

14. Synthèse du glutathion et de l'oxytocine à l'aide d'un nouveau groupe protecteur de la fonction thiol¹⁾

par **St. Guttman**

(28 IX 65)

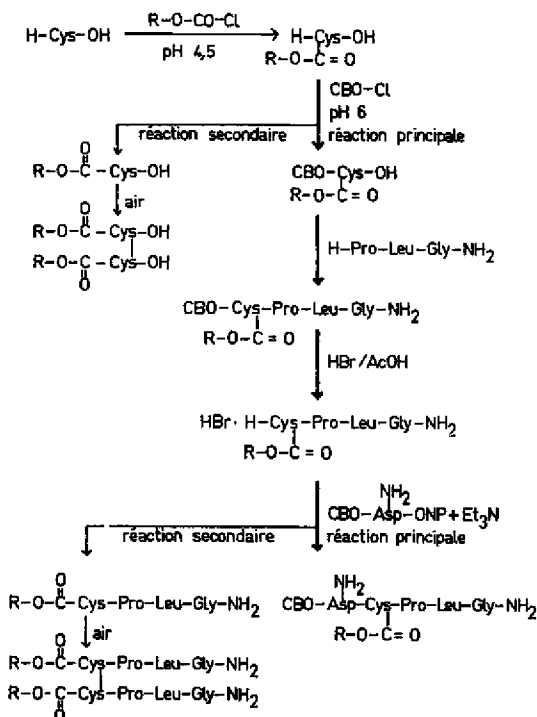
Pour pouvoir entreprendre la synthèse de polypeptides naturels contenant de la cystine, tels que, par exemple, la ribonucléase, l'insuline, l'oxytocine, la vasopressine etc., ou celle d'analogues structuraux de ceux-ci, il est nécessaire de protéger non seulement les fonctions carboxyle et amino au cours de la synthèse, mais également le groupe thiol des restes cystéine présents dans les produits intermédiaires, afin d'éviter des réactions secondaires telles que l'acylation ou l'oxydation. En outre, si plusieurs restes de cystéine sont présents simultanément, il est souvent désirable de pouvoir libérer l'une après l'autre les différentes fonctions thiol, donc de disposer de groupes protecteurs de la fonction thiol sélectivement scindables.

Le groupe protecteur de la fonction thiol qui a été le plus employé jusqu'ici est le groupe benzyle [1]. Sa scission exige toutefois un traitement par le sodium dans l'ammoniac liquide, qui provoque dans certains cas des réactions secondaires de scission de chaîne [2]. Toute une série d'autres groupes protecteurs ont été proposés pour la fonction thiol, tels que les groupes *p*-nitrobenzyle [3], tétrahydropyranyle [4], benzylthiométhyle [5], diméthyl-2,2-thiazolidine [6], acétyle [7], benzoyle [7], *t*-butyle [8], triphénylméthyle [9] [10], diphénylméthyle [10] et benzyloxycarbonyle [7] [11]. La plupart de ces groupes n'ont toutefois trouvé jusqu'ici qu'un emploi très restreint en chimie peptidique, leur scission sélective ou leur stabilité dans les conditions de synthèse laissant à désirer dans la plupart des cas.

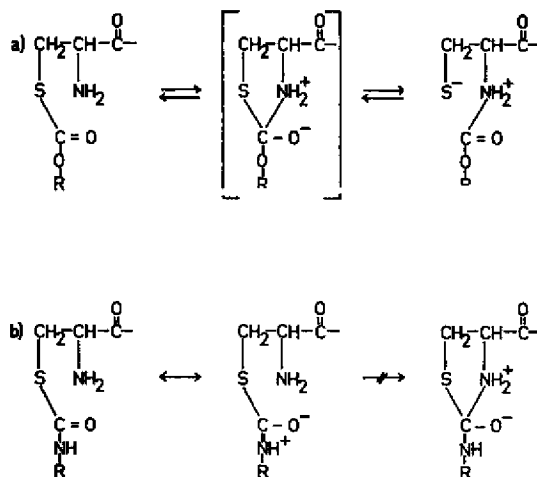
Le dernier des groupes cités ci-dessus, le groupe S-benzyloxycarbonyle [7] [11], peut notamment être éloigné dans des conditions très douces par aminolyse ou saponification. Toutefois sa stabilité envers une solution de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, utilisée pour éloigner les groupes N-benzyloxycarbonyle au cours de la synthèse, étant limitée, des complications se produisent par suite de sa scission partielle simultanée.

Afin de réduire cet inconvénient, nous avons essayé de remplacer ce groupe S-benzyloxycarbonyle par d'autres groupes alcoxycarbonyles non scindables par l'acide bromhydrique. Dans cette intention, nous avons synthétisé des séries de la cystéine dont le groupe thiol était substitué par les groupes éthyloxycarbonyle, octyloxycarbonyle, cyclohexyloxycarbonyle, ou phényl-2-éthyloxycarbonyle. Nous avons cependant constaté que ces groupes se transposaient très facilement sur la fonction amino libre de ce reste cystéine dès que celle-ci n'était plus salifiée (schéma 1). Le mécanisme à la base de cette transposition est représenté dans le schéma 2a. Une transposition semblable a déjà été observée dans le cas de la S-acétyl-cystéinamine [12] et est également bien connue dans celui des dérivés O-acylés de la sérine [13]. Afin de

¹⁾ Une communication préliminaire de ce travail a été présentée au 6e Symposium européen sur les peptides le 15 sept. 1963 à Athènes.

Schéma 1. *Transposition S → N dans les dérivés de la S-alkyloxycarbonyl-L-cystéine*

Abréviations: voir Schéma 5.

Schéma 2. *Transposition S → N du groupe S-alkyloxycarbonyle et absence de transposition S → N du groupe S-alkylcarbamoyle*

réduire le risque d'une telle transposition $S \rightarrow N$, il faut diminuer la susceptibilité du groupe carbonyle attaché au soufre envers une attaque nucléophile. En remplaçant le groupe S-alcoyloxycarbonyl par un groupe S-carbamoyl ou mieux S-alcoylcarbamoyl, on devrait obtenir une stabilisation par résonance de la fonction carbonyle et la rendre ainsi plus résistante à une attaque nucléophile par un groupe amino voisin (schéma 2b).

Parmi le grand nombre de S-alcoylcarbamoyl-L-cystéines récemment décrites [14] dans la littérature, la S-éthylcarbamoyl-L-cystéine se distingue par la facilité de sa préparation et par la grande tendance à la cristallisation de ses dérivés. Elle est obtenue facilement à partir de l'isocyanate d'éthyle et du chlorhydrate de cystéine [14] et se laisse convertir avec un rendement presque quantitatif en son dérivé N-benzoyloxycarbonylé (schéma 3).

