

1. Sur les relations entre structure polypeptidique et activité strepogénique

1. Peptides de la cystine

par **P. Baudet**, **I. Borecka** et **E. Cherbuliez**

Laboratoire de Chimie organique de l'Université de Genève

(29 VII 67)

Summary. The authors propose for the characterization of strepogenic substances of known composition the specific activity, *i. e.* the number of WOOLLEY units per μ mole.

Starting from L-leucyl-L-cystinyl-L-leucyl-L-valyl-L-glutamic acid (of very high strepogenic activity, 400 WOOLLEY units per mg, 230 WOOLLEY units per μ mole) seven peptides have been synthesized by suppression and/or replacement of amino acid residues. A study of the relation between activity and structure of these peptides shows that:

1. In this group cystine is an indispensable element for activity.
2. This amino acid must either be linked on each side to leucine residues or linked by its carboxyles to leucine, its amino groups being free.

From these results, the conception emerges that the strepogenic polypeptides may be characterized by an amino acid (in this group of peptides, cystine) which must be linked to particular amino acid residues. If this conception is correct, there should exist several types of strepogenines depending on the nature of the amino acid essential for their activity.

Les strépogénines sont des polypeptides nécessaires au développement de certains *Lactobacillus*. Elles sont formées notamment par des dégradations enzymatiques de la caséine. Les strépogénines agissent en quantités minimes, réduisant considérablement la période de latence (lag) précédant la croissance proprement dite, accélérant ensuite le développement de l'organisme dans la phase logarithmique de la multiplication cellulaire. FUNK [1] le premier observa cet effet; WOOLLEY [2] reconnut son origine polypeptidique. Des facteurs endogènes de cette nature ont été identifiés dans les cellules de *Lactobacillus casei* ATCC 7469 parvenues à demi-croissance [3].

On connaît maintenant la structure de plusieurs strépogénines [4] [5], qu'il s'agisse de substances isolées de produits d'hydrolyse partielle de divers protides, ou obtenues par synthèse [6]. Cependant, on chercherait en vain dans ces structures un élément commun, spécifique. On trouve p. ex. que les deux peptides suivants ont des activités proches de 100 unités WOOLLEY (voir plus loin) par mg: valyl-glutaminyl-valyl-leucyl-prolyl-prolyl-prolyl-valyl-prolyl-glutaminyl-lysine [5] et acide séryl-histidyl-leucyl-valyl-glutamique [6]. Une spécificité de structure ne semble donc pas requise; par contre, on peut penser que les strépogénines ont un mode d'action commun, qui pourrait se situer dans un métabolisme dans lequel l'acide folique est intéressé. En effet, deux d'entre nous ont observé [7] chez *Lactobacillus casei* ATCC 7469 une dépendance réciproque entre l'activité d'un hydrolysats tryptique de caséine à forte activité strépogénique, et cet acide.

L'activité strépogénique définie selon WOOLLEY [9] est déterminée dans le milieu de LANDY-DICKEN [10], après 22 h de culture. Le milieu de conservation du micro-organisme et celui de préparation de l'inoculum de *Lactobacillus casei* ATCC 7469 sont enrichis par un extrait de tomate [7].

On a l'habitude de rapporter l'activité strépogénique d'une substance à l'unité de poids. Or, comme nous le verrons plus loin, on peut considérer comme très probable que l'action strépogénique d'un peptide donné résulte de la présence d'un groupement chimique particulier. Il nous semble donc justifié, dans les considérations qui suivent, de rapporter l'activité des peptides envisagés, non seulement au poids, mais encore à la micromole. Pour l'activité (en unités WOOLLEY) exprimée ainsi, nous proposons le nom d'*activité WOOLLEY spécifique*.

MERRIFIELD & WOOLLEY [8] ont déjà synthétisé 8 peptides actifs; parmi ceux-ci, les plus actifs sont les acides leucyl-cystinyl-leucyl-valyl-glutamique et séryl-histidyl-leucyl-valyl-glutamique, ainsi que la séryl-histidyl-leucyl-valyl-phénylalanine, qui ont resp. 400, 85 et 165 unités WOOLLEY par mg. Ces auteurs remarquent que dans ce groupe de 8 peptides l'activité strépogénique augmente lorsque leur caractère hydrophobe s'accuse. D'après leurs chiffres, elle est maximum pour les pentapeptides [8]. WOOLLEY et coll. font remarquer que leurs peptides les plus actifs contiennent, l'un de la cystine, et les deux autres, le groupe sér-his. Toutefois, ces données ne mettent pas en évidence une particularité structurale essentielle à l'activité strépogénique des peptides que décrivent ces auteurs.

Les variations de l'activité qui résulteraient de l'aménagement de la structure d'un polypeptide strépogénique très actif, par remplacement, modification, permutation ou suppression d'acides aminés pouvaient peut-être préciser s'il existe un élément de structure essentiel à l'action strépogénique. Dans cette idée, nous étudierons dans le présent mémoire l'activité de peptides dont les structures dérivent de la séquence de l'acide leucyl-cystinyl-leucyl-valyl-glutamique (400 unités WOOLLEY par mg; activité WOOLLEY spécifique 230), la strépogénine la plus active synthétisée par MERRIFIELD & WOOLLEY [8].

L'acide leucyl-cystinyl-leucyl-valyl-glutamique (I) que nous avons synthétisé par une voie très voisine de celle empruntée par MERRIFIELD & WOOLLEY [8] présentait l'activité attendue. Quant à celle des peptides II à IX que nous avons préparés par suppression, modification ou échange de restes à partir de la structure témoin du pentapeptide I, elle varie considérablement selon les cas (voir tableau).

L'activité appréciable des peptides II et III, comparée à celle de I, indique que l'acide glutamique n'est pas indispensable à son maintien; elle montre également que l'alanine peut remplacer la valine. Mais lorsqu'on supprime encore le reste d'alanine dans le térapeptide III, ce qui conduit au tripeptide leucyl-cystinyl-leucine (IV), cela entraîne une baisse de 67% de l'activité strépogénique rapportée au poids, et de près de 80% rapportée à la μ mole. Toutefois, ce dernier peptide possède encore une activité appréciable (130 unités WOOLLEY/mg ou activité WOOLLEY spécifique 45), la plus forte que l'on ait observée chez un tripeptide. Les modifications apportées à la structure leucyl-cystinyl-leucine (IV), par le remplacement de la leucine C-terminale par de l'alanine d'une part (peptide V) et par l'acide glutamique de l'autre (peptide VI), rendent l'activité faible ou nulle. Ainsi, les éléments de structure leucyl-valine et leucyl-

alanine resp. des peptides à activité maximale, les acides leucyl-cystinyl-leucyl-valyl-glutamique et leucyl-cystinyl-leucyl-alanyl-glutamique, sont indispensables au maintien de cette activité (400 unités WOOLLEY/mg; activité WOOLLEY spécifique > 200). De même, le reste leucyle C-terminal est nécessaire à l'activité de la leucyl-cystinyl-leucine. Lorsqu'on supprime du côté N-terminal du peptide II la leucine, on obtient le térapeptide acide cystinyl-leucyl-alanyl-glutamique (VII) dont l'activité est au moins de moitié plus faible (200 unités WOOLLEY par mg; activité WOOLLEY spécifique 87). Cependant, nous savons que la séquence leucyl-valyle indiquée plus haut comme nécessaire au maintien de l'activité maximum n'est pas directement responsable de celle-ci puisque WOOLLEY a montré (voir tableau) que le tripeptide acide leucyl-valyl-glutamique n'est pas actif. Il peut paraître alors, par l'analyse de la structure de l'acide cystinyl-leucyl-alanyl-glutamique, à la lumière de ces données (et puisque l'on sait qu'ici la structure leucyl-alanyl-glutamique est équivalente à la structure leucyl-valyl-glutamique) que la cystine est l'élément majeur de l'activité strépogénique de ces peptides. Des arguments expérimentaux viennent encore appuyer cette déduction: l'oxydation du reste de la cystine dans l'ac. leucyl-cystinyl-leucyl-valyl-glutamique (I), fournissant l'ac. leucyl-cystéyl-leucyl-valyl-glutamique (I ox.), aussi bien que le remplacement du reste cystéyle dans III par un reste de méthionine (peptide VIII), abolissent l'activité. De plus, le remplacement de la cystine de VII par la sérine conduit au térapeptide acide séryl-leucyl-valyl-glutamique [8] (voir tableau) pratique-

Activité strépogénique en unités WOOLLEY [A: par mg; B: par μ mole (act. WOOLLEY spéc.)] de peptides apparentés au peptide I de MERRIFIELD et WOOLLEY

Les % d'activité se rapportent à l'activité du peptide I

Peptide		act. A	% d'act. A	act. B	% d'act. B
leu-val-glu	[6]	0	0	0	0
leu-cys -leu-val-glu	(I) (1-7) *	400	100	230	100
leu-cys -leu-ala-glu	(II) (2-5)	400	100	220	95
leu-cys -leu-ala	(III) (3-3)	400	100	165	72
leu-cys -leu-val-glu	(I ox.) (3-3a)	0	0	0	0
leu-cys -leu-val-glu	(IX) (9-1)	0	0	0	0
leu-mét-leu-ala	(VIII) (8-4)	0	0	0	0
cys -leu-ala-glu	(VII) (7-7)	200	50	87	38
sér -leu-val-glu	[8]	29	7	13	6
cys-his -leu-val-glu	[8]	16	4	8	3
leu-cys -leu	(IV) (4-3)	130	33	45	20
leu-cys -ala	(V) (5-3)	29	7	9	4
leu-cys -glu	(VI) (6-2)	0	0	0	0

*) Le numérotage en chiffres arabes se rapporte aux numérotages dans les subdivisions correspondantes de la partie expér.

