S. MURTI, D. B. HOPE & R. D. KIMBROUGH, *J. biol. Chemistry* 235, PC 64 (1960); D. B. HOPE, V. V. S. MURTI & V. DU VIGNEAUD, *ibid.* 237, 1563 (1962); D. B. HOPE & V. DU VIGNEAUD, *ibid.* 237, 3146 (1962); R. D. KIMBROUGH, W. D. CASH, L. A. BRANDA, W. Y. CHAN & V. DU VIGNEAUD, *ibid.* 238, 1411 (1963); R. L. HUGUENIN, E. STÜRMER, R. A. BOISSONNAS & B. BERDE, *Experientia* 21, 68 (1965); E. STÜRMER, R. L. HUGUENIN, R. A. BOISSONNAS & B. BERDE, *ibid.* 21, 583 (1965).
- [9] A. KOSSEL & E. L. KENNAWAY, *Z. physiol. Chem.* 72, 486 (1911); M. BERGMANN, L. ZERVAS & H. RINKE, *ibid.* 224, 40 (1934); H. O. VAN ORDEN & E. L. SMITH, *J. biol. Chemistry* 208, 751 (1954).
- [10] F. C. MCKAY & N. F. ALBERTSON, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 4686 (1957).
- [11] L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, *Analyt. Chemistry* 22, 1462 (1950).
- [12] TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 67, 257 (1955).
- [13] ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 43, 200 (1960); R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *ibid.* 45, 1629 (1962).
- [14] M. BERGMANN & L. ZERVAS, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 65, 1192 (1932).
- [15] G. W. ANDERSON & F. M. CALLAHAN, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 3359 (1960).
- [16] R. L. HUGUENIN, *Helv.* 47, 1934 (1964).
- [17] J. PLESS & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 46, 1609 (1963).
- [18] E. SANDRIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 46, 1637 (1963).
- [19] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* 193, 265 (1951).
- [20] R. SCHWYZER & W. RITTEL, *Helv.* 44, 159 (1961).
- [21] M. BERGMANN, F. STERN & C. WITTE, *Liebigs Ann. Chem.* 449, 277 (1926).
-