Schéma 3. Synthèse de la N-Carbobenzoxy-S-éthylcarbamoyl-L-cystéine

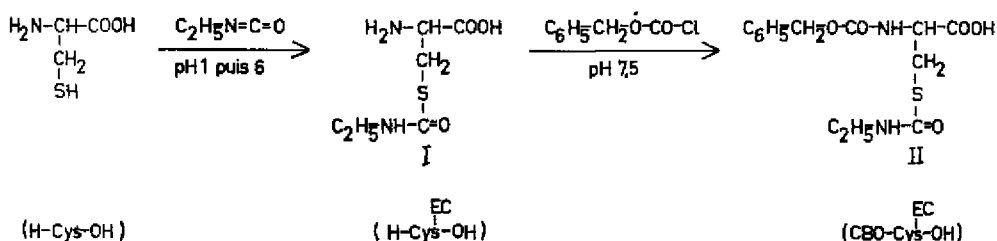


Schéma 4. Susceptibilité du groupe S-éthylcarbamoyl envers les principaux agents de scission des groupes protecteurs

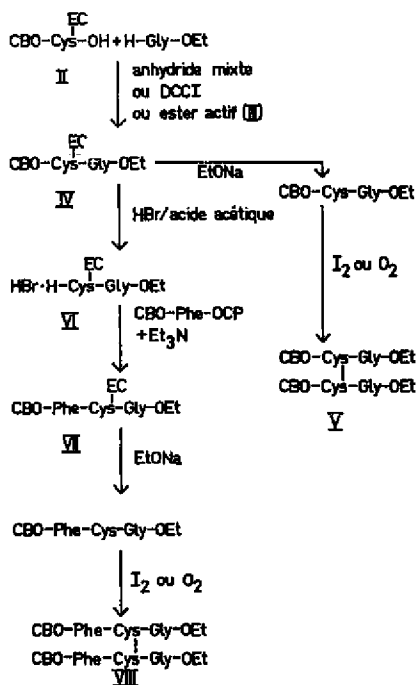
	Température (°C)	Temps (min)	Scission (%)
HBr/Acide acétique 4,5 N	20	60	0
HCl/eau 1 N	20	60	0
HCl/méthanol 1 N	20	60	0
Acide acétique/eau 1:1	100	10	0
Acide trifluoroacétique	70	10	0
NH ₄ OH/eau 4 N	20	30	~ 80
NH ₃ liquide/méthanol 1:1	20	120	100
NH ₃ liquide	- 30	30	~ 80
NH ₃ liquide	20	120	100
NaOH/eau 1 N	20	20	100
NaOCH ₃ /méthanol 1 N	20	20	100
Na/NH ₃ liquide	- 30	3	100
NH ₂ NH ₂ /méthanol 1 N	20	120	100

Nous avons examiné le comportement de la S-éthylcarbamoyl-L-cystéine envers les divers agents de scission utilisés en synthèse peptidique et avons résumé dans le schéma 4 les résultats obtenus. Il en ressort que le groupe S-éthylcarbamoyl est résistant d'une manière générale à l'acidolyse, ce qui permet la scission sélective d'un très grand nombre de groupes usuels protégeant les fonctions amino, tels que les groupes benzyloxycarbonyl, *t*-butoxycarbonyl, trityle etc., et même celle des groupes trityle, *t*-butyle et benzyloxycarbonyl protégeant les fonctions hydroxyle. Par contre, le groupe S-éthylcarbamoyl est scindé relativement facilement par les agents nucléo-

philes. Il est notamment scindé quantitativement dans des conditions relativement douces, telles que la saponification, la méthanolyse alcaline ou l'ammonolyse. Il est ainsi possible de scinder sélectivement le groupe S-éthylcarbamoyle en laissant complètement intact le groupe S-benzyle. Au cours de ces traitements, nous n'avons observé ni réaction d'élimination avec formation de déhydroalanine, ni racémisation.

Afin de procéder à un premier examen des possibilités d'emploi de ce nouveau groupe, nous avons d'abord synthétisé un peptide connu de structure simple, le bis-(benzyloxycarbonyl-L-phénylalaninyl)-L-cystinyl-bis-(glycinate d'éthyle) [10], selon le chemin indiqué dans le schéma 5. La condensation de la N-CBO-S-éthylcarbamoyl-L-cystéine avec le glycinate d'éthyle peut être effectuée indifféremment par les méthodes

Schéma 5. Synthèse de peptides de la cystéine



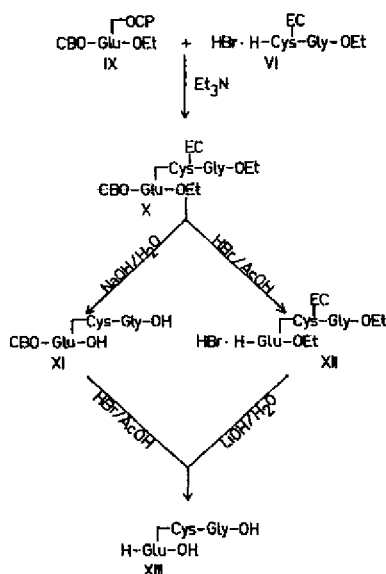
Abréviations: CBO- = carbobenzyoxy- = benzyloxycarbonyle; -Et = éthyle; -CP = trichloro-2,4,5-phényle; -NP = *p*-nitrophényle; EC = éthylcarbamoyle; DCCI = dicyclohexyl-carbodiimide

à l'anhydride mixte, au dicyclohexyl-carbodiimide ou à l'ester actif sans aucune racémisation, comme le prouve la conversion du dipeptide obtenu IV en N,N'-di-CBO-L-cystinyl-bis-(glycinate d'éthyle) (V) dont les propriétés sont connues dans la littérature [10] et qui peut être obtenu directement par condensation de la di-CBO-cystéine avec le glycinate d'éthyle. Le groupe carbobenzyoxy du dipeptide IV peut être scindé par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique sans que le groupe S-éthylcarbamoyle soit touché, et le dipeptide libre VI obtenu peut être condensé avec un ester actif de la carbobenzyoxy-phénylalanine sans qu'il se produise de transposition

du groupe alcoylcarbamoyle sur la fonction amino libre du reste cystéinyle. Il est enfin possible de scinder avec un bon rendement le groupe S-alcoylcarbamoyle par éthanololyse sans toucher à la fonction ester du reste glycine. Après oxydation, on obtient le bis-(CBO-L-phénylalanyl)-L-cystinyl-bis-(glycinate d'éthyle) de propriétés identiques à celles du produit obtenu par une autre méthode selon la littérature [10].

Nous avons ensuite utilisé le groupe S-alcoylcarbamoyle pour synthétiser le glutathion par une nouvelle méthode (schéma 6). Par condensation d'un ester actif du N-carbobenzoxy-L- α -glutamate d'éthyle avec le S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-glycinate d'éthyle (VI) obtenu ci-dessus, nous avons préparé le tripeptide X. En procédant,

Schéma 6. Synthèse du glutathion



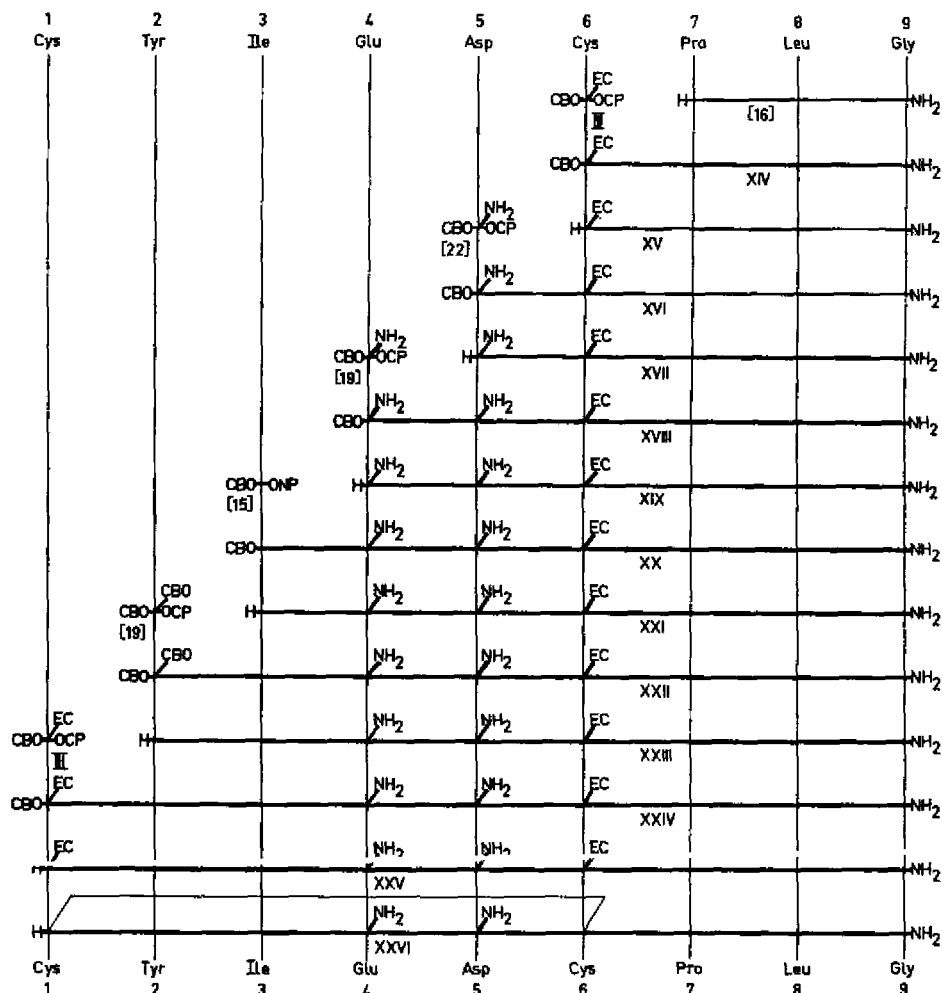
Abréviations voir Schéma 5.