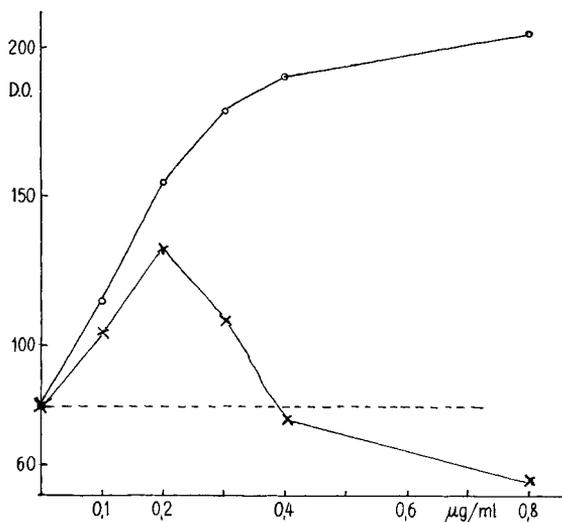
ment inactif. Il en est de même pour l'ac. leucyl-S-benzyl-cystéinyl-leucyl-valyl-glutamique (IX), produit d'hydrolyse acide du N-CBO-leucyl-S-benzyl-cystéinyl-leucyl-valyl-glutamate de méthyle. La présence du reste de cystine paraît donc essentielle à l'activité de tout un groupe de peptides; mais cette présence n'est pas suffisante, car la nature des restes liés à la cystine est très importante. En effet, si nous prenons pour modèle le peptide leucyl-cystinyl-leucine (IV) dans lequel la cystine est entourée par des restes de leucine et que nous procédions à des variations, voici ce que l'on constate: si du côté C-terminal on remplace la leucine par de l'alanine (peptide V) ou de l'ac. glutamique (peptide VI), l'activité devient respectivement faible et nulle. D'autre part, considérons le peptide acide leucyl-cystinyl-leucyl-alanyl-glutamique (II) dans lequel la cystine est entourée également par des restes de leucine: enlevons-lui les restes leucine N-terminale, nous obtenons alors l'acide cystinyl-leucyl-alanyl-glutamique (VII) dont l'activité par unité de poids est de 50% plus faible. Enfin, considérons l'acide cystinyl-histidyl-leucyl-valyl-glutamique, proche de VII (voir tableau) (puisque la séquence leucyl-valyl-glutamique est équivalente à la séquence leucyl-alanyl-glutamique) mais où le reste de leucine fixé au carboxyle de la cystine est remplacé par un reste d'histidine, l'activité par unité de poids passe de 50 à 4% de celle du peptide I.

L'ensemble de ces données paraît démontrer que la cystine doit être liée par ses carboxyles à des restes leucyle; lorsqu'à ce groupement s'ajoutent encore des restes leucyle fixés sur les fonctions NH_2 - de la cystine, l'activité se trouve encore considérablement accrue.

Ces conclusions pourraient être considérées comme étant compatibles avec la conception de KIHARA & SNELL [11] selon laquelle l'activité strépogénique résulterait de la présence, dans un polypeptide, d'un acide aminé «limitant» qui, compris à l'intérieur d'une chaîne peptidique appropriée, pénétrerait plus facilement dans la cellule bactérienne qu'il ne pourrait le faire à l'état libre. Cependant, si ce mécanisme peut rendre compte des effets observés par ces auteurs, il paraît difficile de l'appliquer aux résultats que nous avons observés chez *Lactobacillus casei* ATCC 7469 dans le milieu de LANDY-DICKEN. En effet, nos peptides, comme ceux de MERRIFIELD & WOOLLEY [8] assurent la demi-croissance de l'organisme à des concentrations beaucoup plus basses que celles données par KIHARA & SNELL [11]; par exemple, alors que l'acide leucyl-cystinyl-leucyl-alanyl-glutamique assure la demi-croissance à 0,09 nanomole (0,1 μg) par ml, le glutathion, le peptide à base de cystine le plus actif que KIHARA & SNELL décrivent, ne produit ce même résultat qu'à la concentration de 6 μg (20 nanomoles) par ml (dans un milieu privé de cystine), concentration qui est env. 200 fois plus grande. Par ailleurs, dans le milieu de LANDY-DICKEN (contenant 0,1 mg de L-cystine par ml), nous observons que le glutathion a seulement une faible activité strépogénique (15 U WOOLLEY par mg). De plus, le dipeptide à base de sérine qu'ils signalent, la séryl-glycine, n'est actif qu'à raison de 16 μg (100 nanomoles) par ml, et si le glutaminyl-asparaginyll-cystinyl-prolyl-leucyl-glycinamide est actif à une concentration de 0,63 μg par ml, il le doit probablement à la présence de glutamine, facteur de croissance bien connu pour *Lactobacillus casei*; en effet, pour WOOLLEY [12] le disulfure cystinyl-prolyl-leucyl-glycinamide, dont le reste est un constituant de cet amide peptidique, est dépourvu d'activité strépogénique. Enfin, si l'on voulait raisonner que l'acide

leucyl-cystinyl-leucyl-alanyl-glutamique pourrait apporter au microorganisme la cystine (acide aminé limitant) dont il a besoin, il ne faudrait pas perdre de vue que 0,1 μg par ml de ce polypeptide (ce qui produit la demi-croissance en 23 h; 400 unités WOOLLEY par mg) ne peut fournir que 0,022 μg de L-cystine par ml au *Lactobacillus casei*, examiné dans un milieu qui en contient à l'état libre déjà 100 μg par ml. A notre avis l'action strépogénique proprement dite s'écarte nettement de l'effet observé par KIHARA & SNELL. D'après notre conception, en dehors des polypeptides strépogéniques dont la cystine est l'élément primordial, il doit pouvoir exister d'autres catégories de strépogénines où cet élément est un autre acide aminé – la découverte de nouveaux types de strépogénines, analysés comme nous l'avons fait pour l'acide leu-cys¹-leu-val-glu, serait déterminante pour vérifier pleinement cette hypothèse.

Chez l'acide leucyl-cystinyl-leucyl-valyl-glutamique, l'acide leucyl-cystinyl-leucyl-alanyl-glutamique et la leucyl-cystinyl-leucyl-alanine, nous avons fait la constatation suivante encore inexplicée. Certains lots de ces polypeptides synthétiques activent la croissance du microorganisme de plus en plus faiblement lorsque leur concentration augmente, pour inhiber totalement son développement à partir d'une concentration critique située entre 0,6 et 0,8 μg par ml (v. Fig.). Cet effet occasionnel



Activité de deux lots de L-leucyl-L-cystinyl-L-leucyl-L-alanine envers *Lactobacillus casei* ATCC 7469, mesurée par la densité optique (D.O., App. KLETT-SUMMERSON) des cultures

○—○ Lot à activité strépogénique normale; ×—× Lot inhibiteur; ---- Lecture moyenne des témoins

s'observe, que l'on se soit adressé à la S-benzylcystéine ou à la cystine pour leur synthèse. A l'examen chimique et physico-chimique (dosage des acides aminés constitutifs, solubilité, chromatographie, électrophorèse), les lots inhibiteurs ne se sont pas révélés différents de ceux qui présentaient l'effet strépogénique caractéristique. Il ne s'agit probablement pas de la conséquence d'une racémisation puisqu'un lot de leucyl-

cystinyl-leucyl-alanine présentant l'effet inhibiteur, a été hydrolysé quantitativement par la leucine-amino-polypeptidase (voir partie expérimentale). On ne peut pas non plus envisager une transsulfuration entre le peptide et la cystine du milieu, puisque l'on sait que le genre de peptides qui en résulteraient, avec un reste de cystine inséré asymétriquement, n'est pas stable [13]. Une hydrogénolyse incomplète laissant subsister une partie des restes de cystine sous forme de S-benzylcystéine – ce que nous avons constaté quelquefois – ne saurait non plus être incriminée puisque parfois elle s'est présentée aussi chez des lots qui n'ont pas été inhibiteurs. Quoiqu'il en soit, lorsque le pouvoir inhibiteur est présent dans la solution des produits stérilisés par filtration, l'autoclavage (15 min à 115°) aggrave l'effet. Nous n'avons jamais retrouvé chez leu-cys-ala, leu-cys-glu et leu-mét-leu-ala (par ailleurs, à activité strépogénique nulle ou très faible) l'effet inhibiteur en question.

Pour les synthèses, nous avons utilisé de préférence des groupement protecteurs N- et C-terminaux, éliminables par acidolyse ou par hydrogénolyse. Ce choix nous a conduit à faire des observations intéressantes: d'une part, nous isolons l'ester monobenzyle de l'acide N-Cbo-S-benzyl-cystéinyl-leucyl-alanyl-glutamique, au lieu de l'ester dibenzyle attendu, et de l'autre, nous observons une forte dégradation des peptides au cours de l'hydrogénolyse finale par le sodium dans l'ammoniac liquide. La perte d'un groupement ester benzyle a probablement lieu au cours de l'acidolyse du Cbo-leucyl-alanyl-glutamate α, γ -di-benzyle, étape de synthèse du térapeptide. KISFALUDY & LÖW [14] ont déjà constaté dans ces conditions une élimination semblable intéressant un reste d'acide glutamique. On peut attribuer cette débenzylation à la relative aisance de formation d'un ion oxonium par protonation d'un oxygène de la fonction ester, et comme cette réaction ne paraît affecter que des restes d'acides aminés dicarboxyliques, on peut concevoir que l'acidolyse puisse être assistée par un effet anchimérique [15]. Les analyses du N-Cbo-S-benzyl-cystéinyl-leucyl-alanyl-glutamate monobenzyle (que nous isolons avec un faible rendement) rendent bien compte de cette structure; de plus, le peptide protégé fournit l'acide cys-leu-ala-glu attendu, tout comme le N-Cbo-S-benzyl-cystéinyl-leucyl-alanyl-glutamate de méthyle.

Lorsqu'une étape comporte une hydrogénolyse, par le sodium dans l'ammoniac liquide, d'un peptide contenant le reste S-benzyl-cystéine, les rendements finals en disulfure (très peu soluble dans l'eau) sont relativement faibles (25 à 40%); cela s'explique par une forte dégradation des dérivés peptidiques au cours de l'hydrogénolyse. En effet, les eaux-mères de cristallisation des peptides disulfurés contiennent de nombreux produits neutres ou acides, réagissant avec la ninhydrine et dépourvus d'activité strépogénique. Ce phénomène s'observe, que l'ammoniac ait été redistillé ou non. Dans la pratique, on condense le gaz ammoniac directement dans le ballon-laboratoire contenant le peptide à l'état solide (voir partie expérimentale) et poursuit l'opération à l'abri de l'atmosphère. GUTTMANN [16] a observé une dégradation du N-Cbo-glycyl-lysyl-prolyl-valylamide en glycyl-lysine et prolyl-valylamide durant l'hydrogénolyse par le sodium dans l'ammoniac liquide. Dans l'ammoniac liquide, les bases conjuguées provenant des fonctions carboxyliques présentes dans les peptides, deviennent de puissants nucléophiles; on peut alors envisager leur intervention dans cette dégradation.

Partie expérimentale

1. Méthodes analytiques

1.1. Les *F*. sont déterminés au moyen de la platine chauffante du microscope de KOFLER; ils sont corrigés.

1.2. Les *analyses centésimales*¹⁾ ont été effectuées après séchage des prises à 80° ou 115°, sous 0,05 à 0,07 Torr.

1.3. Les *pouvoirs rotatoires* ont été mesurés d'une part à l'aide d'un polarimètre ordinaire et d'autre part à l'aide d'un polarimètre à lecture automatique.

Les peptides libres sont pratiquement insolubles dans les solvants organiques et peu solubles dans l'eau en milieu acide dilué; de ce fait les déterminations du pouvoir rotatoire sont peu précises, à l'exception du cas de la leucyl-cystinyl-leucyl-alanine (III), suffisamment soluble dans HCl 0,1N. Nous n'avons pas fait de mesures polarimétriques en milieu aqueux alcalin où les peptides libres sont assez solubles, en raison du risque de dégradation et de racémisation.

1.4. Les *chromatographies sur couche mince* ont été faites sur cellulose 300 MN à l'aide des solvants indiqués avec la valeur du Rf des peptides libres. Rf (P) indique que le solvant est la phase légère du mélange *n*-butanol-ac. acétique-eau (4:1:5) de PARTRIDGE [17].

1.5. Les *électrophorèses à haut voltage* (iHV) ont été conduites sur papier SCHLEICHER et SCHUELL No 2034a lavé, à 1800 V durant 2 h au pH indiqué dans le texte à l'occasion des données analytiques appropriées (*m* (iHV) = mobilité).

1.6. Pour les *hydrolyses chlorhydriques*, des prises de 100 µg de peptide ont été chauffées 18 h à 105° en tube capillaire avec 10 µl de HCl 6N.

1.7. Les *hydrolyses enzymatiques* des peptides ont été faites dans le tampon Tris de pH 8,2, à 38°, pendant 12 h, avec une préparation de leucine-aminopeptidase de rein de Porc d'une activité *c* = 25, selon la définition de SPACKMAN [18].

1.8. *Dosage des acides aminés dans les hydrolysats*. Dans l'hydrolysat de l'acide leucyl-cystinyl-leucyl-valyl-glutamique les acides aminés ont été dosés par la méthode colorimétrique à la ninhydrine-hydrindantine [19], après séparation d'abord chromatographique sur papier SCHLEICHER et SCHUELL No 2043a lavé, dans une première direction, à l'aide du solvant de PARTRIDGE [17], puis électrophorétique dans la deuxième direction (pH 2, 1800 V, 2½ h). Pour tous les autres hydrolysats, la séparation des acides aminés a été effectuée par simple électrophorèse (mêmes conditions), dont l'effet séparateur est suffisamment bon pour permettre le dosage colorimétrique. Il faut évidemment éviter toute contamination des papiers par des vapeurs ammoniacales. Lorsque ces précautions sont prises, la précision de ce dosage est de l'ordre de 5%.

1.9. Les *titrages acidimétriques en milieu non-aqueux* ont été faits avec le méthoxyde de sodium selon KATCHALSKY [20], en solution dans du méthanol *puriss*.

1.10. *L'activité stréptogénique* est déterminée à l'aide du *Lactobacillus casei* ATCC 7469 dans le milieu de LANDY-DICKEN [10], selon les indications que nous avons données précédemment [7], et exprimée en unités WOOLLEY [9], définies comme suit: une unité correspond à l'activité d'une prise qui provoque la demi-croissance du *Lactobacillus casei* ATCC 7469 après 24 h de culture à 37°. En vue de ce dosage, les peptides libres sont dissous directement dans le milieu de LANDY-DICKEN; les dilutions désirées sont obtenues par addition de ce même milieu aux solutions initiales.

2. Synthèses²⁾

2.1. *Acide L-leucyl-L-cystinyl-L-leucyl-L-valyl-L-glutamique (1-7) (= I)*

2.1.1. *N-Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-valinate de méthyle (1-1)*. A une solution de 18,2 g (68,7 mmoles) de N-Cbo³⁾-L-leucine [21] dans 100 ml de chlorure de méthylène on ajoute 11,51 g (68,7

¹⁾ Exécutées au Lab. de micro-analyse du Laboratoire de chimie analytique, Ecole de chimie, Université de Genève, par le Dr. K. EDER, et au Laboratoire d'analyse organique de la maison F. HOFFMANN-LA ROCHE à Bâle, par MM. les Drs. H. WALDMANN et A. DIRSCHERL, que nous remercions.

²⁾ Les évaporations se font toujours sous pression réduite dans un évaporateur rotatif.

³⁾ Cbo = benzyloxycarbonyl.

mmoles) de chlorhydrate de L-valinate de méthyle [22] et 6,96 g (9,63 ml; 68,7 mmoles) de triéthylamine. Dans le mélange refroidi à 2° on introduit 14,17 g (68,7 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) [23]. Après 24 h de repos à 4°, la dicyclohexylurée («urée») résultant de la condensation peptidique est filtrée, puis lavée deux fois au chlorure de méthylène: 12,51 g (81,3% de la théorie). On réunit ce filtrat et la liqueur de lavage et lave le tout deux fois par 340 ml d'eau et une fois par 100 ml de HCl 2N. Après ce dernier lavage, il se forme une nouvelle quantité d'urée qu'on élimine par filtration. Ce filtrat est lavé ensuite par 250 ml d'eau, 200 ml d'hydrogencarbonate de sodium 1M et finalement par 250 ml d'eau, puis séché sur du sulfate de sodium anhydre. Par évaporation des solvants dans le vide on obtient une huile qui cristallise rapidement: 25,5 g. La plus grande partie de ce produit (24,68 g) se dissout dans l'éther. Après filtration et élimination du solvant, on recristallise le résidu dans un mélange éther de pétrole-éther (7:3, vol.): 20,63 g (78%). F. 110–111°; $[\alpha]_D^{20} = -15,5^\circ$ ($c = 4\%$, éthanol absolu).

2.1.2. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-L-valine (1-2)*. Pour saponifier la fonction ester de 1-1, on traite 22,6 g (59,4 mmoles) de 1-1 dissous dans 115 ml de méthanol à 25° avec 90 ml de NaOH 2N aq. (180 mmoles) durant 60 min. Ensuite, la solution est neutralisée par 90 ml de HCl 2N, puis évaporée. Le résidu huileux est dissout dans 100 ml d'acétate d'éthyle. Par addition de 35 ml d'éther de pétrole on provoque la cristallisation de la N-Cbo-L-leucyl-L-valine: 15,73 g (78%); recristallisation à 2° dans 170 ml d'acétate d'éthyle contenant 50 ml d'éther de pétrole: 8,85 g (41%). F. 111–112°; $[\alpha]_D^{22} = -15,7^\circ$ ($c = 4\%$, éthanol absolu), titrage: 99,2%.

$C_{19}H_{28}N_2O_5$ (364,4) Calc. C 62,61 H 7,74 N 7,68% Tr. C 62,56 H 7,60 N 7,85%

2.1.3. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-L-valyl-L- α , γ -glutamate de benzyle (1-3)*. A une solution de 2,20 g (6,06 mmoles) de 1-2 dans 80 ml de chlorure de méthylène on ajoute 2,20 g (6,06 mmoles) de chlorhydrate de α , γ -L-glutamate de benzyle [24] et 0,615 g (0,85 ml; 6,06 mmoles) de triéthylamine. On refroidit ce mélange à 2° et y ajoute 1,246 g (6,06 mmoles) de DCCI. Après 18 h de repos à 2°, on filtre l'urée formée (1,189 g; 87,5%) et lave le filtrat comme indiqué sous 2.1.1. La phase organique est séchée par du sulfate de sodium anhydre, puis évaporée. Le résidu huileux (3,70 g; 90,6%) est repris dans de l'éthanol chaud, à partir duquel 1,96 g (50%) de 1-3 cristallisent; recristallisation à 2° dans 25 ml de chlorure de méthylène + 8 ml d'éther de pétrole: 1,584 g (40%). F. 152–153°; $[\alpha]_D^{20} = -18,8^\circ$ ($c = 2$, acétate d'éthyle); $[\alpha]_D^{20} = -40,1^\circ$ ($c = 1$, méthanol).

$C_{38}H_{47}N_3O_8$ (673,78) Calc. C 67,73 H 7,03 N 6,24% Tr. C 67,78 H 7,11 N 6,35%

2.1.4. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-L-S-benzyl-cystéinate de méthyle (1-4)*. On dissout 10,4 g (40 mmoles) de chlorhydrate de S-benzyl-L-cystéinate de méthyle [25] dans 200 ml de tétrahydrofurane, ajoute 5,55 ml (40 mmoles) de triéthylamine et refroidit à 2°. Le chlorhydrate de triéthylamine cristallisé est éliminé par filtration et lavé au tétrahydrofurane. Le filtrat et la liqueur de lavage réunis sont évaporés sous vide. Le résidu huileux (9,2 g de S-benzyl-L-cystéinate de méthyle) est dissout immédiatement dans 200 ml de tétrahydrofurane contenant 10,6 g (40 mmoles) de N-Cbo-L-leucine. La solution est alors refroidie à 2° puis additionnée de 8,3 g (40 mmoles) de DCCI. Après 18 h de réaction à 4°, l'urée formée est filtrée puis lavée par le solvant. Le résidu d'évaporation du filtrat et des liqueurs de lavage est repris par de l'acétate d'éthyle et lavé comme indiqué sous 2.1.1. Le produit 1-4 est cristallisé dans du méthanol par introduction d'eau; 14 g (74%). F. 118°; $[\alpha]_D^{22} = -33,1^\circ$ ($c = 2$, diméthylformamide).