soit d'abord à une saponification, qui scinde simultanément la fonction ester et le groupe S-éthylcarbamoyle, et ensuite à la scission du groupe carbobenzoxy par traitement à l'acide bromhydrique dans l'acide acétique, soit aux mêmes réactions mais dans l'ordre inverse, nous sommes parvenus au glutathion, la première de ces deux méthodes fournissant toutefois un rendement supérieur.

Nous avons enfin employé notre nouvelle méthode pour la synthèse d'un peptide de structure plus complexe, mais déjà obtenu par toute une série d'autres méthodes de synthèse [15] [16]: l'oxytocine (schéma 7). A partir du tripeptide L-prolyl-L-leucyl-glycinamide [16] et de l'ester actif de la N-CBO-S-alcoylcarbamoyl-L-cystéine nous avons préparé le térapeptide XIV. Après éloignement du groupe N-carbobenzoxy de celui-ci par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique et condensation avec un ester actif de l'asparagine, nous sommes parvenus au pentapeptide XVI. Nous avons ensuite continué la synthèse jusqu'à l'obtention du nonapeptide par la méthode récurrente, c'est-à-dire en éloignant chaque fois le groupe N-carbobenzoxy du peptide obtenu par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique et en condensant avec l'ester

activé d'un nouvel acide aminé. Les bons rendements obtenus lors de cette synthèse illustrent tant la stabilité du groupe N-éthylcarbamoyle au traitement à l'acide bromhydrique dans l'acide acétique que sa résistance à la transposition $S \rightarrow N$ au cours des différentes réactions de condensation. A la fin de la synthèse, les deux groupes S-éthylcarbamoyle du nonapeptide XXV ont été éloignés par séjour dans un mélange à parties égales d'ammoniac liquide et de méthanol. Après l'oxydation dans les conditions habituelles, nous avons obtenu l'oxytocine avec un rendement comparable à celui des autres méthodes décrites jusqu'ici dans la littérature [15].

Schéma 7. Synthèse de l'oxytocine



Abréviations: voir Schéma 5.

Ces différents exemples montrent que le groupe N-éthylcarbamoyle peut être utilisé avec succès pour la protection de la fonction thiol lors de la synthèse de peptides complexes et qu'il peut être éloigné en fin de synthèse par des méthodes douces.

Partie expérimentale²⁾

Les F. sont corrigés (précision $\pm 1^\circ$). Les séchages au vide ont été effectués sous 10^{-2} Torr (16 h à 60° pour les analyses).

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur le polarimètre automatique de PERKIN-ELMER 141.

Les chromatographies sur papier 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_A dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/eau (35:35:30); Rf_P dans le mélange *n*-butanol/acide acétique/eau (70:10:20); Rf^0 sans scission préalable; Rf^a après scission du groupe CBO— par séjour de 40 min à 20° dans une solution de HBr 4 N dans l'acide acétique glacial.

Les électrophorèses sur papier ont été effectuées dans l'appareil à l'électrophorèse sous haute tension de WIELAND & PFLEIDERER [17]: au pH 1,9 ($E_{1,9}$) dans le mélange acide formique/acide acétique/eau (15:10:75); au pH 5,8 ($E_{5,8}$) dans le mélange pyridine/acide acétique/eau (9:1:90). $E_{1,9} = 0,8$ His indique qu'à pH 1,9 la substance migre 0,8 fois la distance que migre l'histidine. Les exposants⁰ et ^a ont la même signification que pour les chromatogrammes. Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et phérogrammes ont été décrits précédemment [18].

Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées selon la méthode ascendante sur silicagel (plaques de 10×10 cm), dans trois systèmes de solvants: chloroforme/méthanol (7:3) et (9:1), ainsi que méthanol pur. La révélation est effectuée par des vapeurs d'iode.

S-Ethylcarbamoyl-L-cystéine (I). On dissout 158 g (1 mole) de chlorhydrate de cystéine anhydre (obtenu par séchage du monohydrate à 70° sous vide poussé pendant 16 h) dans 1500 ml de diméthylformamide, refroidit rapidement à 0° , ajoute 78,3 g (1,1 mmole) d'isocyanate d'éthyle fraîchement distillé, maintient la solution ainsi obtenue 70 h à 20° , évapore à sec, triture le résidu visqueux avec de l'éther, dissout dans 2000 ml d'eau, lave à l'éther, amène le pH de la solution aqueuse à 6,5 et concentre sous pression réduite jusqu'à l'apparition des premiers cristaux (1300 ml). On garde 12 h à 0° , filtre, lave à l'eau glacée, puis à l'alcool-éther et sèche. L'eau-mère est concentrée à moitié et gardée encore 16 h à 0° . On lave les cristaux formés par l'alcool-éther et sèche. On obtient au total 131 g (67%) de S-éthylcarbamoyl-L-cystéine de F. 219° (lit. 182°) [14]. $[\alpha]_D^{25} = -91,1^\circ$ ($c = 0,8$; acide acétique 95%); $-36,6^\circ$ ($c = 1,1$; HCl 6N). $Rf_M^0 = 0,3$; $Rf_A^0 = 0,8$; $Rf_P^0 = 0,4$; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Try; $E_{5,8}^0 = 0$ (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_8H_{12}O_3N_2S$	Calc. C 37,5	H 6,3	O 25,0	N 14,6	S 16,7%
(192,2)	Tr. „ 37,1	„ 6,3	„ 24,8	„ 14,5	„ 16,4%

N-Carbobenzoyl-S-éthylcarbamoyl-L-cystéine (II). A un mélange refroidi à 0° de 20,4 g (120 mmoles) de chloroformiate de benzyle et 200 ml de $KHCO_3$ 1 N on ajoute, en petites portions, sous forte agitation 15,3 g (80 mmoles) de S-éthylcarbamoyl-L-cystéine (I) et continue à agiter pendant 2 h à 0° . On ajoute ensuite 100 ml d'eau, lave par l'éther, acidifie la phase aqueuse par H_2SO_4 1 N, extrait le précipité huileux par l'éther, sèche sur Na_2SO_4 , évapore à sec, redissout le résidu cristallin dans 100 ml d'acétate d'éthyle bouillant et ajoute sous forte agitation 500 ml d'éther de pétrole. On obtient un précipité cristallin qui, après lavage à l'éther de pétrole et séchage, donne 26,0 g (99%) de N-carbobenzoyl-S-éthylcarbamoyl-L-cystéine de F. 121° . $[\alpha]_D^{25} = -25,3^\circ$ ($c = 1,5$ dans acide acétique 95%); $-63,9^\circ$ ($c = 1,4$ dans diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,2$; $Rf_A^a = 0,4$; $Rf_P^a = 0,1$; $E_{1,9}^a = 0,0$ Tr.; $E_{5,8}^a = 0$ (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{14}H_{18}O_3N_2S$	Calc. C 51,5	H 5,6	O 24,5	N 8,6	S 9,8%	Equiv.: 326
(326,4)	Tr. „ 51,8	„ 5,8	„ 24,2	„ 8,4	„ 10,1%	„ 331

N-Carbobenzoyl-S-éthylcarbamoyl-L-cystéine de trichloro-2,4,5-phényle (III). On dissout 16,3 g (50 mmoles) de N-carbobenzoyl-S-éthylcarbamoyl-L-cystéine (II) et 12,5 g (60 mmoles) de trichloro-2,4,5-phénol dans 250 ml d'acétonitrile, refroidit à -10° , ajoute 10,3 g (50 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite à 3 h à 20° . La plus grande partie du produit cristallise en même

²⁾ La partie expérimentale a été réalisée avec l'assistance technique de Mlle GINETTE STEIBLEN. Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr. W. SCHÖNINGER), les spectres UV., dans notre laboratoire spectroscopique (Dr. K. FRET).

temps que la dicyclohexylurée formée. On filtre, lave le précipité plusieurs fois par la pyridine et évapore à sec les filtrats réunis. Le résidu cristallin est lavé par l'éther jusqu'à élimination totale de la pyridine, puis recristallisé dans de l'éthanol contenant 2% d'acide acétique. On obtient ainsi 22,5 g (89%) de N-carbobenzoxo-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinate de trichloro-2,4,5-phényle de F. 160°. $[\alpha]_D^{25} = -39,4^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-37,6^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^A = 0,5$; $Rf_A^A = 0,96$; $Rf_P^A = 0,8$; $E_{1,9}^A = 1,0$ Try; $E_{5,8}^A = 0,4$ Try (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{20}H_{18}N_2O_5Cl_3S$	Calc. C 47,5	H 3,8	O 15,8	N 5,5	Cl 21,0	S 6,3%
(505,8)	Tr. „ 48,0	„ 4,0	„ 15,7	„ 5,5	„ 21,0	„ 6,4%

N-Carbobenzoxo-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-glycinate d'éthyle (IV). a) *Par condensation à l'ester actif*: On dissout 5,05 g (10 mmoles) de N-carbobenzoxo-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinate de trichloro-2,4,5-phényle (III) dans 25 ml de diméthylformamide, ajoute successivement 1,51 g (11 mmoles) de chlorhydrate de glycinate d'éthyle et 1,4 ml (10 mmoles) de triéthylamine, laisse 16 h à 25°, concentre à 10 ml, ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle, lave successivement par $KHCO_3$ 1N, H_2O et H_2SO_4 1N, sèche sur Na_2SO_4 , évapore à sec et recristallise le résidu huileux dans un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole. On obtient ainsi 3,76 g (91%) de N-carbobenzoxo-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-glycinate d'éthyle de F. 115–116°. $[\alpha]_D^{25} = -43,5^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide). $Rf_M^A = 0,7$; $Rf_A^A = 0,8$; $Rf_P^A = 0,7$; $E_{1,9}^A = 1,2$ Try; $E_{5,8}^A = 1,1$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{18}H_{26}O_6N_3S$	Calc. C 52,6	H 6,1	O 23,3	N 10,2	S 7,8%
(411,5)	Tr. „ 52,7	„ 6,1	„ 23,5	„ 10,1	„ 7,9%

b) *Par condensation au dicyclohexyl-carbodiimide*: On dissout 3,26 g (10 mmoles) de N-carbobenzoxo-S-éthylcarbamoyl-L-cystéine (II) dans 50 ml d'acétonitrile, refroidit à -10° , ajoute 1,51 g (10 mmoles) de chlorhydrate de glycinate d'éthyle et 1,4 ml (10 mmoles) de triéthylamine dissous dans 15 ml de chlorure de méthylène, puis 2,06 g de dicyclohexyl-carbodiimide, agite 16 h à 25°, filtre et évapore à sec. Après les purifications décrites sous a) et recristallisation, on obtient 2,87 g (70%) d'ester dipeptidique ayant les propriétés mentionnées sous a).

c) *Par condensation à l'anhydride mixte*: On dissout 3,26 g (10 mmoles) de N-carbobenzoxo-S-éthylcarbamoyl-L-cystéine dans 50 ml de chloroforme, ajoute 1,4 ml (10 mmoles) de triéthylamine, refroidit à -5° , ajoute 1,0 ml (10 mmoles) de chloroformiate d'éthyle, puis, après 10 min, 1,12 g de glycinate d'éthyle, agite 4 h à 25° puis purifie comme décrit sous a). On obtient 1,62 g (40%) d'ester dipeptidique ayant les mêmes propriétés que les produits obtenus sous a) et b).

N,N'-Di-CBO-L-cystinyl-bis-(glycinate d'éthyle) (V). On dissout 2,05 g (5,0 mmoles) d'ester dipeptidique IV dans 40 ml d'éthanol absolu, ajoute, sous atmosphère d'azote, 11 ml d'éthanolate de Na 0,5N, agite 20 min à 25°, ajoute 0,6 ml (10 mmoles) d'acide acétique glacial, puis une solution d'iode 0,1N jusqu'à virage au jaune (39 ml). Il se forme un précipité abondant. On filtre, lave à l'eau et sèche (850 mg). On concentre le filtrat à 10 ml, extrait au chloroforme, lave la solution chloroformique par $KHCO_3$ 1N, H_2O et H_2SO_4 1N, sèche et évapore à sec (470 mg). On réunit le résidu au précipité obtenu plus haut et recristallise dans chloroforme-éther. On obtient ainsi 1,15 g (71%) de N,N'-di-carbobenzoxo-L-cystinyl-bis-(glycinate d'éthyle) de F. 167° (Lit. 167–168° [10]), $[\alpha]_D^{25} = -139,7^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide) (Lit.: $-141,6^\circ$ [10]). $Rf_M^A = 0,5$; $Rf_A^A = 0,6$; $Rf_O^A = 0,2$; $E_{1,9}^A = 1,2$ Glu; $E_{5,8}^A = 1,2$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{30}H_{38}O_{10}N_4S_2$	Calc. C 53,1	H 5,6	O 23,6	N 8,3	S 9,3%
(678,8)	Tr. „ 52,7	„ 5,8	„ 23,9	„ 8,7	„ 9,4%

Si l'oxydation est effectuée dans un mélange méthanol/eau 1:1 à pH 8,0 par un courant d'oxygène à la place de l'iode, on obtient le même produit avec un rendement de 72%. Si l'oxydation est effectuée par du ferricyanure de potassium dans un milieu méthanol/eau 2:1, le dipeptide obtenu est moins pur et le rendement tombe à 62%.