$C_{25}H_{32}N_2O_5S$ (472,57) Calc. C 63,53 H 6,82 N 5,92% Tr. C 63,88 H 6,98 N 5,85%

2.1.5. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéine (1-5)*. 2,63 g (5,6 mmoles) de 1-4 sont dissous dans 160 ml d'éthanol contenant 5,6 mmoles (0,224 g) de NaOH 1N (5,6 ml). La solution est maintenue 3 $\frac{1}{2}$ h à 25°. On neutralise le milieu par 5,6 ml de HCl 1N et ajoute 240 ml d'eau. Le précipité formé est extrait 3 fois par 100 ml d'acétate d'éthyle. La solution organique est séchée par SO_4Na_2 anhydre. Par évaporation l'acide cristallise; après lavage à l'éther on obtient 2,26 g (82%) de NCbo-L-leu-S-benzyl-L-cystéine (1-5). F. 154–155°; $[\alpha]_D^{22} = -46,2^\circ$ ($c = 1$, méthanol).

2.1.6. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-L-valyl- α , γ -L-glutamate de benzyle (1-6)*. 2,8 g (4,16 mmoles) de 1-3 sont introduits à 2° dans 30 ml d'une solution de HBr à 10% dans l'acide acétique glacial. Après 1 h 15 à cette température, on laisse tomber cette solution goutte à goutte dans une solution d'hydrogencarbonate de sodium. On extrait la suspension neutre qui s'est formée, par 500 ml de chlorure de méthylène. L'extrait est séché par du sulfate de sodium anhydre, puis évaporé. On dissout le résidu huileux dans 200 ml de chlorure de méthylène, on

ajoute 1,9 g de N-Cbo-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéine (4,16 mmoles), refroidit le mélange à 2° et ajoute 1,35 g de DCCI (6,55 mmoles). Après 19 h 45 de repos à 4°, on évapore le solvant et reprend le résidu dans 50 ml d'acétate d'éthyle. L'urée insoluble est filtrée et lavée à l'acétate d'éthyle. Le filtrat, auquel est jointe la liqueur de lavage, est lavé comme indiqué sous 2.1.1., séché au sulfate de sodium anhydre et évaporé. Le résidu huileux, cristallisé dans l'alcool absolu, fournit 1,26 g (30,9%) de N-benzoxycarbonyl-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-L-valyl- α , γ -L-glutaminate de benzyle (1-6). F. 220–224°; $[\alpha]_D^{22} = -31,9^\circ$ ($c = 1$, chloroforme).

$C_{84}H_{89}N_5O_{10}S$ (980,30)	Calc. C 66,17 Tr. „ 65,95	H 7,10 „ 7,47	N 7,15 „ 7,10	S 3,26% „ 3,36%
--------------------------------------	------------------------------	------------------	------------------	--------------------

2.1.7. *Acide L-leucyl-L-cystinyl-L-leucyl-L-valyl-L-glutamique (1-7)*. Dans un ballon à deux cols portant l'un une protection contre l'humidité et l'autre un bouchon de polyéthylène, traversé de façon étanche par un tube de verre, on condense sur 0,392 g de 1-6 50 ml d'ammoniac fraîchement distillé. Un poussoir métallique permet le déplacement, à travers le tube de verre, d'un bouchon de caoutchouc auquel est fixé à l'intérieur un fil de sodium fraîchement préparé. L'extrémité de ce fil peut être ainsi mise au contact de l'ammoniac liquide, à l'abri de l'atmosphère extérieure jusqu'à la fin de la réaction. La solution obtenue est agitée magnétiquement. On introduit le fil de sodium progressivement dans l'ammoniac liquide jusqu'à ce que la solution demeure bleue pendant 1 min, ensuite on fait disparaître la coloration par l'introduction de petits morceaux de chlorure d'ammonium. On laisse l'ammoniac s'évaporer et reprend le résidu blanc par 4,4 ml de HCl 0,5N. On obtient de la sorte une solution d'un pH d'environ 7,5. On y fait barboter de l'oxygène pur durant 15 min, puis abaisse le pH à 4,6 par HCl 1N. La cristallisation de l'acide L-leucyl-L-cystinyl-L-leucyl-L-valyl-L-glutamique (1-7) commence alors immédiatement; après 15 h à 4° on centrifuge les cristaux qui sont lavés 5 fois par 5 ml d'eau puis séchés à 78°/0,07 Torr.: 72,7 mg (26%). Rf (P) = 0,49. $m(iHV, pH 6,5) = 0,58$ (ac. glutamique = 1).

Dans l'hydrolysât chlorhydrique de 0,80 μ mole de 1-7 on trouve: 1,60 μ moles de leucine, 0,86 μ mole de valine, 0,77 μ mole d'ac. glutamique et 0,15 μ mole de cystine, ce qui correspond à une proportion molaire leu, val, glu, 2 cys de 2,00:1,07:0,96 et 0,19⁴). Activité strépogénique: 400 unités par mg; activité WOOLLEY spécifique: 230.

2.2. *Acide L-leucyl-L-cystinyl-L-leucyl-L-alanyl-L-glutamique (2-5) (= II)*

2.2.1. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-L-alaninate de méthyle (2-1)*. A une solution de 20,05 g (75,7 mmoles) de N-Cbo-L-leucine dans 100 ml de chlorure de méthylène on ajoute une solution de 10,63 g (75,7 mmoles) de chlorhydrate de L-alaninate de méthyle dans 50 ml de chlorure de méthylène puis 7,64 g (10,6 ml; 75,7 mmoles) de triéthylamine. On refroidit le mélange à 2° et introduit 15,66 g (75,7 mmoles) de DCCI. Après 16 h de repos à 4°, l'urée formée est filtrée et lavée (13,52 g; 72,6%). Filtrat et liqueurs de lavage réunis sont lavés comme indiqué sous 2.1.1., séchés sur sulfate de sodium anhydre puis évaporés; le résidu (27,29 g) est repris par de l'acétate d'éthyle à l'ébullition; la solution filtrée à chaud est additionnée, après refroidissement, de 400 ml d'éther de pétrole. On obtient 13,98 g (54%) de N-Cbo-L-leucyl-L-alaninate de méthyle (2-1). A partir de la liqueur-mère de cristallisation on obtient encore 6,7 g de 2-1 (25%). F. 93–95°; $[\alpha]_D^{17} = -38,95^\circ$ ($c = 1$, méthanol).

$C_{18}H_{26}N_2O_5$ (350,40)	Calc. C 61,37 Tr. C 61,70	H 7,53 H 7,48	N 8,00% N 7,96%
-------------------------------	------------------------------	------------------	--------------------

2.2.2. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-L-alanine (2-2)*. 13,66 g (39,2 mmoles) de 2-1 dans 200 ml de méthanol sont saponifiés par dissolution dans 60 ml de NaOH 2N (117,7 mmoles) et 2 h de repos à température ordinaire. Ensuite la solution est neutralisée par 60 ml de HCl 2N et débarassée du méthanol par évaporation dans le vide. La suspension aqueuse concentrée qui en résulte est extraite par 100 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée, puis concentrée. Le N-Cbo-L-leucyl-L-alaninate de méthyle (2-2) cristallise en cours de la concentration, 9,25 g (70,2%). F. 150°; $[\alpha]_D^{15} = -24,7^\circ$ ($c = 4$, éthanol).

$C_{17}H_{24}N_2O_5$ (336,39)	Calc. C 60,70 Tr. C 60,96	H 7,19 H 7,17	N 8,33% N 8,42%
-------------------------------	------------------------------	------------------	--------------------

2.2.3. *N-Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-alanyl- α , γ -L-glutamate de benzyle (2-3)*. A une solution de 4,5 g (13,35 mmoles) de 2-2 dans 100 ml de chlorure de méthylène, on ajoute 4,86 g (13,35 mmoles)

⁴) Perte due à la fois à une décomposition au cours de l'hydrolyse et à une insolubilité de la cystine dans la solution aqueuse concentrée de l'hydrolysât, préparée pour l'électrophorèse.

de chlorhydrate de α, γ -L-glutamate de benzyle [26] et 1,35 g (1,87; 13,25 mmoles) de triéthylamine. A ce mélange refroidi à 2°, on ajoute 2,75 g (13,35 mmoles) de DCCI. Après 24 h à 4° on filtre l'urée formée. Le filtrat auquel est jointe la liqueur de lavage, est lavé comme indiqué sous 2.1.1. La phase organique séchée est évaporée. Le résidu (8,70 g) est cristallisé à 4° à partir de 50 ml d'éthanol à 96% (5,28 g), puis recristallisé dans 50 ml de chlorure de méthylène, par ajout d'éther: 3,71 g (43%) de 2-3 pur. F. 146–147°; $[\alpha]_D^{21} = -21,2$ ($c = 2$, acétate d'éthyle).