S-Ethylcarbamoyl-L-cystéinyl-glycinate d'éthyle · HBr (VI). On dissout 10,0 g (25 mmoles) d'ester dipeptidique IV dans 50 ml d'acide acétique, ajoute 100 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, laisse 1 h à 20°, évapore à sec, lave le résidu par l'éther, filtre, dissout dans 50 ml de méthanol, ajoute de l'éther jusqu'à léger trouble et laisse cristalliser à 0°. Après

filtration, lavage à l'éther et séchage, on obtient 7,41 g (82%) de bromhydrate de S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-glycinate d'éthyle de F. 198°. $[\alpha]_D^{22} = +12,6^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide); $+3,5^\circ$ ($c = 0,9$; acide acétique 95%); $+11,6^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol). $Rf_M^0 = 0,7$; $Rf_A^0 = 0,8$; $Rf_P^0 = 0,5$; $E_{1,9}^0 = 1,3$ Try; $E_{5,8}^0 = 1,0$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{10}H_{20}O_4N_3BrS$	Calc. C 33,6	H 5,6	O 17,9	N 11,7	Br 22,3	S 8,9%
(358,3)	Tr. „ 33,9	„ 6,0	„ 17,7	„ 11,4	„ 22,6	„ 9,0%

N-Carbobenzoxyl-L-phénylalanyl-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-glycinate d'éthyle (VII). On dissout 1,80 g (5 mmoles) de bromhydrate d'ester dipeptidique VI et 2,40 g (5,0 mmoles) de N-carbobenzoxyl-L-phénylalaninate de trichloro-2,4,5-phényle [19] dans 10 ml de diméthylformamide, ajoute 0,7 ml de triéthylamine, filtre, garde la solution 16 h à 25°, ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle, lave par $KHCO_3$ 1N, H_2O et H_2SO_4 1N, sèche et évapore à sec. On dissout le résidu dans 10 ml d'acétate d'éthyle, ajoute de l'éther jusqu'à l'apparition d'un trouble et garde à 0°. Il se produit une prise en masse gélatineuse. On filtre, lave à l'éther, sèche et obtient 2,21 g (78%) de N-carbobenzoxyl-L-phénylalanyl-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-glycinate d'éthyle de F. 118° (instantané; 122°). $[\alpha]_D^{22} = -47,7^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 1,0$; $Rf_A^a = 0,9$; $Rf_P^a = 0,7$; $E_{1,9}^a = 0,9$ Try; $E_{5,8}^a = 0,8$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{27}H_{34}N_4O_7S$ (558,7)	Calc. C 58,1	H 6,1	N 10,0	O 20,1	S 5,7%
	Tr. „ 58,1	„ 6,1	„ 9,9	„ 20,2	„ 5,6%

Bis-(N-Carbobenzoxyl-L-phénylalanyl)-L-cystinyl-bis-(glycinate d'éthyle) (VIII). On suspend 1,11 g (2,0 mmoles) d'ester tripeptidique VII dans 16 ml d'éthanol et y fait barboter un courant d'azote. La dissolution n'est pas complète. On y ajoute 4,4 ml d'éthanolate de Na 0,5N et obtient une solution parfaite, qu'on laisse reposer 1 h à 25°. On ajoute 0,2 ml (3,3 mmoles) d'acide acétique glacial, puis une solution d'iode 0,1N jusqu'à virage au jaune (21 ml). Il se forme un précipité légèrement coloré. On ajoute 20 ml d'eau, filtre, lave le précipité à l'eau et essore. Après deux recristallisations dans l'éthanol on obtient 450 mg (94%) de bis-(carbobenzoxyl-L-phénylalanyl)-L-cystinyl-bis-(glycinate d'éthyle) de F. 215° (avec ramollissement à 212°) (Lit.: 213–215° [10]). $[\alpha]_D^{22} = -83,0^\circ$ ($c = 3,0$; diméthylformamide) (Lit.: $-82,8^\circ$ [10]). $Rf_M^a = 0,6$; $Rf_A^a = 0,7$; $Rf_P^a = 0,5$; $E_{1,9}^a = 1,0$ Try; $E_{5,8}^a = 0,5$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{48}H_{56}O_{12}N_8S_2$	Calc. C 59,3	H 5,8	O 19,7	N 8,6	S 6,6%
(973,1)	Tr. „ 59,9	„ 5,8	„ 19,9	„ 8,6	„ 6,5%

Synthèse du glutathion

N-Carbobenzoxyl-γ-(O-trichloro-2,4,5-phényl)-L-glutamate d'éthyle (IX). On dissout 15,0 g (50 mmoles) N-carbobenzoxyl-L-α-glutamate d'éthyle [20] et 14,0 g (70 mmoles) de trichloro-2,4,5-phénol dans 200 ml d'acétate d'éthyle, refroidit à -10° , ajoute 10,3 g (50 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide, laisse 3 h à 20°, filtre, évapore le filtrat à sec et recristallise le résidu dans 100 ml d'éthanol. On obtient ainsi 15,1 g (62%) de N-carbobenzoxyl-γ-(O-trichloro-2,4,5-phényl)-L-glutamate d'éthyle de F. 82°. $[\alpha]_D^{22} = -21,5^\circ$ ($c = 1,2$; diméthylformamide); $-13,4^\circ$ ($c = 0,9$; acide acétique 95%); $-23,4^\circ$ ($c = 1,4$; méthanol).

$C_{21}H_{33}O_6NCl_3$	Calc. C 51,6	H 4,1	O 19,6	N 2,9	Cl 21,8%
(488,8)	Tr. „ 52,0	„ 4,1	„ 19,5	„ 3,0	„ 21,5%

N-Carbobenzoxyl-L-glutamyl-α-(O-éthyl)-γ-(S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-glycinate d'éthyle) (X). On dissout 7,16 g (20 mmoles) de bromhydrate d'ester dipeptidique VI et 9,76 g (20 mmoles) d'ester actif IX dans 20 ml de diméthylformamide, ajoute 4,2 ml (30 mmoles) de triéthylamine, agit 16 h à 25°, ajoute 200 ml d'acétate d'éthyle, lave par $KHCO_3$ 1N, H_2O et H_2SO_4 1N, sèche sur Na_2SO_4 , filtre et concentre à 100 ml. Des cristaux commencent à se former. On ajoute 150 ml d'éther, filtre, lave la masse cristalline par 100 ml d'acétate d'éthyle à ébullition et sèche. On obtient une première fraction de 7,20 g de tripeptide. Des eaux-mères gardées à 0°, une seconde portion de 1,72 g de même produit cristallise. On obtient ainsi 8,92 g (78%) de N-carbobenzoxyl-L-glutamyl-α-(O-éthyl)-γ-(S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-glycinate d'éthyle) de F. 152°. $[\alpha]_D^{22} = -38,8^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide); $-29,1^\circ$ ($c = 0,9$; acide acétique 95%); $-34,4^\circ$ ($c = 0,9$;

méthanol). $Rf_M^a = 0,8$; $Rf_A^a = 0,9$; $Rf_P^a = 0,7$; $E_{1,9}^a = 1,0$ Try; $E_{5,8}^a = 0,7$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{23}H_{36}O_8N_4S$	Calc. C 52,8	H 6,4	O 25,3	N 9,9	S 5,6%
(568,6)	Tr. „ 52,6	„ 6,6	„ 25,1	„ 10,2	„ 5,7%

N-Carbobenzoxy- γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine (XI). On fait barboter pendant 30 min dans 25 ml de méthanol de l'azote désoxygéné par passage dans une solution de pyrogallol, puis y dissout 5,68 g (10 mmoles) d'ester tripeptidique X, ajoute 9 ml de NaOH 4N, laisse reposer 1 h à 20°, ajoute 10 ml de H_2SO_4 4N, puis 30 ml d'eau et concentre à 30 ml. La cristallisation commencée pendant la concentration est complétée par un séjour de 16 h à 0°. On filtre, lave à l'eau et sèche. On obtient ainsi 3,26 g (74%) de *N*-carbobenzoxy- γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine de F. 176°. $[\alpha]_D^{25} = -18,8^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide); $-13,2^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,1$; $Rf_A^a = 0,2$; $Rf_P^a = 0,2$; $E_{1,9}^a = 0,8$ Try; $E_{5,8}^a = 0,5$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore et nitroprussiate).

$C_{18}H_{23}O_8N_3S$	Calc. C 49,0	H 5,2	O 29,0	N 9,5	S 7,3%	Equiv.: 221
(441,5)	Tr. „ 49,1	„ 5,3	„ 28,9	„ 9,4	„ 7,3%	„ 215

L-Glutamyl- α -(*O*-éthyl)- γ -L-cystéinyl-glycinate d'éthyle $\cdot HBr$ (XII). On dissout 4,0 g (7,0 mmoles) d'ester tripeptidique X dans 25 ml d'acide acétique, ajoute 50 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, laisse 1 h à 25°, concentre, précipite à l'éther, lave et sèche. On obtient 3,45 g (96%) de bromhydrate de *L*-glutamyl- α -(*O*-éthyl)- γ -L-cystéinyl-glycine de F. 70-74° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -25,9^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide); $-11,8^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-12,5^\circ$ ($c = 1,1$; méthanol). $Rf_M^o = 0,7$; $Rf_A^o = 0,7$; $Rf_P^o = 0,7$; $E_{1,9}^o = 0,7$ Try; $E_{5,8}^o = 0,7$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{17}H_{31}O_7N_4BrS$	Calc. C 39,6	H 6,1	O 21,7	N 10,9	Br 15,5	S 6,2%
(515,4)	Tr. „ 39,9	„ 6,0	„ 21,7	„ 10,9	„ 15,4	„ 6,4%

γ -L-Glutamyl-L-cystéinyl-glycine (= glutathion) (XIII). — a) On dissout 1,00 g (2,3 mmoles) de tripeptide XI dans 44 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, laisse reposer 1 h à 25°, évapore à sec, triture dans l'éther, filtre, lave à l'acétate d'éthyle et sèche. On obtient 1,12 g de glutathion (contenant 1,5 équiv. de HBr; $[\alpha]_D^{25} = -15,0^\circ$ [$c = 0,7$; H_2O]) que l'on dissout dans 50 ml d' H_2O dégazée et fait passer sur une colonne de 15 ml d'IRA-410 (acétate). On évapore à sec, redissout le résidu huileux dans 10 ml d'eau et lyophilise. On lave par éthanol/eau (8:2), puis par l'éthanol et sèche. On obtient ainsi 560 mg (78%) de glutathion (contenant $1/2$ molécule d'éthanol) de F. 190° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -21,9^\circ$ ($c = 2,0$; eau) [pour le glutathion isolé de source naturelle [21], il est indiqué F. 195°; $[\alpha]_D^{17} = -21,0^\circ$; (eau)]. $Rf_M^o = 0,14$; $Rf_A^o = 0,21$; $Rf_P^o = 0,25$; $E_{1,9}^o = 0,91$ Try; $E_{5,8}^o = 0,49$ (révélation par ninhydrine, chlore, nitroprussiate et FOLIN; homogène). Ces valeurs sont identiques à celles du glutathion de source commerciale³⁾.

$C_{10}H_{17}O_6N_3S, 1/2C_2H_5OH$	Calc. C 40,0	H 6,0	O 31,4	N 12,8	S 9,7	éthoxyle 6,8%
(329,8)	Tr. „ 40,0	„ 5,4	„ 31,1	„ 12,8	„ 9,2	éthoxyle 6,1%

Calc. Equiv. acide 165; équiv. basique 330.

Tr. Equiv. acide 162; équiv. basique 320.

b) On dissout 1,03 g (2,0 mmoles) d'ester tripeptidique XII dans 10 ml de méthanol dégazé par un courant d'azote «désoxygéné» (voir sous XI), ajoute 6,5 ml de LiOH 1N, maintient 1 h à 20° sous atmosphère d'azote, ajoute 0,8 ml d'acide acétique glacial, filtre et évapore à sec. Il faut recrystalliser 5 fois dans éthanol/eau pour obtenir 162 mg (25%) de produit présentant les mêmes propriétés que celui obtenu par la méthode a).

Synthèse de l'oxytocine

N-Carbobenzoxy-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XIV). On dissout 11,4 g (40 mmoles) de L-prolyl-L-leucyl-glycinamide [16] dans 50 ml de diméthylformamide en chauffant à 60°, puis refroidit à 35° et ajoute rapidement sous forte agitation 20,2 g (40 mmoles) de *N*-carbobenzoxy-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinate de trichloro-2,4,5-phényle (III) et agite 12 h

³⁾ FLUKA S.A., Buchs.

à 20°. Il se produit une prise en masse totale. On ajoute 200 ml d'éther, filtre, lave à l'éther et sèche. On obtient 22,6 g (95%) de N-carbobenzoxy-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 204°. $[\alpha]_D^{21} = -80,4^\circ$ ($c = 2,0$; acide acétique 95%); $-66,5^\circ$ ($c = 1,9$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,6$; $Rf_A^a = 0,7$; $Rf_P^a = 0,7$; $E_{1,9}^a = 0,9$ Try; $E_{3,8}^a = 0,7$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{27}H_{40}O_7N_6S$	Calc. C 54,7	H 6,8	O 18,9	N 14,2	S 5,4%
(592,7)	Tr. „ 54,6	„ 7,0	„ 19,2	„ 14,4	„ 5,5%

N-Carbobenzoxy-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XVI). On dissout 29,6 g (50 mmoles) d'amide térapeptidique XIV dans 300 ml d'une solution 4,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, agite 1 h à 25°, concentre à 100 ml et verse la solution ainsi obtenue dans 1000 ml d'éther. On filtre, lave le précipité à l'éther et sèche. On obtient 27,0 g (50 mmoles) de bromhydrate de S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XV) (F. 170°); $[\alpha]_D^{22} = -66,6^\circ$; $c = 1,0$; diméthylformamide), qu'on suspend dans 150 ml de diméthylformamide; on ajoute 27,0 g (67 mmoles) de N-carbobenzoxy-L-asparaginate de trichloro-2,4,5-phényl [22], dissous dans 150 ml de dioxanne, et 7,7 ml (55 mmoles) de triéthylamine. On obtient une solution presque totale. Après 12 h d'agitation à 20°, il se produit une prise en masse. On ajoute 500 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave le résidu successivement par acétate d'éthyle/éther, méthanol à ébullition et éther de pétrole, et sèche. On obtient 28,3 g (81%) de N-carbobenzoxy-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 228°. $[\alpha]_D^{22} = -68,9^\circ$ ($c = 0,7$; acide acétique 95%); $-59,8^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,5$; $Rf_A^a = 0,6$; $Rf_P^a = 0,3$; $E_{1,9}^a = 0,8$ Try; $E_{3,8}^a = 0,7$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{31}H_{46}O_8N_8S$	Calc. C 52,7	H 6,6	O 20,4	N 15,9	S 4,5%
(706,8)	Tr. „ 52,7	„ 6,9	„ 20,2	„ 15,2	„ 4,5%

N-Carbobenzoxy-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XVIII). On dissout 28,2 g (40 mmoles) d'amide pentapeptidique XVI dans 280 ml d'une solution 4,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, laisse reposer 1 h à 25°, concentre à 100 ml, ajoute 500 ml d'éther, filtre, lave à l'éther, redissout le précipité dans 100 ml de méthanol, précipite à l'éther, filtre, lave et sèche. On obtient 29,4 g (40 mmoles) de dibromhydrate de L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XVII) (F. 188°); $[\alpha]_D^{23} = -45,7^\circ$; $c = 1,1$; diméthylformamide), qu'on dissout dans 300 ml de méthanol; on traite la solution obtenue par IRA-410 (cycle acétate), filtre, évapore à sec, triture le résidu dans l'éther de pétrole, filtre, redissout dans 120 ml de diméthylformamide, ajoute 20,8 g (46 mmoles) de N-carbobenzoxy-L-glutamate de trichloro-2,4,5-phényl [19], agite 16 h à 20°, verse la solution obtenue dans 500 ml d'éther, filtre, lave à l'éther et sèche. On suspend le produit ainsi obtenu dans 200 ml d'acétate d'éthyle, porte à ébullition, refroidit et filtre. Après un deuxième lavage à l'acétate d'éthyle bouillant et séchage, on obtient 27,1 g (82%) de N-carbobenzoxy-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 211°. $[\alpha]_D^{23} = -76,7^\circ$ ($c = 1,2$; acide acétique 95%); $-56,2^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide); $-77,4^\circ$ ($c = 0,9$; méthanol). $Rf_M^a = 0,2$; $Rf_A^a = 0,3$; $Rf_P^a = 0,3$; $E_{1,9}^a = 0,7$ Try; $E_{3,8}^a = 0,6$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{30}H_{54}O_{11}N_{10}S$	Calc. C 51,8	H 6,5	O 21,1	N 16,8	S 3,8%
(835,0)	Tr. „ 51,9	„ 6,8	„ 20,8	„ 16,5	„ 3,6%