$C_{38}H_{43}N_3O_8$ (645,76) Calc. C 66,96 H 6,73 N 6,51% Tr. C 66,83 H 6,65 N 6,70%

2.2.4. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-L-alanyl- α, γ -L-glutamate de benzyle (2-4)*. On porte 3,65 g (5,66 mmoles) de 2-3 dans 40,8 ml de HBr à 10% dans de l'acide acétique glacial et laisse reposer 2 h à température ordinaire, puis on laisse tomber, goutte à goutte, la solution dans 500 ml d'hydrogénocarbonate 1M; le pH final est neutre. La solution neutralisée est extraite deux fois par 250 ml de chlorure de méthylène. La phase organique, séchée sur sulfate de sodium anhydre, est concentrée à environ 300 ml. On refroidit ce concentrat à 2° et ajoute 2,63 g (5,66 mmoles) de 1-5 (voir 2.1.5.), puis 1,05 g (5,66 mmoles) de DCCI. On obtient 1,07 g (93%) d'urée par filtration après 19 h de réaction à 4°. Le résidu huileux du filtrat évaporé est repris par 30 ml d'acétate d'éthyle. On lave cette dernière solution comme indiqué sous 2.1.1. Un peu d'urée qui se forme au cours du lavage par HCl 1N est éliminée. (Après le dernier lavage à l'eau, on observe un insoluble (1,5 g) dans la zone d'interphase qui, recristallisé dans de l'éthanol, donne 0,54 g de 1-5 pur.) Le résidu d'évaporation du filtrat est repris par 60 ml d'éthanol chaud, à partir duquel cristallise à 2° une première fraction de 0,79 g de 2-4 (F. 189–198°). La liqueur-mère est évaporée et le résidu huileux (2,13 g) donne dans l'éthanol chaud, par lent abaissement de la température, une fraction cristalline (1,8 g) qui, recristallisée à 2° dans un mélange de 10 ml de chloroforme et 50 ml d'éther de pétrole, donne encore 1,1 g (24%) de N-Cbo-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-L-alanyl- α, γ -L-glutamate de benzyle (2-4). Rdt total 1,89 g (35%). F. 212–214°; $[\alpha]_D^{23} = -23,5^\circ$ ($c = 1$, chloroforme).

$C_{32}H_{65}N_5O_{10}S$ (952,17) Calc. C 65,40 H 6,83 N 7,36% Tr. C 65,15 H 7,11 N 7,54%

2.2.5. *Acide-L-leucyl-L-cystinyl-L-leucyl-L-alanyl-L-glutamique (2-5)*. On porte 259,6 mg (0,273 mmoles) de 2-4 dans l'ammoniac liquide et effectue l'hydrogénolyse des fonctions benzylcarbamate, benzyloxyester et S-benzyle comme indiqué sous 2.1.7. Après l'élimination de l'ammoniac, on reprend le résidu par de l'eau, neutralise aussitôt à pH 7,5, fait passer pendant environ 15 min un courant d'oxygène pur, puis acidifie à pH 3,7 par 20 ml d'acide acétique 1N; le peptide cristallise dans ces conditions. Après 15 h de repos à 2°, la suspension est centrifugée à 15000 t/min. Les cristaux sont lavés 5 fois par 5 ml d'eau, puis séchés au vide poussé: 84 mg (56,3%) de 2-5. Rf (P) = 0,36; $m(iHV, pH 6,5) = 0,61$ (ac. glutamique = 1).

Dans l'hydrolysate chlorhydrique de 0,30 μ mmole de 2-4 on trouve: 0,55 μ mmole de leucine, 0,33 μ mmole d'alanine, 0,30 μ mmole d'ac. glutamique et 0,18 μ mmole de cystine, ce qui correspond à une proportion molaire de leu, ala, glu, 2 cys de 1,83:1,01:1,0:0,54⁴). Activité stréptogénique: 400 unités par mg; activité WOOLLEY spécifique: 220.

2.3. L-Leucyl-L-cystinyl-L-leucyl-L-alanine (3-3) (= III)

2.3.1. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-L-alanine de méthyle (3-1)*. On dissout 6,39 g (18,3 mmoles) de 2-1 (voir 2.2.1.) dans 50 ml de HBr à 20° dans de l'acide acétique glacial (123 mmoles); après 2 h de repos, le solvant est évaporé. Le résidu est débarrassé des acides volatils qu'il contient encore, par plusieurs évaporation successives de ses solutions méthanoliques. L'huile résiduelle finale est triturée longuement dans de l'éther pour la débarrasser du bromure de benzyle. On obtient 5,85 g (18,3 mmoles) de bromhydrate (amorphe) de L-leucyl-L-alanine de méthyle qu'on dissout dans 100 ml de chlorure de méthylène. On ajoute à cette solution successivement 8,38 g (18,3 mmoles) de 1-5 (voir sous 2.1.5), 1,85 g (2,56 ml, 18,3 mmoles) de triéthylamine et, après refroidissement du mélange à 2°, 3,72 g (18,3 mmoles) de DCCI. Après 23 h à 2°, l'urée formée est éliminée par filtration (3,66 g; 89%). Filtrat et liqueurs de lavage réunis sont lavés comme indiqué sous 2.1.1., puis séchés sur sulfate de sodium anhydre et évaporés. Le résidu (16,7 g) est cristallisé à 2° dans de l'éther: 10,6 g de 3-1; après recristallisation dans 100 ml de méthanol par adjonction d'éther à 2°: 2,17 g (27%) de 3-1. F. 184–188°; $[\alpha]_D^{25} = -50,7^\circ$ ($c = 1$, méthanol).

$C_{34}H_{48}N_4O_7$ (624,82) Calc. C 62,17 H 7,36 N 8,53% Tr. C 62,37 H 7,19 N 8,30%

2.3.2. *N-Benzylloxycarbonyl-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-L-alanine (3-2)*. On dissout 1,069 g (1,57 mmoles) de 3-1 dans 50 ml de méthanol, ajoute 2,52 ml (5,01 mmoles) de NaOH 2N et neutralise ce mélange après 2 h 30 par 2,52 ml de HCl 2N. Le solvant est évaporé, et le résidu, repris par de l'acétate d'éthyle pour éliminer le chlorure de sodium formé. La fraction extraite par le solvant organique, obtenue comme huile après évaporation de ce dernier, est reprise par du chlorure de méthylène. Par évaporation lente du solvant, on obtient 1,13 g (97,5%) de 3-2 cristallisé. F. 195–197°; titrage: 99,6%; $[\alpha]_D^{22} = -45,0^\circ$ ($c = 1$, éthanol). – Recristallisé dans l'éther, le produit garde son F. inchangé.

2.3.3. *L-Leucyl-L-cystinyl-L-leucyl-L-alanine (3-3)*. 202,5 mg de 3-2 sont dissous dans 50 ml d'ammoniac distillé. L'hydrogénolyse de ce produit est effectuée comme indiqué sous 2.1.7. Le résidu sec restant après élimination de l'ammoniac est repris par 30 ml de HCl dilué. On neutralise aussitôt cette solution à pH 7,5 pour y faire passer un courant d'oxygène pur durant 15 min. On acidifie ensuite à pH 3,5 par HCl 1N. La suspension résultante est alors évaporée, et le résidu, extrait par 20 ml d'éthanol absolu. La fraction insoluble, 40,6 mg (30%) de 3-3, forme de petites aiguilles. F. 198–199°; $[\alpha]_D^{19} = -51,4^\circ$ ($c = 1$, HCl 0,1N); Rf (P) = 0,54; $m(iHV, pH 2) = 0,78$ (leucine = 1).

Dans l'hydrolysat chlorhydrique de 0,85 μ mole de 3-3, on trouve: leucine 1,68 μ mole, alanine 0,90 μ mole et cystine 0,46 μ mole, ce qui correspond à une proportion molaire de leu, ala, 2 cys, de 1,97:1,05:0,55⁴).

Dans l'hydrolysat de 0,10 μ mole d'un *lot inhibiteur* (v. p. 5) 3-3, obtenu par la leucine-aminopeptidase, on trouve: leucine 0,19 μ mole, alanine 0,10 μ mole ce qui correspond à une proportion molaire de 1,93:1,00.

Le peptide 3-3 préparé à partir non pas de la S-benzyl-L-cystéine, mais de la L-cystine, possède $[\alpha]_D^{16} = -53,3^\circ$ ($c = 1$, méthanol) [26]. Activité stéréogénique (pour les deux préparations): 400 unités par mg; activité WOOLLEY spécifique: 165.

2.4. *L-Leucyl-L-cystinyl-L-leucine (4-3) (= IV)*

2.4.1. *N-Benzylloxycarbonyl-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucinate de méthyle (4-1)*. On suspend 3,19 g (6,96 mmoles) de 1-5 (voir 2.1.5.) dans 150 ml de chlorure de méthylène et ajoute successivement 1,26 g (6,96 mmoles) de chlorhydrate de L-leucinate de méthyle et 0,705 g (0,975 ml, 6,96 mmoles) de triéthylamine. La solution opalescente obtenue est refroidie à 0° et additionnée de 1,43 g (6,96 mmoles) de DCCI. Après 16 h 35 min de repos l'urée qui s'est séparée est éliminée. Filtrat et liquide de lavage réunis sont lavés comme indiqué sous 2.1.1. La phase organique évaporée livre un résidu de 4,044 g. Après deux cristallisations dans du méthanol chaud, on obtient 1,320 g (34%) de N-Cbo-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucinate de méthyle (4-1). La liqueur-mère donne encore 0,342 g de ce tripeptide, si bien que le rendement total de produit recristallisé s'élève à 43%. F. 133–134°; $[\alpha]_D^{23} = -45,7^\circ$ ($c = 1$, méthanol).

$C_{31}H_{43}N_3O_6S$ (587,76) Calc. C 63,35 H 7,34 N 7,18% Tr. C 63,88 H 7,89 N 7,16%

2.4.2. et 2.4.3. *L-Leucyl-L-cystinyl-L-leucine (4-3)*. On dissout 1,27 g (2,29 mmoles) de 4-1 dans 50 ml de méthanol, ajoute 3,45 ml de NaOH 2N (6,87 mmoles) et laisse reposer 2 h 35 à la température ordinaire. La solution est ensuite neutralisée par 3,45 ml de HCl 2N et débarrassée des solvants. Le résidu huileux est extrait par de l'acétate d'éthyle (séparation du chlorure de sodium). L'extrait est évaporé et le nouveau résidu est traité 2 h sous un vide de 0,07 Torr: 1,19 g de N-Cbo-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucine (4-2) (titrage; 95%).

Cet acide 4-2, suspendu dans 50 ml d'ammoniac liquide distillé, est hydrogénolysé comme indiqué sous 2.1.7. Le résidu blanc obtenu après évaporation de l'ammoniac est dissout dans 50 ml d'eau et aussitôt neutralisé (pH environ 7,5). Cette solution est oxygénée comme sous 2.1.7. durant 15 min, puis son pH est abaissé à 3,8 par HCl dilué, ce qui détermine la précipitation de la L-leucyl-L-cystinyl-L-leucine (4-3), qui est isolée par centrifugation après repos de 24 h à 2°. Après 5 lavages à l'eau, le culot est séché: 25 mg (16%). Rf (P) = 0,71; $m(iHV, pH 2) = 0,96$ (leucine = 1).

Dans l'hydrolysat chlorhydrique de 0,26 μ mole de 4-3 on trouve: 0,55 μ mole de leucine, 0,21 μ mole de cystine ce qui correspond à la proportion molaire leucine, cystine 2,10:0,80⁴). Activité stéréogénique: 130 unités par mg; activité WOOLLEY spécifique: 45.

2.5. *L-Leucyl-L-cystinyl-L-alanine (5-3) (= V)*

2.5.1. *N-Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-alaninate de méthyle (5-1)*. A une solution de 8,44 g (18,55 mmoles) de 1-5 (voir 2.1.5.) dans 300 ml de chlorure de méthylène on ajoute

successivement 2,59 g (18,55 mmoles) de chlorhydrate de L-alaninate de méthyle à 1,88 g (2,6 ml; 18,55 mmoles) de triéthylamine et 3,77 g de DCCI. Après 18 h de réaction à 4° on isole 3,54 g (85,3%) d'urée. Le filtrat obtenu est lavé comme indiqué sous 2.1.1. Le résidu de la phase organique (12,3 g) est repris dans 100 ml de méthanol chaud et recristallisé à partir de cette solution à -18° (4,00 g), puis recristallisé dans 60 ml d'acétate d'éthyle; 3,96 g (42%). La liqueur-mère de cristallisation donne encore 0,660 g de 5-1 si bien que le rendement total en produit cristallisé s'élève à 49,5%. F. 146°; $[\alpha]_D^{25} = -45,6^\circ$ ($c = 1$, méthanol).

$C_{28}H_{37}N_3O_6S$ (543,66) Calc. C 61,87 H 6,87 N 7,73% Tr. C 62,10 H 7,03 N 7,69%

2.5.2. et 2.5.3. *L-Leucyl-L-cystinyl-L-alanine* (5-3). On dissout 0,977 g (1,91 mmoles) de 5-1 dans 40 ml de méthanol, ajoute 2,96 ml de NaOH 2N (5,93 mmoles) et laisse reposer 2 h 45 à la temp. ord. La solution est ensuite neutralisée par 2,96 ml de HCl 2N et débarrassée du solvant. Le résidu est extrait par de l'acétate d'éthyle (séparation du chlorure de sodium). L'extrait contient 0,95 g de *N-Cbo-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-alanine* (5-2); titrage: 95%.

La totalité de ce peptide (1,93 mmoles) est dissoute dans 50 ml d'ammoniac liquide distillé, et hydrogénéolysée comme indiqué sous 2.1.7. Après l'évaporation de l'ammoniac, le résidu blanc obtenu est dissous dans 10 ml d'eau et aussitôt neutralisé à pH 7,5. La solution est oxygénée durant 15 min, puis son pH est abaissé à 4,1 par HCl dilué, ce qui détermine la précipitation de la *L-leucyl-L-cystinyl-L-alanine* (5-3). Après 5 lavages à l'eau le culot est séché: 238 mg (39,4%) de 5-3. Rf (P) = 0,40; $m(iHV, pH 2) = 0,88$ (leucine = 1).

Dans l'hydrolysât chlorhydrique de 0,60 μ mole de 5-3 on trouve: leucine 0,63 μ mole, alanine 0,61 μ mole, cystine 0,145 μ mole, S-benzyl-L-cystéine 0,09, ce qui correspond à la proportion molaire de leu, ala, 2 cys et 2 S-benzyl-cys 1,05:1,01:0,23⁴) et 0,14. Activité stéréogénique: 29 unités par mg; activité WOOLLEY spécifique: 9.

2.6. Acide *L-leucyl-L-cystinyl-L-glutamique* (6-2) (= VI)

2.6.1. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-S-benzyl-L-cystéinyl- α,γ -glutamate de benzyle* (6-1). On dissout 3,44 g (8,6 mmoles) de 1-5 (voir 2.1.5.) dans 55 ml de chlorure de méthylène et ajoute successivement 3,63 g (10 mmoles) de chlorhydrate de α,γ -glutamate de benzyle [24] et 1,01 g (1,4 ml; 10 mmoles) de triéthylamine. A cette solution refroidie à 2°, on ajoute 2,06 g (10 mmoles) de DCCI. Après 17 h 55, à 4°, l'urée précipitée est éliminée. Le résidu huileux du filtrat (8,37 g) cristallise spontanément; après recristallisation dans l'éther: 4,50 g (58,6%); une nouvelle cristallisation dans le méthanol fournit 2,94 g (44%) de 6-1 pur. F. 137°; $[\alpha]_D^{25} = -39,5^\circ$ ($c = 1$, méthanol).

La liqueur-mère méthanolique livre encore 0,46 g de produit pur.

$C_{49}H_{49}N_3O_8S$ (767,91) Calc. C 67,19 H 6,43 N 5,46% Tr. C 67,37 H 6,52 N 5,54%

2.6.2. *Acide L-leucyl-L-cystinyl-L-glutamique* (6-2). On porte 250 mg (0,326 mmoles) de 6-1 dans 50 ml d'ammoniac distillé. L'hydrogénéolyse de 6-1 et l'oxydation du produit résultant sont opérées comme indiqué sous 2.1.7. Après l'acidification de la solution oxygénée à pH 3,6 par HCl dilué (le tripeptide reste en solution) la solution est débarrassée des sels minéraux par passage sur un mélange d'amberlite IR 100 et d'amberlite IR 4B. Le résidu sec de l'effluent est lavé deux fois par de l'alcool absolu, puis cristallisé dans un mélange de méthanol-eau: 28,8 mg (24,2%) de 6-2 pur. F. 233° (déc.). Rf (P) = 0,31.

L'hydrolysât chlorhydrique de 0,137 μ mole de 6-2 fournit 0,135 μ mole de leucine, 0,135 μ mole d'ac. glutamique et 0,040 μ mole de cystine ce qui correspond à la proportion molaire leu, glu, 2 cys de 0,98:0,98:0,30⁴). Activité stéréogénique: nulle.

2.7. Acide *L-cystinyl-L-leucyl-L-alanyl-L-glutamique* (7-7) (= VII)

2.7.1. *N-Benzoxycarbonyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-L-alanyl- α,γ -L-glutamate de méthyle* (7-5). – 2.7.1.1. *N-Benzoxycarbonyl-L-alanyl- α,γ -L-glutamate de méthyle* (7-1). On dissout 2,37 g (10 mmoles) de N-Cbo-L-alanine dans 300 ml de chlorure de méthylène et ajoute 2,11 g (10 mmoles) de chlorhydrate de α,γ -glutamate de méthyle, puis successivement 1,01 g (1,39 ml; 10 mmoles) de triéthylamine et 2,06 g (10 mmoles) de DCCI. Après 20 h à 4°, on isole 2,06 g d'urée par filtration. Le résidu sec de la liqueur-mère est repris par de l'acétate d'éthyle pour éliminer le chlorhydrate de triéthylamine. La phase organique est lavée comme indiqué sous 2.1.1. Le résidu d'évaporation est trituré dans de l'éther, puis cristallisé à partir de l'éther; 3,21 g (80%) de 7-1, F. 59-60°.

$C_{18}H_{24}N_2O_7$ (380,37) Calc. C 56,91 H 6,35 N 7,36% Tr. C 56,71 H 6,34 N 7,48%

2.7.1.2. *Chlorhydrate de L-alanyl- α , γ -L-glutamate de méthyle (7-2)*. Réalisée en présence d'acide acétique, l'hydrogénolyse de 7-1 fournit à côté du L-alanyl- α , γ -L-glutamate de méthyle désiré une quantité assez importante de la dioxopipérazine formée par l'action de la fonction ester sur la fonction aminée N-terminale. Par contre en présence de 3 éq. de HCl, cette cyclisation n'a pas lieu. On dissout donc 3,0 g (7,8 mmoles) de 7-1 dans 50 ml de méthanol contenant 23,4 mmoles de HCl et 0,3 g de charbon palladié, et agite dans une atmosphère d'hydrogène jusqu'à cessation de l'absorption. A la fin de l'hydrogénation, la quantité théorique d'hydrogène a pratiquement été consommée. Après élimination du catalyseur et évaporation du solvant, on obtient le chlorhydrate 7-2 dont l'électrophorèse à pH 2 montre l'homogénéité; $m(\text{iHV, pH } 2) = 0,86$ (lysine = 1).

2.7.1.3. *N-Benzoxycarbonyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucinate d'éthyle (7-3)*. On dissout 4,68 g (13,5 mmoles) de N-Cbo-S-benzyl-L-cystéine (F. 92-94°) [27] dans 40 ml de chlorure de méthylène, et ajoute successivement 2,52 g (13,5 mmoles) de chlorhydrate de L-leucinate d'éthyle (F. 132-135°), 1,89 ml de triéthylamine et 2,83 g (13,5 mmoles) de DCCI. Après 16 h 45, à 4°, on élimine l'urée formée, et lave la solution organique comme indiqué sous 2.1.1. On évapore le solvant; l'huile résiduelle est reprise dans de l'éther de pétrole d'où 7-3 cristallise; on le recristallise dans un mélange d'éther et d'éther de pétrole: 5,28 g (81%). F. 67-68°; $[\alpha]_D^{25} = -46,4$ ($c = 2$, éthanol).

$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ (486,60) Calc. C 64,19 H 6,98 N 5,76% Tr. C 63,96 H 7,38 N 6,14%

2.7.1.4. *N-Benzoxycarbonyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucine (7-4)*. On dissout 1,63 g (3,35 mmoles) de 7-3 dans 40 ml de méthanol, et ajoute 16,75 ml de NaOH 1N (16,75 mmoles). Après 1 h 10 on neutralise par 16,7 ml de HCl 1N. L'huile qui s'est séparée est extraite par de l'acétate d'éthyle. Après évaporation, on reprend le résidu huileux par de l'acétone. A -19° une petite quantité d'un produit insoluble se sépare, on l'élimine. L'évaporation fournit 1,47 g (97,6%) d'un résidu toujours huileux.