N-Carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XX). On dissout 9,19 g (11 mmoles) d'amide hexapeptidique XVIII dans 200 ml d'une solution 4,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, laisse reposer 1 h à 25°, concentre à 100 ml, précipite à l'éther, filtre, lave à l'éther et sèche. On obtient ainsi 8,64 g (10 mmoles) de dibromhydrate de L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XIX) (F. 192°); $[\alpha]_D^{23} = -41,8^\circ$; $c = 1,1$; diméthylformamide), que l'on dissout dans 200 ml de méthanol contenant 10 ml de diméthylformamide; on traite par 80 ml de IRA-410 (cycle acétate), évapore le méthanol à 20°, précipite l'acétate de l'hexapeptide par l'éther, filtre rapidement, suspend dans 30 ml de diméthylformamide, ajoute 5,2 g (13 mmoles) de N-carbobenzoxy-L-isoleucinate de p-nitrophényl [15] et agite 16 h à 20°. On ajoute à la masse gélatineuse de l'acétate d'éthyle, filtre, resuspend à plusieurs reprises dans de l'acétate d'éthyle bouillant, filtre et sèche. On obtient ainsi 7,31 g (76%) de N-carbobenzoxy-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-

éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 229°. $[\alpha]_D^{25} = -77,0^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-40,0^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,5$; $Rf_A^a = 0,6$; $Rf_P^a = 0,2$; $E_{1,9}^a = 0,7$; $E_{5,8}^a = 0,7$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{42}H_{88}O_{12}N_{11}S$	Calc.	C 53,2	H 6,9	O 20,2	N 16,3	S 3,4%
(948,1)	Tr.	.. 53,2	.. 7,3	.. 20,3	.. 16,1	.. 3,5%

O, N-Di-carbobenzoxy-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyll-L-cystéinyl-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (XXI). A une solution de 6,63 g (7,0 mmoles) d'amide heptapeptidique XX dans 100 ml d'acide acétique anhydre on ajoute 200 ml d'une solution 4,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique. Après 1 h on concentre à 50 ml, précipite à l'éther, filtre et sèche. Le bromhydrate de l'amide heptapeptidique XXI obtenu (F. 192°; $[\alpha]_D^{25} = -24,2^\circ$) est dissous dans 100 ml de méthanol contenant 10 ml de diméthylformamide; on traite par 30 ml de IRA-410 (cycle acétate), filtre, évapore à sec, suspend dans 100 ml de diméthylformamide, ajoute 6,29 g (10 mmoles) de O, N-di-carbobenzoxy-L-tyrosinate de trichloro-2,4,5-phényle [19] et agite pendant 72 h. On concentre la suspension obtenue à 50 ml, ajoute 250 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave à plusieurs reprises par l'acétate d'éthyle à ébullition et sèche. On obtient ainsi 7,21 g (81%) de O, N-di-carbobenzoxy-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyll-L-cystéinyl-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide de F. 236°. $[\alpha]_D^{25} = -66,8^\circ$ ($c = 0,7$; acide acétique 95%); $-41,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $\text{Log } \varepsilon = 2,05$ à 286 nm (pas de maximum). $Rf_M^a = 0,6$; $Rf_A^a = 0,7$; $Rf_P^a = 0,6$; $E_{1,9}^a = 0,5$ Try; $E_{5,8}^a = 0,5$ His (révélation par FOLIN, ninhydrine et chlore).

$C_{55}H_{90}O_{16}N_{12}S$	Calc.	C 56,9	H 6,5	O 20,5	N 13,5	S 2,6%
(1245,42)	Tr.	.. 56,5	.. 6,9	.. 20,3	.. 13,1	.. 2,8%

L-Tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyll-L-cystéinyl-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (XXIII). On dissout 3,75 g (3,0 mmoles) d'amide octapeptidique XXII dans 70 ml d'une solution 4,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse 30 min à 20°, concentre à moitié du volume, ajoute 100 ml d'éther, filtre, lave à l'acétate d'éthyle et sèche (3,9 g). On redissout dans 90 ml de méthanol contenant 10 ml de diméthylformamide, traite par 20 ml d'IRA-410 (base libre), filtre, évapore à sec, triture dans l'éther et sèche. On obtient ainsi 2,45 g (86%) de L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyll-L-cystéinyl-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide de F. 225° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -69,2^\circ$ ($c = 1,1$; acide acétique 95%); $-58,6^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide). $\text{Log } \varepsilon = 3,22$ à 286 nm. $Rf_M^o = 0,6$; $Rf_A^o = 0,7$; $Rf_P^o = 0,4$; $E_{1,9}^o = 0,6$ Try; $E_{5,8}^o = 0,5$ His (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN).

$C_{43}H_{80}O_{12}N_{10}S$	Calc.	C 52,9	H 7,0	O 19,6	N 17,2	S 3,3%
(977,1)	Tr.	.. 52,8	.. 7,2	.. 19,2	.. 17,0	.. 3,2%

N-Carbobenzoxy-S-éthylcarbamoyll-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyll-L-cystéinyl-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (XXIV). On suspend 2,35 g (2,4 mmoles) d'amide octapeptidique XXIII et 1,50 g (3,0 mmoles) de N-carbobenzoxy-S-éthylcarbamoyll-L-cystéinate de trichloro-2,4,5-phényle (III) dans 10 ml de diméthylformamide. La dissolution n'est que partielle. On agite pendant 72 h à 25°. Il se produit une prise en masse gélatineuse. On ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle, filtre, suspend le résidu dans 50 ml de méthanol bouillant, filtre, répète encore une fois cette opération et sèche. On obtient ainsi 2,02 g (70%) de N-carbobenzoxy-S-éthylcarbamoyll-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyll-L-cystéinyl-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide de F. 231-240°. $[\alpha]_D^{25} = -64,0^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $\text{Log } \varepsilon = 3,20$ à 286 nm. $Rf_M^a = 0,7$; $Rf_A^a = 0,8$; $Rf_P^a = 0,4$; $E_{1,9}^a = 0,6$ Try; $E_{5,8}^a = 0,5$ His (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN).

$C_{57}H_{84}O_{18}N_{14}S_2$	Calc.	C 53,3	H 6,6	O 19,9	N 15,2	S 5,0%
(1285,5)	Tr.	.. 53,2	.. 6,9	.. 19,8	.. 15,1	.. 5,1%

S-Ethylcarbamoyll-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-éthylcarbamoyll-L-cystéinyl-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide · 3 HBr (XXV). On dissout 1,28 g (1,0 mmole) d'amide nonapeptidique XXIV dans 10 ml d'acide acétique, ajoute 20 ml d'une solution 4,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, laisse reposer 30 min à 25°, concentre à 20 ml, précipite à l'éther, filtre, lave à l'acétate d'éthyle et sèche. On obtient 1,40 g (98%) de tribromhydrate de S-éthyl-

carbamoyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-éthylcarbamoyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 90° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = 34,6^{\circ}$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $\text{Loge} = 3,19$ à 285,5 nm. $\text{Rf}_M^0 = 0,5$; $\text{Rf}_P^0 = 0,6$; $\text{E}_{1,9}^0 = 0,5$ Try; $\text{E}_{3,8}^0 = 0,4$ His (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN).