2.7.1.5. *N-Benzoxycarbonyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-L-alanyl- α , γ -glutamate de méthyle (7-5)*. On dissout 1,18 g (4,2 mmoles) de 7-2, 1,86 g (4,2 mmoles) de 7-4, 0,58 ml (4,2 mmoles) de triéthylamine et 0,86 g (0,42 mmoles) de DCCI dans 64 ml d'acétone. Après 24 h, à 4°, on isole 0,85 g d'urée (90%). La liqueur-mère fournit, après évaporation, un résidu cristallin qu'on recristallise dans de l'éther à 4° (1,89 g; 65%), puis à 4°, dans du méthanol: 1,14 g de 7-5, F. 114-116°.

$\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}$ (686,77) Calc. C 59,49 H 6,61 N 8,16% Tr. C 59,19 H 6,55 N 8,53%

2.7.2. *N-Benzoxycarbonyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-L-alanyl-L-glutamate de benzyle (7-2a)*. – 2.7.2.1. *HBr, L-Leucyl-L-alanyl- α , γ -glutamate de benzyle (7-1a)*. 3,25 g (5 mmoles) de 2-3 (voir 2.2.3.) sont dissous dans 36 ml de HBr à 10% dans de l'acide acétique glacial. Après 75 min de repos à la température ordinaire la solution est évaporée. Le résidu huileux est extrait plusieurs fois par de l'éther. L'insoluble est soumis au vide plusieurs heures: 2,95 g (83%) de 7-1a.

2.7.2.2. *7-2a*. A 2,18 g (3,7 mmoles) de 7-1a dissous dans 50 ml de chlorure de méthylène, on ajoute successivement 1,27 g (3,7 mmoles) de N-Cbo-S-benzyl-L-cystéine (F. 92-94°) [28], 0,52 ml (0,37 g; 3,7 mmoles) de triéthylamine et 0,76 g (3,7 mmoles) de DCCI. Après 16 h 35 min à 4°, on évapore et traite le résidu par 100 ml de tétrahydrofurane. L'insoluble est extrait par de l'eau qui dissout le bromhydrate de $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ (0,59 g, 88%) et laisse une fraction non soluble (2,23 g), composite et particulièrement riche en urée. On l'épuise par du chlorure de méthylène à reflux; la solution méthanolique de l'insoluble (1,72 g) laisse cristalliser une fraction (0,63 g; F. 158-167°) et la liqueur-mère fournit une autre fraction (1,08 g), qui recristallisées ensemble dans le méthanol par lent abaissement de la température du point d'ébullition du solvant à 4°, fournissent 0,67 g de 7-2a; après recristallisation à partir de l'éthanol chaud: 0,56 g (20,2%). F. 175-177°; $[\alpha]_D^{20} = -38,2$ ($c = 1$, méthanol).

$\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}$ (748,79) Calc. C 62,57 H 6,42 N 7,35% Tr. C 61,93 H 6,68 N 7,48%

2.7.3. *Acide L-cystinyl-L-leucyl-L-alanyl-L-glutamique (7-7) à partir de 7-5*. – 2.7.3.1. *Acide N-benzoxycarbonyl-L-cystéinyl-L-leucyl-L-alanyl-L-glutamique (7-6)*. On dissout 1 g (1,4 mmoles) de 7-5 (voir 2.7.1.5.) dans 20 ml d'éthanol contenant 14 mmoles de NaOH. Après 3 h $\frac{1}{2}$ à 25°, la solution est neutralisée par 14,0 ml HCl 1N (14 mmoles) et diluée par 20 ml d'eau. L'acide 7-6 précipite; il est extrait par de l'acétate d'éthyle. Après séchage sur SO_4Na_2 , le solvant est évaporé; résidu 0,9 g (97%) de 7-6.

2.7.3.2. *Acide L-cystinyl-L-leucyl-L-alanyl-L-glutamique (7-7)*. On porte 0,90 g de 7-6 dans 100 ml de NH_3 liquide, fraîchement distillé. L'hydrogénolyse et l'oxydation du produit sont effectuées

comme indiqué sous 2.1.7. Après acidification de la solution à pH 3,6 par HCl dilué, le tétrapeptide précipité est recueilli par centrifugation et lavé 5 fois par de l'eau: 0,31 g (46%) de 7-7. Rf (P) = 0,19; $m(iHV, pH 2) = 0,14$ (leucine = 1).

L'hydrolysât chlorhydrique de 0,35 μ mole de 7-7 fournit 0,36 μ mole de leucine, 0,34 μ mole d'alanine, 0,35 μ mole d'acide glutamique et 0,15 μ mole de cystine, ce qui correspond à la proportion molaire leu, ala, glu, 2 cys de 1,02:0,97:1,00:0,42⁴). Activité strépegénique: 200 unités WOOLLEY par mg; activité WOOLLEY spécifique: 87.

2.7.4. *Acide L-cystinyl-L-leucyl-L-alanyl-L-glutamique (7-7) à partir de 7-2a*. On porte 0,50 g (0,66 mmoles) de 7-2a (voir 2.7.2.) dans 50 ml de NH₃ liquide. L'hydrogénolyse et l'oxydation subséquente du thiol sont conduites comme indiqué sous 2.1.7. Le tétrapeptide insoluble est lavé par de l'eau et séché: 0,12 g (34%) de 7-7. Rf (P) = 0,19; $m(iHV, pH 2) = 0,14$ (leucine = 1).

L'hydrolysât chlorhydrique de 0,35 μ mole de 7-7 fournit⁵) 0,37 μ mole de leucine, 0,36 μ mole d'alanine et 0,32 μ mole d'ac. glutamique, ce qui correspond à la proportion molaire leu, ala, glu de 1,05:1,02:0,91.

2.8. L-Leucyl-L-méthionyl-L-leucyl-L-alanine (8-4) (= VIII)

2.8.1. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-L-méthionine (8-1)*. On dissout 2,97 g (11,2 mmoles) de N-Cbo-L-leucine dans 40 ml de tétrahydrofurane anhydre, contenant 1,42 ml (11,2 mmoles) de (C₂H₅)₃N. On refroidit cette solution à -10° et ajoute 1,06 ml (11,2 mmoles) de chloroformiate d'éthyle. Après 30 min à -10°, l'examen en IR. indique la présence de l'anhydride mixte (bandes à 1815 et 1750 cm⁻¹). On ajoute goutte à goutte une solution de 1,67 g (11,2 mmoles) de méthionine dans 11,6 ml de NaOH 1N (11,6 mmoles). Après 5 h, on neutralise la solution par 11,6 ml de HCl 1N (précipitation) et extrait la suspension 3 fois par son vol. d'acétate d'éthyle. La phase organique, lavée par de l'eau et séchée sur SO₄Na₂, fournit par évaporation 8-1 comme résidu huileux, 3,41 g (74,7%); titrage: 98,5%.

2.8.2. *Bromhydrate de L-leucyl-L-alaninate de méthyle (8-2)*. On dissout 2,30 g (6,5 mmoles) de 2-1 (voir 2.2.1.) dans 18 ml de HBr à 20% dans l'acide acétique glacial. Après 1 h à temp. ord., le solvant est évaporé. Le résidu huileux est longuement extrait par de l'éther jusqu'à l'élimination pratiquement complète du bromure de benzyle. Après traitement au vide de 15 Torr, puis de 0,07 Torr, on obtient 1,78 g (92%) de 8-2.

2.8.3. *N-Benzoxycarbonyl-L-leucyl-L-méthionyl-L-leucyl-L-alaninate de méthyle (8-3)*. On dissout 2,28 g (5,7 mmoles) de 8-1 (voir 2.8.1.) dans 25 ml de chlorure de méthylène et on ajoute 1,7 g (5,7 mmoles) de 8-2 et 0,576 g (0,795 ml; 5,7 mmoles) de triéthylamine. A 2°, on introduit 1,18 g (5,7 mmoles) de DCCI. L'urée formée après 24 h à 4° est filtrée et lavée par du chlorure de méthylène; 1,27 g (90%). Le filtrat plus la liqueur de lavage, évaporés, fournissent un résidu huileux qui est épuisé à l'éther de pétrole, puis dissous dans de l'acétate d'éthyle. Le bromure d'ammonium insoluble dans ce solvant est éliminé; le filtrat est lavé comme indiqué sous 2.1.7. On reprend le résidu de la phase organique, à temp. ord., par de l'acétate d'éthyle, et laisse cristalliser à 4°: 1,93 g de 8-3. La liqueur-mère diluée avec de l'éther fournit encore 0,865 g de produit pur (rendement total 2,79 g; 84,5%). F. 153-154°, $[\alpha]_D^{22} = -46,2^\circ$ ($c = 2$, éthanol).

C₂₉H₄₆N₄O₇S (594,77) Calc. C 58,55 H 7,78 N 9,42% Tr. C 58,00 H 7,57 N 9,65%

2.8.4. *L-leucyl-L-méthionyl-L-leucyl-L-alanine (8-6)*. – 2.8.4.1. *N-Cbo-L-leucyl-L-S-oxo-méthionyl-L-leucyl-L-alaninate d'éthyle (8-4)*. On dissout 1,18 g (2 mmoles) de 8-3 dans 5 ml d'éthanol contenant 0,28 ml de H₂O₂ à 30% (2,2 mmoles de H₂O₂). Après 5 h à 25°, le solvant est éliminé. L'huile est soumise à un vide de 0,05 Torr. Le produit montre en IR. les absorptions caractéristiques du tétrapeptide 8-4 et notamment à 1025 et 1050 cm⁻¹ les bandes du sulfoxyde.

2.8.4.2. *Chlorhydrate de L-Leucyl-L-S-oxo-méthionyl-L-leucyl-L-alanine (8-5)*. On porte 0,61 g (1 mmole) de 8-4 dans 10 ml de HCl 12N. Après 2 h à 40°, on ajoute 10 ml d'eau et évapore le mélange. Le résidu est extrait 2 fois de suite par de l'eau qui est chaque fois évaporée. Ces extraits fournissent 8-5 sous forme d'une huile soluble dans l'eau (à 1,4%), dans l'acétone et le chloroforme; $m(iHV, pH 2) = 0,85$ (alanine = 1). Par hydrolyse, 8-5 fournit de la leucine ($m = 0,76$), de l'alanine ($m = 1$) et de la S-oxo-méthionine ($m = 0,55$).

⁵) Cystine non dosée.

2.8.4.3. *L-Leucyl-L-méthionyl-L-leucyl-L-alanine* (8-6). On dissout 0,115 g (0,23 mmoles) de 8-5 dans 1,25 ml d'eau, ajoute 0,75 ml (2,5 mmoles) d'acide thioglycolique [28] et conserve la solution sous azote à 50° pendant 24 h. Le résidu d'évaporation de la solution est traité deux fois par de l'éther; on dissout la fraction insoluble dans du chloroforme et précipite par de l'éther à 4° un produit huileux. Ce dernier est traité au vide: 0,102 g (93%) de chlorhydrate de 8-6. Ce chlorhydrate est repris par du méthanol, la solution est neutralisée par l'équivalent de $(C_2H_5)_3N$ puis additionnée à 4° d'éther jusqu'au trouble; les cristaux qui se forment sont recristallisés dans du méthanol; 55 mg (53%) de 8-6. F. 190-195° (déc.); m (iHV, pH 2) = 0,79 (alanine = 1).

L'hydrolysats chlorhydrique de 0,25 μ mole de 8-6 fournit 0,53 μ mole de leucine, 0,255 μ mole d'alanine et 0,170 μ mole de méthionine ce qui correspond à la proportion molaire leu, ala, mét de 2,12:1,02:0,68⁶). Activité stéréogénique: nulle.

2.9. *Acide L-leucyl-L-cystéyl-L-leucyl-L-valyl-L-glutamique* (9-1) (= *I ox.*). On utilise un tube à essai en pyrex dont l'orifice à rodage est coudé à angle droit et peut s'assembler avec un second tube à essai rodé également en pyrex pour constituer un système fermé. Dans l'un des tubes, on introduit une solution de 4,75 ml d'acide formique à 98% et 0,25 ml de peroxyde d'hydrogène à 30% (solution 1), et dans l'autre, une solution de 5 mg d'acide L-leucyl-L-cystinyl-L-leucyl-L-valyl-L-glutamique (1-7) dans 0,36 ml d'acide formique à 98% et 0,075 ml de méthanol (solution 2). On plonge l'assemblage des deux tubes 30 min dans un mélange glace-sel à -11°, puis on fait passer la solution 1 dans la solution 2. L'oxydation du reste cystinyle en reste cystéyle commence dès cet instant. On laisse la réaction se poursuivre dans le système fermé maintenu dans un bain à -11° (acétone-glace carbonique) pendant 5 h, verse ensuite le contenu du tube à réaction dans 25 ml d'eau et évapore les solvants. Le résidu pulvérulent est repris dans de l'eau et isolé à nouveau par évaporation: poudre blanche, m (iHV, pH 6,5) = 0,62 (ac. cystéique: m = 1).

Dans l'hydrolysats chlorhydrique de 0,45 μ mole de ce produit 9-1, on trouve 0,88 μ mole de leucine, 0,475 μ mole de valine et 0,45 μ mole d'acide glutamique (l'acide cystéique n'a pas été dosé), ce qui correspond à la proportion moléculaire leu, glu, val de 1,96:1,06:1,0.

L'activité stéréogénique de 9-1 est nulle.

2.10. *Chlorhydrate de l'acide L-leucyl-L-S-benzyl-cystéinyl-L-leucyl-L-valyl-L-glutamique* (10-1) (= *IX*). A 180 mg de 1-6 (voir 2.1.6) dans 3,6 ml d'acide acétique glacial on ajoute 10 ml de HCl 12N. Après 90 min de repos à 38° on dilue la solution par son volume d'eau et évapore les solvants. Le résidu solide, blanc est repris par de l'eau; celle-ci est de nouveau évaporée. On répète l'opération encore une fois et obtient ainsi 140 mg (96%) de 10-1 pulvérulent, m (iHV, pH 6,5) = 0,52 (ac. glutamique: m = 1). IR.: Absence de la bande C=O uréthane à 1690 cm^{-1} ; présence des bandes C=O carboxyliques à 1700-1740 cm^{-1} et chlorhydrate entre 2700 et 2500 cm^{-1} .

L'activité stéréogénique est nulle.

Nous exprimons notre reconnaissance à la maison F. HOFFMANN-LA ROCHE S.A. à Bâle, dont l'appui a permis la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. FREEDMAN & C. FUNK, J. med. Research 7, No. 4, 1 (1922); Proc. Soc. exp. Biol. Med. 19, 198 (1922).
- [2] D. W. WOOLLEY, J. exp. Med. 73, 97 (1941).
- [3] P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, Helv. 44, 1143 (1961).
- [4] R. B. MERRIFIELD & D. W. WOOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 78, 358 (1956).
- [5] P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, Helv. 43, 1795 (1960).
- [6] R. B. MERRIFIELD & D. W. WOOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 78, 4646 (1956).
- [7] P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, Int. J. Vitamin Research 34, 289 (1964).
- [8] R. B. MERRIFIELD & D. W. WOOLLEY, J. Amer. chem. Soc. 80, 6635 (1958).
- [9] H. SPRINCE & D. W. WOOLLEY, J. exp. Med. 80, 213 (1944).
- [10] M. LANDRY & D. M. DICKEN, J. Labor. clin. Med. 27, 1086 (1942).
- [11] H. KIHARA & E. E. SNELL, J. biol. Chemistry 235, 1409 (1960).
- [12] D. W. WOOLLEY, R. B. MERRIFIELD, C. KESSLER & V. DU VIGNEAUD, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 89, 664 (1955).

⁶) Décomposition due à l'hydrolyse.

- [13] R. G. HIRSKY, T. MIZOGUCHI & E. L. SMITH JR., J. org. Chemistry *32*, 97 (1967).
 [14] L. KISFALUDY & M. LÖW, Acta chim. hung. *44*, 3 (1965).
 [15] S. WINSTEIN, C. R. INDEGREEN, H. MARSHALL & L. L. INGRAHAM, J. Amer. chem. Soc. *75*, 147 (1953).
 [16] S. GUTTMANN, «Peptides», Proceedings of the Fifth European Symposium, Oxford Sept. 1962, p. 48, Pergamon Press, Londres 1963.
 [17] L. W. MAPSON & S. M. PARTRIDGE, Nature *164*, 479 (1949).
 [18] Biochem. Prep. *6*, 35 (1958).
 [19] P. BAUDET & E. CHERBULIEZ, Helv. *43*, 904 (1960).
 [20] A. BERGER, M. SELA & E. KATCHALSKI, Analyt. Chemistry *25*, 1554 (1953).
 [21] M. A. NYMAN & R. M. HERBST, J. org. Chemistry *15*, 108 (1950).
 [22] R. A. BOISSONNAS, S. GUTTMANN, P. A. JAQUENOUD & J. P. WALLER, Helv. *39*, 1421 (1956).
 [23] J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. *77*, 1067 (1955).
 [24] H. BURCKHARDT, P. SCHELLENBERG & J. ULLRICH, Chem. Ber. *90*, 700 (1957).
 [25] R. A. BOISSONNAS, S. GUTTMANN, P. A. JAQUENOUD & J. P. WALLER, Helv. *38*, 1941 (1955).
 [26] P. QUITT, F. HOFFMANN-LA ROCHE S.A., Bâle, Communication personnelle.
 [27] S. GOLDSCHMIDT & C. JUTZ, Chem. Ber. *26*, 111 (1953).
 [28] B. ISELIN, Helv. *44*, 61 (1961).

2. Elektronenstruktur und physikalisch-chemische Eigenschaften von Azo-Verbindungen

Teil XIV¹⁾: Die Konformation des Benzalanilins

von E. Haselbach und E. Heilbronner

Laboratorium für organische Chemie Eidg. Technische Hochschule, Zürich

(26. X. 67)

Summary. A re-evaluation of the electronic spectra of benzalaniline (II), 3,3-dimethyl-2-phenyl-indolenine (X), mono-aryl substituted azomethines (XI, XIV, XV) and trimethylindolenine (XII) as well as of their conjugate acids strongly supports the hypothesis of ISMAILSKI & SMIRNOV [14] and of EBARA [15] that benzalaniline exists in a preferred peri-perpendicular conformation. The same is true for N-phenylazomethines. The $n \rightarrow \pi^*$ transition of a 'planar benzalaniline' has been located at 27600 cm^{-1} ($\epsilon \approx 60$).

In der Fig. 1 sind die Elektronenspektren des *trans*-Stilbens (I), des Benzalanilins (II) und des *trans*-Azobenzols (III) abgebildet.

Sieht man vom $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang ab, der den $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen im Elektronenspektrum von III vorgelagert ist, so sind die beiden Spektren von I und III einander sehr ähnlich. Im Gegensatz dazu weist das Spektrum von II eine völlig andere Struktur auf: Dort, wo I und III einen intensiven ersten $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang besitzen (Bande **a**, $30000\text{--}35000 \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon \approx 20000\text{--}30000$), findet man für II nur eine schwache Bande **a'** ($\epsilon \approx 7000$). Hingegen tritt in der Lücke zwischen den Banden **a** und **b** von I und III ($\tilde{\nu} \approx 40000 \text{ cm}^{-1}$) im Spektrum von II ein sehr intensiver Übergang **b'** auf ($\epsilon \approx 20000$). Auch der weitere Verlauf von II ist von jenem der Kurven I und III deutlich verschieden. Analoge Beobachtungen wurden auch für die einander entsprechenden Benzologen [2] und für analog substituierte Derivate von I, II und III gemacht [3].

¹⁾ Teil XIII: HASELBACH & HEILBRONNER [1].