$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{14}\text{N}_{14}\text{S}_2, 3\text{HBr}, \text{H}_2\text{O}$ (1412,15)	Calc. C 41,7	H 5,9	O 17,0	N 13,9	Br 17,0	S 4,5%
	Tr. „ 41,9	„ 6,3	„ 17,4	„ 13,9	„ 17,3	„ 4,3%

Oxytocine (XXVI). On dissout 500 mg (0,35 mmole) de bromhydrate de nonapeptide XXV à -30° dans 50 ml d'ammoniac anhydre contenant 5 ml de méthanol anhydre, garde la solution ainsi obtenue dans une bouteille à pression 16 h à 25° . On refroidit à -30° , évapore à sec, sèche le résidu au vide poussé, reprend dans 5 ml de méthanol contenant 0,6 ml d'acide acétique, dilue à 400 ml avec de l'eau distillée (pH obtenu: 4,5), ajuste le pH à 7,5, oxyde avec un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate, ramène le pH à 4,5 et filtre. On obtient ainsi une solution dont l'activité oxytocique totale mesurée sur la pression sanguine du Coq⁴) est 102000 UI soit 293 UI/mg. Cette solution est concentrée à 200 ml, puis dessalée [23] sur une colonne de IRC-50-XE-64 et lyophilisée. Le résidu est purifié par contre-courant dans le système *sec.*-butanol/eau/ acide acétique (120:160:1). Après 480 transferts, on réunit le contenu des tubes centraux du pic principal ($K = 0,38$), évapore le *sec.*-butanol sous pression réduite à 20° , lyophilise la solution aqueuse et sèche le résidu sur KOH et P_2O_5 à 10^{-2} Torr. On obtient ainsi 109 mg (31%) d'oxytocine de F. 241° (avec ramollissement à 170°). L'activité oxytocique, mesurée par la baisse de pression sanguine du Coq⁴), est de $510 \pm 23 \cdot \text{UI/mg}$. $[\alpha]_D^{25} = -17^{\circ}$ ($c = 0,5$; acide acétique 1N). $\text{Rf}_M^0 = 0,64$; $\text{Rf}_A^0 = 0,71$; $\text{Rf}_P^0 = 0,50$; $\text{E}_{1,9}^0 = 0,64$ Try; $\text{Rf}_{5,8}^0 = 1,65$ Try (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN).

$\text{C}_{43}\text{H}_{66}\text{O}_{12}\text{N}_{12}\text{S}_2$ (1007,2)	Calc. C 51,3	H 6,6	O 19,1	N 16,7	S 6,4%
	Tr. „ 50,9	„ 6,7	„ 19,3	„ 16,7	„ 6,7%

SUMMARY

New syntheses of glutathion and oxytocin are described, in which an ethylcarbamoyl ($\text{C}_2\text{H}_5\text{-NH-CO-}$) group has been used for the protection of the thiol fonction of cysteine. This new protecting group is stable under acidic and neutral conditions, but is readily cleaved by basic reagents. Neither desulfuration nor racemisation have been observed.

Laboratoires de chimie pharmaceutique
SANDOZ S.A., Bâle

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. H. SIFFERT & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* 108, 753 (1935).
- [2] K. HOFMANN & H. YAJIMA, *J. Amer. chem. Soc.* 83, 2289 (1961); St. GUTTMANN, Peptide Symposium, ed. G. T. YOUNG, Pergamon Press, Oxford 1963, p. 41.
- [3] C. BERSE, R. BOUCHER L. PICHÉ, *J. org. Chemistry* 22, 805 (1957); M. A. ONDETTI & M. BODANSKY, *Chemistry & Ind.* 1962, 697.
- [4] G. F. HOLLAND & L. A. COHEN, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 3765 (1958).
- [5] P. J. E. PIMLOTT & G. T. YOUNG, *Proc. chem. Soc.* 1958, 257; P. J. E. BROWNLEE, M. E. COX, B. O. HANDFORD, J. C. MARSDEN & G. T. YOUNG, *J. chem. Soc.* 1964, 3832.
- [6] J. C. SHEEHAN & D. D. H. YANG, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 1158 (1958); F. E. KING, J. W. CLARK-LEWIS & R. WADE, *J. chem. Soc.* 1957, 880.
- [7] L. ZERVAS, J. PHOTAKI & N. GEHLIS, Peptide Symposium, ed. G. T. YOUNG, Pergamon Press, Oxford 1963, p. 27; *J. Amer. chem. Soc.* 85, 1337 (1963); I. PHOTAKI, *Experientia* 20, 487 (1964).

⁴) Déterminée par le Dr E. STÜRMER de notre Département de recherches médico-biologiques (Dir. Dr A. CERLETTI).

- [8] F. M. CALLAHAN, G. W. ANDERSON, R. PAUL & J. E. ZIMMERMANN, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 201 (1963); A. CHIMIAK, *Peptide Symposium*, ed. G. T. YOUNG, Pergamon Press, Oxford 1963, p. 37; H. C. BEYERMAN, *ibid.*, p. 53.
- [9] L. ZERVAS & D. M. THEODOROPOULOS, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 1359 (1956); G. AMIARD, R. HEYMES L. VELLUZ, *Bull. Soc. chim. France* **1956**, 698.
- [10] L. ZERVAS & I. PHOTAKI, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 3887 (1962).
- [11] A. BERGER, J. NIGUCHI & E. KATCHALSKY, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 4483 (1956); M. SOKOLOVSKY, M. WILCHEK & A. PATCHORNIK, *ibid.* **86**, 1202 (1964).
- [12] R. KUHN & G. QUADBECK, *Ber.* **84**, 844 (1951).
- [13] ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **47**, 1852 (1958); S. SAKAKIBARA, K. H. SHIN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 4921 (1962).
- [14] D. L. ROSS, C. G. SKINNER & W. SHIVE, *J. Med. pharm. Chemistry* **3**, 519 (1961).
- [15] V. DU VIGNEAUD, C. RESSLER, J. M. SWAN, C. W. ROBERTS, P. G. KATSOYANNIS & S. GORDON, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 4879 (1953); M. BODANSKY & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 5688 (1959).
- [16] R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, *Helv.* **38**, 1491 (1955).
- [17] TH. WIELAND & G. PFLEIDER, *Angew. Chem.* **67**, 257 (1955).
- [18] ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **43**, 200 (1960).
- [19] J. PLESS & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **46**, 1609 (1963).
- [20] S. GOLDSCHMIDT & C. JUTZ, *Chem. Ber.* **86**, 1116 (1953).
- [21] C. R. HARRINGTON & T. H. MEAD, *Biochem. J.* **29**, 1602 (1935).
- [22] R. L. HUGUENIN, *Helv.* **47**, 1934 (1964).
- [23] H. B. F. DIXON, *Biochim. Biophysica Acta* **34**, 251 (1959).

15. Réactions entre les composés trivalents du phosphore et les dérivés α -halogénés de la triméthyl-2, 4, 6-acétophénone

par R. F. HUDSON et G. SALVADORI

(28 IX 65)

Les réactions des cétones α -halogénées avec les phosphines et les phosphites sont extrêmement complexes [1] et conduisent à des produits différents selon la nature des réactifs mis en jeu. Les principaux produits que l'on peut ainsi obtenir sont représentés dans les réactions suivantes:

