

260. Synthèse de nouveaux analogues de la lysine-vasopressine: Asp(NH₂)⁴-lysine-vasopressine, Ala⁴-lysine-vasopressine, Sér⁴-lysine-vasopressine, Sér⁵-lysine-vasopressine, Val⁷-lysine-vasopressine et (N^ε-For-Lys)⁸-vasopressine

par **R. A. Boissonnas, St. Guttmann, R. L. Huguenin, P.-A. Jaquenoud**
et **Ed. Sandrin**

Dédié au Prof. TH. POSTERNAK, à l'occasion de son soixantième anniversaire

(26 VIII 63)

Parmi les analogues de la lysine-vasopressine décrits jusqu'ici, certains ne possèdent que des activités biologiques négligeables (N^α-acétyl-lysine-vasopressine¹), His²-lysine-vasopressine²), Tyr³-lysine-vasopressine²), Try³-lysine-vasopressine²), Sér³-lysine-vasopressine²), Sar²-lysine-vasopressine³)) alors que d'autres montrent un niveau d'activité appréciable (Phé²-lysine-vasopressine⁴), (O-Me-Tyr)²-lysine-vasopressine⁵), His⁸-vasopressine⁶), Leu⁸-vasopressine⁷), Cit⁸-vasopressine⁸), voire, pour certains types d'action, supérieur à celui de la lysine-vasopressine (α -désamino-lysine-vasopressine⁹), Ile³-lysine-vasopressine¹⁰), Orn⁸-vasopressine¹¹), Arg⁸-vasopressine^{10b})¹²).

Comme aucun de ces analogues ne comporte de modification en position 4 ou 5, nous avons préparé les Asp(NH₂)⁴-lysine-vasopressine, Ala⁴-lysine-vasopressine, Sér⁴-lysine-vasopressine et Sér⁵-lysine-vasopressine. Nous avons dernièrement préparé une série d'analogues similaires dans la série de l'oxytocine¹³)¹⁴).

En outre, afin de compléter nos connaissances sur l'influence de variations en position 8 de la lysine-vasopressine, nous avons préparé la (N^ε-For-Lys)⁸-vasopres-

¹) W. D. CASH & B. L. SMITH, *J. biol. Chemistry* **238**, 994 (1963).

²) ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **43**, 200 (1960).

³) J. MEIENHOFER & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 142 (1961).

⁴) R. A. BOISSONNAS & ST. GUTTMANN, *Helv.* **43**, 190 (1960); J. MEIENHOFER & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 6336 (1960).

⁵) W. SIEDEL, K. STURM & R. GEIGER, *Chem. Ber.* **96**, 1436 (1963); G. VOGEL & J. HERGOTT, *Arzneimittelforschung* **13**, 415 (1963).

⁶) P. KATSOYANNIS & V. DU VIGNEAUD, *Arch. Biochemistry Biophysics* **78**, 555 (1958).

⁷) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, *Helv.* **39**, 1421 (1956); B. BERDE, W. DOEPFNER & H. KONZETT, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* **12**, 209 (1957); P.-G. KATSOYANNIS, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 109 (1957).

⁸) M. BODANSZKY & C. A. BIRKHMIR, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 4943 (1962).

⁹) R. D. KIMBROUGH, JR., W. D. CASH, L. A. BRANDA, W. Y. CHAN & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **238**, 1411 (1963).

¹⁰) a) R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, *Helv.* **43**, 182 (1960); b) R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **45**, 1629 (1962); c) R. D. KIMBROUGH & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **236**, 778 (1961).

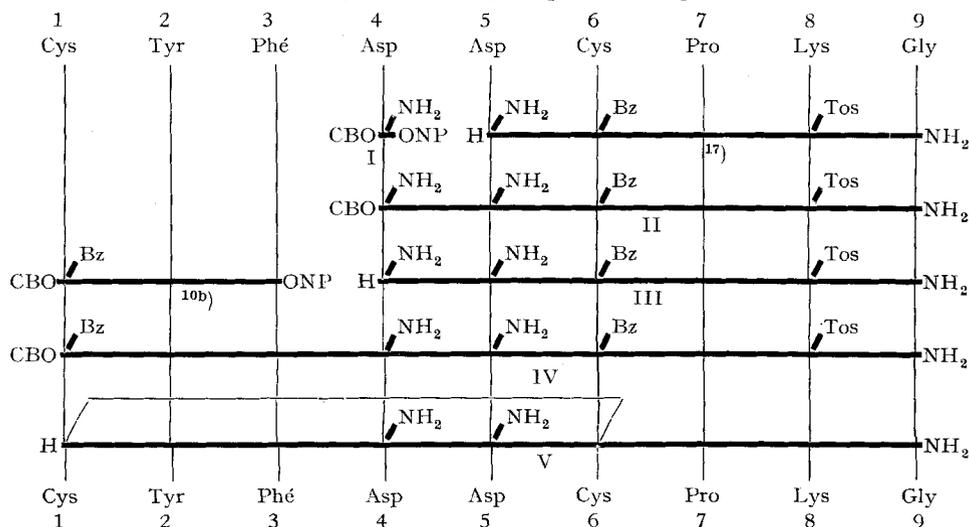
¹¹) R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **46**, 1669 (1963); B. BERDE, R. A. BOISSONNAS, R. L. HUGUENIN & E. STÜRMER, *Experientia* (sous presse).

¹²) V. DU VIGNEAUD et coll., *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 4516 (1957); **80**, 3355 (1958); **82**, 1499 (1960).

¹³) P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **45**, 1601 (1962).

¹⁴) ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **46**, 1626 (1963).

sine, qui ne se distingue de la lysine-vasopressine que par la présence d'un groupe formyle sur la fonction ϵ -amino du reste lysine. Nous avons d'autre part synthétisé la Val⁷-lysine-vasopressine, car aucune modification en position 7 de la lysine-vasopressine n'avait été décrite jusqu'ici.

Schéma 1. Synthèse de l'Asp(NH₂)⁴-lysine-vasopressine

Abréviations: CBO- = carbobenzoxy-; Tos- = tosyl- = *p*-toluènesulfonyl-; Tri- = trityl- = triphénylméthyl-; For- = formyl-; Bz- = benzyl-; -ONP = *p*-nitrophénoxy-; -OCP = trichloro-2,4,5-phénoxy-.

Les méthodes de synthèses que nous avons utilisées sont indiquées dans les schémas 1 à 6; les quatre premiers d'entre eux sont similaires à ceux que nous avons suivis lors de la synthèse des dérivés correspondants de la série de l'oxytocine¹³⁾ 14). Les deux derniers sont semblables à celui que nous avons suivi dernièrement pour la synthèse de l'Orn⁸-vasopressine¹¹⁾.

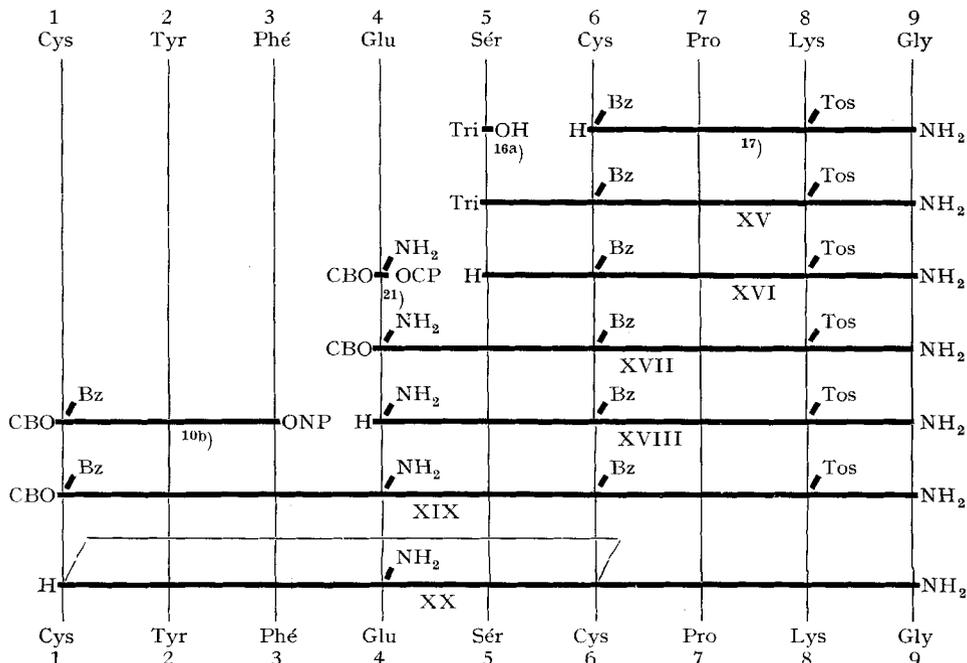
Après purification par contre-courant, les produits finals se sont montrés homogènes à la chromatographie sur papier et à l'électrophorèse à haut voltage sur papier, dans une série de systèmes. Tant la détermination de leur composition élémentaire, que celle de leur contenu en acides aminés après hydrolyse, ont donné les valeurs attendues. Leurs activités biologiques ont été déterminées par les Drs B. BERDE et E. STÜRMEER de notre Département de recherches médico-biologiques (Dir.: Dr. A. CERLETTI) et sont indiquées dans le tableau.

Il ressort de ces valeurs que le remplacement, en position 4 de la lysine-vasopressine, de la glutamine par l'asparagine, c'est-à-dire la suppression d'un maillon -CH₂- de la chaîne latérale, n'affecte que modérément les propriétés oxytociques, tandis qu'il abaisse l'activité pressorique à un cinquième de sa valeur et l'activité

¹⁷⁾ Obtenu par traitement de la solution méthanolique du bromhydrate correspondant¹⁸⁾ à l'Amberlite IRA-410 (cycle OH⁻), suivi d'évaporation au vide à 35°.

¹⁸⁾ M. BODANSZKY, J. MEIENHOFER & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 82, 3195 (1960).

antidiurétique à un dixième de celle-ci¹⁵⁾. Au contraire, l'introduction en cette même position d'un reste alanine ou d'un reste sérine affecte plus profondément les propriétés pressoriques que les propriétés antidiurétiques ou oxytociques de la molécule de lysine-vasopressine.

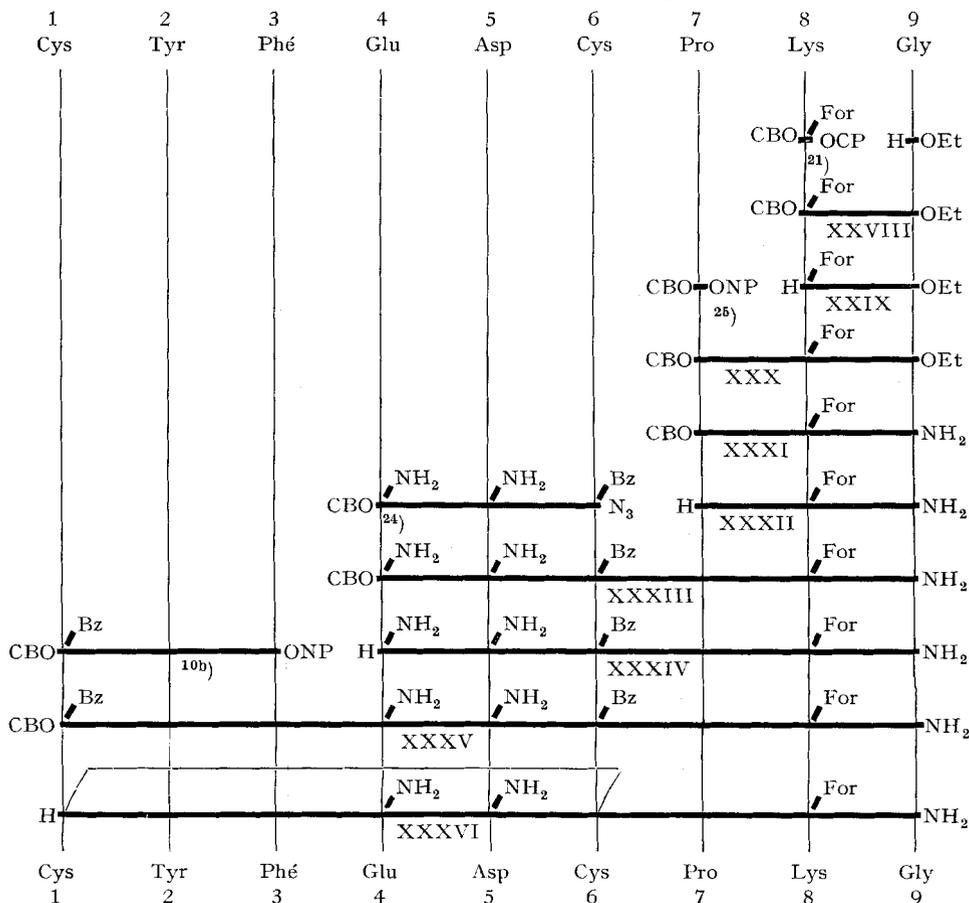
Schéma 4. Synthèse de la Sér⁵-lysine-vasopressine

L'introduction d'un reste sérine en position 5 fait pratiquement disparaître toutes les activités. Nous avons déjà observé cet effet lorsque nous avons introduit ce même reste en position 3²⁾. Il est donc remarquable que ce reste ne produise en position 4 qu'une baisse beaucoup moins marquée des activités. Nous avons fait récemment¹⁴⁾ les mêmes observations dans la série de l'oxtocine, dont l'analogue naturel, l'isotocine¹⁶⁾ comporte un reste sérine en position 4.

¹⁵⁾ Une autre synthèse de l'Asp(NH₂)⁴-lysine-vasopressine a été rapportée récemment par M. ZAORAL, V. PLIŠKA, K. REŽÁBEK & F. ŠORM (Coll. czech. chem. Comm. 28, 746 (1963)). Les activités indiquées par ces auteurs semblant à première vue ne pas toutes correspondre à celles que nous donnons dans ce travail, nous avons envoyé au Dr ZAORAL un échantillon de notre préparation, afin qu'il la confronte avec la sienne. Les deux produits se sont révélés identiques lors de leur comparaison biologique directe. La discordance apparente entre les chiffres publiés par les deux laboratoires est due à des différences entre les techniques biologiques et entre les substances de référence utilisées. Nous remercions vivement le Dr ZAORAL de nous avoir aussitôt communiqué les résultats de cette comparaison directe.

¹⁶⁾ a) ST. GUTTMANN, Helv. 45, 2622 (1962); b) R. ACHER, J. CHAUVET, M. T. CHAUVET & D. CREPY, Biochim. biophys. Acta 58, 624 (1962); c) ST. GUTTMANN, B. BERDE & E. STÜRMER, Experientia 18, 445 (1962); d) A. JÖHL, A. HARTMANN & H. RINK, Biochim. biophys. Acta 69, 193 (1963).

²¹⁾ J. PLESS & R. A. BOISSONNAS, Helv. 46, 1609 (1963).

Schéma 6. Synthèse de la (*N*^ε-For-Lys)⁸-vasopressinePartie expérimentale²⁶⁾

Les F. sont corrigés (précision $\pm 1^\circ$). Les séchages au vide ont été effectués sous 10^{-2} à 10^{-3} Torr (16 h à 60° pour les analyses). Les chromatographies sur papier ont été effectuées selon la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040 lavé». R_{fM} dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:20); R_{fA} dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/eau (35:35:30); R_{fP} dans le mélange n-butanol/acide acétique/eau (70:10:20); R_{f^0} sans scission préalable; R_{f^a} , après scission du groupe CBO- par séjour de 40 min à 20° dans une solution de HBr 4N dans l'acide acétique glacial; R_{f^b} , après scission par séjour de 1 h à 20° dans l'acide trifluoroacétique; R_{f^h} , après hydrogénation en présence d'un catalyseur au palladium.

Les électrophorèses sur papier ont été effectuées dans l'appareil à électrophorèse sous haute tension de WIELAND & PFLEIDERER²⁷⁾: 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

²⁵⁾ M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 81, 5688 (1959).

²⁶⁾ Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr W. SCHÖENIGER).

Tableau des activités biologiques

Formule chimique et désignation	Activités oxytociques en unités internationales par mg de base libre			Activités vasopressives en unités internationales par mg de base libre	
	Contraction de l'utérus isolé du Rat	Baisse de la pression sanguine du Coq	Augmentation de la pression interne de la glande mammaire du Lapin	Augmentation de la pression sanguine du Rat	Inhibition de la diurèse du Rat
H-CyS-Tyr-Phé-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂	5 (± 0,5)	40 (± 5)	60 (± 10)	270 (± 20)	~250
Lysine-vasopressine					
H-CyS-Tyr-Phé-Asp(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂	3 (± 0,4)	22 (± 1)	18 (± 3)	54 (± 12)	24 (± 3)
Asp(NH ₂) ⁴ -lysine-vasopressine (V)					
H-CyS-Tyr-Phé-Ala-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂	0,5 (± 0,05)	2,2 (± 0,1)	~2	1,6 (± 0,3)	30 (± 0,3)
Ala ⁴ -lysine-vasopressine (IX)					
H-CyS-Tyr-Phé-Sér-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂	0,9 (± 0,2)	10 (± 0,7)	7 (± 4)	3,3 (± 0,5)	69 (± 11)
Sér ⁴ -lysine-vasopressine (XIV)					
H-CyS-Tyr-Phé-Glu(NH ₂)-Sér-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂	<0,05	<0,1	0,06 (± 0,01)	<0,1	0,04 (± 0,004)
Sér ⁵ -lysine-vasopressine (XX)					
H-CyS-Tyr-Phé-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Val-Lys-Gly-NH ₂	-	-	-	0,7 (± 0,1)	0,20 (± 0,03)
Val ¹ -lysine-vasopressine (XXVII)					
H-CyS-Tyr-Phé-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-(For)Lys-Gly-NH ₂	13 (± 2)	41 (± 1)	~75	32 (± 2)	10 (± 1)
(N ^ε -For-Lys) ⁸ -vasopressine (XXXVI)					
H-CyS-Tyr-Phé-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂	~20	~30	~60	~3	~30
Leu ⁸ -vasopressine (= oxypressine) ⁷					

Pour la description des méthodes de dosage biologique utilisées cf. 166).

exposants ont la même signification que pour les chromatogrammes. Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et phérogrammes ont été décrits précédemment²⁾.

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.

N-CBO-L-Asparaginate de p-nitrophényle (I). On dissout 26,6 g (0,1 mole) de N-CBO-L-asparagine²⁴⁾²⁸⁾ dans un mélange de 480 ml de tétrahydrofurane et 40 ml d'eau, ajoute 50 g (0,36 mole) de *p*-nitrophénol, refroidit le mélange à -15° , ajoute 25 g (0,12 mole) de dicyclohexylcarbodiimide, agite $3\frac{1}{2}$ h à -15° puis laisse la température remonter à -2° en l'espace d'une nuit. On filtre la dicyclohexylurée (24,6 g), éloigne le solvant au vide, reprend le résidu par 1,5 l d'acétate d'éthyle, lave la solution par NaHCO_3 1N plusieurs fois, puis par eau et enfin par NaCl 30%, sèche sur Na_2SO_4 , filtre et éloigne le solvant au vide. On agite le résidu dans 250 ml d'éther pendant $\frac{1}{2}$ h, à température ordinaire, refroidit à 0° , filtre et lave le produit à l'éther. On recristallise le produit brut (32,5 g) de l'acétate d'éthyle bouillant par adjonction d'éther et obtient ainsi 27,4 g (71%) de N-CBO-L-asparaginate de *p*-nitrophényle de F. 168° env. (déc.). $[\alpha]_D^{22} = -31,8^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1$; diméthylformamide) (Litt. ²⁵⁾: F. 165 – 166° ; $[\alpha]_D^{20} = -31,5^{\circ}$ ($c = 2$; diméthylformamide)).

N-CBO-L-Asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^ε-tosyll-L-lysyl-glycinamide (II). Dans 12 ml de diméthylformamide, on dissout 2,24 g (2,95 mmoles) de L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^ε-tosyll-L-lysyl-glycinamide¹⁷⁾ et 1,20 g (3,10 mmoles) de N-CBO-L-asparaginate de *p*-nitrophényle (I) et laisse réagir 24 h à température ordinaire. L'adjonction de 100 ml d'acétate d'éthyle fait précipiter l'hexapeptide formé. On filtre, lave avec 70 ml d'acétate d'éthyle puis avec deux fois 50 ml d'éthanol et sèche au vide. On obtient ainsi 2,69 g (90%) de N-CBO-L-asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^ε-tosyll-L-lysyl-glycinamide de F. 187 – 188° . $[\alpha]_D^{24} = -39,3^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1$; diméthylformamide); $= -50,0^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1$; acide acétique 95%). $Rf_A^a = 0,6$; $Rf_M^a = 0,6$; $Rf_P^a = 0,4$; $E_{1,9}^a = 0,6$ Try; $E_{5,8}^a = 0,5$ Try (révélation par ninhydrine et chlore).

$\text{C}_{46}\text{H}_{60}\text{O}_{12}\text{N}_{10}\text{S}_2$ (1009,2)	Calc. C 54,8 H 6,0 O 19,0 N 13,9 S 6,4%
	Tr. „ 54,4 „ 6,4 „ 19,4 „ 13,4 „ 6,3%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyll-L-phénylalaninyll-L-asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^ε-tosyll-L-lysyl-glycinamide (IV). On dissout 2,02 g (2,0 mmoles) de N-CBO-L-asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^ε-tosyll-L-lysyl-glycinamide (II) dans 40 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après avoir laissé reposer 2 h à température ordinaire, on évapore sous vide à 35° , triture le résidu avec de l'éther anhydre, filtre le bromhydrate d'hexapeptide et prépare la base libre de ce dernier au moyen d'Amberlite IRA-410. On obtient 1,57 g (1,8 mmole) de L-asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^ε-tosyll-L-lysyl-glycinamide (III), que l'on dissout ainsi que 1,40 g (1,8 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyll-L-phénylalaninate de *p*-nitrophényle^{10b)} dans 6 ml de diméthylformamide. Après avoir laissé 48 h à température ordinaire, on ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle, filtre le nonapeptide précipité et lave sur le filtre avec encore 100 ml d'acétate d'éthyle puis avec 2 fois 50 ml de méthanol. Après séchage sous vide, on suspend les 2,30 g de nonapeptide brut obtenus dans 20 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud et répète encore deux fois cette purification. Après séchage sous vide, on obtient 1,79 g (66%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyll-L-phénylalaninyll-L-asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^ε-tosyll-L-lysyl-glycinamide de F. 208 – 209° . $[\alpha]_D^{24} = -39,8^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1$; diméthylformamide); $= -41,8^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1$; acide acétique 95%). $Rf_A^a = 0,9$; $Rf_M^a = 0,9$; $Rf_P^a = 0,7$; $E_{1,9}^a = 0,6$ Try; $E_{5,8}^a = 1,0$ Try (révélation par ninhydrine et chlore). L'hydrolyse acide du nonapeptide (HCl 6N; 16 h à 110°), donne les acides aminés constituants dans les rapports attendus (cystéine sous forme de S-benzyl cystéine).

$\text{C}_{74}\text{H}_{89}\text{O}_{16}\text{N}_{13}\text{S}_3$ (1512,8)	Calc. C 58,8 H 5,9 O 16,9 N 12,0 S 6,4%
	Tr. „ 58,5 „ 6,2 „ 17,1 „ 11,9 „ 6,1%

Asp(NH₂)⁴-Lys⁸-Vasopressine (V). On dissout 580 mg (0,38 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyll-L-phénylalaninyll-L-asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-

²⁷⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* **67**, 257 (1955).

²⁸⁾ M. BERGMANN & L. ZERVAS, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **65**, 1192 (1932).

N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (IV) dans 150 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et ajoute lentement sous agitation du sodium jusqu'à apparition d'une coloration bleue dans la solution. Après avoir ajouté 100 mg de NH₄Cl, on évapore à sec sous vide, dissout le résidu dans 400 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,8, oxyde en faisant passer un courant d'air dans la solution jusqu'à réaction négative au nitroprussiate et acidifie à pH 4,5 avec de l'acide acétique 4 N. Après évaporation sous vide à 35°, on introduit le résidu dans les cinq premiers tubes d'un appareil automatique de distribution en contre-courant. Après 260 transferts dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoroacétique (120:160:1), on détermine sur des aliquotes²⁹⁾ la courbe de répartition. On réunit le contenu des tubes centraux du sommet principal ($K = 0,37$), évapore sous vide à 35°, reprend le résidu dans l'acide acétique 0,2N et fait passer sur de l'Amberlite IRA-410 (cycle acétate) pour échanger les ions trifluoroacétiques contre des ions acétiques. Le produit ainsi obtenu, qui représente 38% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil, c'est-à-dire 153 mg d'Asp(NH₂)⁴-Lys⁸-vasopressine, est homogène à la chromatographie ($Rf_A^o = 0,4$; $Rf_M^o = 0,3$; $Rf_P^o = 0,1$) et à l'électrophorèse ($E_{1,9}^o = 1,0$ Try; $E_{5,8}^o = 0,8$ His) après révélation par ninhydrine et chlore.

L'hydrolyse acide totale, sous vide (HCl 6 N; 16 h à 110°), donne les acides aminés constituants dans les rapports attendus. Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau.

N-CBO-L-Alanyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (VI). On dissout 2,21 g (5,5 mmoles) de N-CBO-L-alaninate de trichlor-2,4,5-phényle¹⁹⁾ et 3,80 g (5,0 mmoles) de L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide¹⁷⁾ dans 10 ml de diméthylformamide, maintient 16 h à 20°, ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave par suspension dans de l'acétate d'éthyle bouillant, filtre et sèche. On obtient 4,10 g (85%) de N-CBO-L-alanyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 220°. $[\alpha]_D^{25} = -57,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-43,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $Rf_M^a = 0,6$; $Rf_A^a = 0,5$; $Rf_P^a = 0,3$; $E_{1,9}^a = 0,7$ Try; $E_{5,8}^a = 0,5$ His (révélation par ninhydrine et chlore). Sans scission préalable, l'hexapeptide est homogène à la chromatographie sur couche mince.

$C_{45}H_{59}O_{11}N_9S_2$ (966,2)	Calc. C 55,9	H 6,2	O 18,2	N 13,0	S 6,6%
	Tr. „ 55,6	„ 6,3	„ 18,0	„ 12,7	„ 6,7%

L-Alanyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (VII). On dissout 3,86 g (4,0 mmoles) d'amide hexapeptidique VI dans 40 ml d'une solution 4,5N de HBr dans l'acide acétique anhydre, laisse 1 h à 20°, concentre au vide, précipite par adjonction d'éther, filtre, lave à l'éther et sèche. On obtient 4,7 g de bromhydrate que l'on dissout dans 100 ml de méthanol; on fait passer la solution ainsi obtenue à travers 50 ml d'IRA-410 (cycle OH⁻), évapore à sec et triture le résidu dans l'éther. Après séchage, on obtient 3,00 g (89%) de L-alanyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 156–163°. $[\alpha]_D^{25} = -28^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-45^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,3$; acide acétique 95%). $E_{1,9}^o = 0,7$ Try; $E_{5,8}^o = 0,5$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{37}H_{53}O_9N_9S_2 \cdot 1H_2O$ (850,0)	Calc. C 52,3	H 6,5	O 18,8	N 14,8	S 7,6%
	Tr. „ 52,5	„ 6,8	„ 18,8	„ 14,9	„ 7,8%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-alanyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (VIII). On dissout en chauffant légèrement 2,46 g (3,2 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de *p*-nitrophényle^{19b)} et 2,50 g (3,0 mmoles) d'amide hexapeptidique VII dans 10 ml de diméthylformamide, maintient 72 h à 20°, ajoute 40 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave le précipité cristallin par du méthanol bouillant, filtre, lave à l'éther et sèche. On obtient ainsi 2,1 g (72%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-alanyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 212°. $[\alpha] = -37,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-45,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,3$; diméthylformamide). $E_{1,9}^a = 0,6$ Try (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN).

$C_{75}H_{89}O_{15}N_{12}S_3$ (1470,8)	Calc. C 59,6	H 6,1	O 16,3	N 11,4	S 6,5%
	Tr. „ 59,2	„ 6,1	„ 16,3	„ 11,4	„ 6,3%

²⁹⁾ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).

Ala⁴-Lys⁸-Vasopressine (IX). On dissout 1,47 g (1,0 mmole) de nonapeptide protégé VIII dans 750 ml d'ammoniac redistillé sur sodium, ajoute sous agitation du sodium jusqu'à coloration bleue persistante, puis 450 mg de NH₄Cl et évapore à sec sous vide. On dissout le résidu dans 1050 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,8, oxyde en faisant passer un courant d'air dans la solution jusqu'à réaction négative au nitroprussiate, acidifie à pH 4,5 par de l'acide acétique glacial et évapore à sec. On introduit le résidu dans les trois premiers tubes d'un appareil automatique de distribution en contre-courant. Après 200 transferts dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoroacétique (120:160:1), on détermine sur des aliquotes la courbe de répartition²⁹), réunit le contenu des tubes centraux du sommet principal ($K = 0,54$), évapore le *sec*-butanol sous vide et fait passer la solution aqueuse sur de l'Amberlite IRA-410 (cycle acétate) pour échanger les ions trifluoroacétiques contre des ions acétiques. Le produit ainsi obtenu, qui représente 37% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil, c'est-à-dire 368 mg d'Ala⁴-Lys⁸-vasopressine, est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse ($Rf_M^O = 0,2$; $Rf_A^O = 0,8$; $Rf_P^O = 0,1$; $E_{1,9}^O = 1,0$ Try; $E_{5,8}^O = 0,7$ His) après révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN.

L'hydrolyse totale (HCl 6N, 110°, 16 h) donne les acides aminés constituants dans les rapports attendus.

Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau. Pour l'analyse un échantillon est séché 2 h à 100°.

$C_{44}H_{62}O_{11}N_{12}S_2, 2CH_3CO_2H, 1H_2O$ (1137,3)	Calc. C 50,7 H 6,3 O 22,6 N 14,8 S 5,6%
	Tr. „ 50,1 „ 6,6 „ 22,5 „ 14,3 „ 5,9%

N-Trityl-L-séryl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (X). On dissout 5,92 g (10 mmoles) de L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide¹⁷) et 4,10 g (11,8 mmoles) de N-trityl-L-sérine^{16a}) dans un mélange de 30 ml d'acétonitrile et 3 ml de diméthylformamide, refroidit à -10°, ajoute 2,78 g (13 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide, agit 72 h à 20°, filtre, évapore à sec, triture dans l'éther jusqu'à pulvérisation complète, redissout dans 100 ml de méthanol, traite par 25 g de Dowex 50W X-2, évapore à sec, redissout dans 50 ml d'acétate d'éthyle et précipite à l'éther. Après filtration et séchage, on obtient 10,1 g (90%) de N-trityl-L-séryl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 130° (déc.). $[\alpha]_D^{21} = -30,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-25,2^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-34,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol). $Rf_M^b = 0,8$; $Rf_A^b = 0,7$; $Rf_P^b = 0,7$; $E_{1,9}^b = 0,7$; $E_{5,8}^b = 0,5$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{56}H_{67}O_{10}N_9S_2$ (1090,3)	Calc. C 61,6 H 6,2 O 14,7 N 11,6 S 5,8%
	Tr. „ 61,3 „ 6,8 „ 14,8 „ 11,5 „ 5,9%

N-CBO-L-Séryl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XII). On dissout 1,32 g (5,5 mmoles) de N-CBO-L-sérine²⁰) et 3,80 g (5,0 mmoles) de L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide¹⁷) dans un mélange de 20 ml d'acétonitrile et 10 g de *t*-butanol, refroidit à -10°, ajoute 1,03 g (5,0 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide, laisse 100 h à 0°, filtre, lave le précipité à la pyridine, évapore au vide les filtrats réunis, lave le résidu par de l'acétate d'éthyle à ébullition, puis à l'éther et sèche. On obtient 3,30 g (66%) de N-CBO-L-séryl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 138°. $[\alpha]_D^{23} = -39^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $Rf_M^a = 0,6$; $Rf_A^a = 0,6$; $Rf_P^a = 0,3$; $E_{1,9}^a = 0,8$ Try; $E_{5,8}^a = 0,5$ His (révélation par ninhydrine et chlore). Homogène en chromatographie sur couche mince.

$C_{45}H_{59}O_{12}N_9S_2$ (982,2)	Calc. C 55,0 H 6,1 O 19,5 N 12,8 S 6,5%
	Tr. „ 55,2 „ 6,0 „ 19,2 „ 12,7 „ 6,9%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-séryl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XIII). On dissout 2,94 g (3,0 mmoles) d'amide hexapeptidique protégé XII (ou 3,30 g (3,0 mmoles) d'amide hexapeptidique protégé X dans 15 ml d'acide trifluoroacétique contenant 0,25 ml d'eau, refroidit à 0° et fait passer un courant d'HBr anhydre pendant 1 h, concentre à 5 ml, ajoute 100 ml d'éther, filtre, lave le précipité à l'éther, redissout dans 100 ml de méthanol, traite par 50 ml d'IRA-410 (cycle OH⁻), évapore à sec, lave le résidu à l'éther et sèche. On obtient 2,5 g d'amide hexapeptidique XI que l'on dissout dans 7 ml de diméthylformamide,

ajoute 2,46 g (3,2 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-phénylalaninate de *p*-nitro-phényle^{10b}), laisse reposer 72 h à 20°, ajoute 30 ml d'acétate d'éthyle et laisse cristalliser à 0°. On filtre, lave le résidu cristallin par HCl 1N, eau, éther et acétate d'éthyle, puis sèche. On obtient 2,25 g (51%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-séryl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^e-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 170–174°. $Rf_P^a = 0,8$; $E_{1,9}^a = 0,5$ Try (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN). $[\alpha]_D^{22} = -47,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-55,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide).

$C_{73}H_{88}O_{16}N_{12}S_3$	Calc. C 59,0	H 6,0	O 17,2	N 11,3	S 6,5%
(1486,8)	Tr. „ 59,2	„ 6,0	„ 17,6	„ 11,3	„ 6,2%

Sér⁴-Lys⁸-Vasopressine (XIV). On dissout 1,48 g (1,0 mmole) de nonapeptide protégé XIII dans 750 ml d'ammoniac redistillé sur sodium, ajoute sous agitation du sodium jusqu'à coloration bleue persistante, puis 450 mg de NH₄Cl et évapore à sec sous vide. On dissout le résidu dans 1050 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,8, oxyde en faisant passer un courant d'air dans la solution jusqu'à réaction négative au nitroprussiate, acidifie à pH 4,5 par de l'acide acétique glacial et évapore à sec. On introduit le résidu dans les trois premiers tubes d'un appareil automatique de distribution en contre-courant. Après 552 transferts dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoroacétique, on détermine sur des aliquotes la courbe de répartition²⁹), réunit le contenu des tubes centraux du sommet principal ($K = 0,55$), évapore le *sec*-butanol sous vide et fait passer la solution aqueuse sur IRA-410 (cycle acétate) pour échanger les ions trifluoroacétiques contre des ions acétiques. Le produit ainsi obtenu, qui représente 62% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil, c'est-à-dire 630 mg de Sér⁴-Lys⁸-vasopressine, est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse ($Rf_M^o = 0,2$; $Rf_A^o = 0,8$; $Rf_P^o = 0,1$; $E_{1,9}^o = 1,0$ Try; $E_{5,8}^o = 0,7$ His) après révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN. L'hydrolyse totale (HCl 6N, 110°, 16 h) donne les acides aminés constituants dans les rapports attendus.

Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau. Pour l'analyse un échantillon est séché 2 h à 100°.

$C_{44}H_{62}O_{12}N_{12}S_2, 2CH_3CO_2H$	Calc. C 50,8	H 6,2	O 22,5	N 14,8	S 5,7%
(1135,3)	Tr. „ 50,4	„ 6,6	„ 22,1	„ 14,6	„ 6,0%

N-Trityl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^e-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XV). On dissout 5,20 g (15 mmoles) de N-trityl-L-sérine^{16a}) et 9,70 g (15 mmoles) de S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^e-tosyl-L-lysyl-glycinamide¹⁷) dans un mélange de 75 ml d'acétonitrile et 5 ml de diméthylformamide, refroidit à -10° , ajoute 3,10 g (15 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide, agite pendant 16 h, filtre, évapore l'acétonitrile sous pression réduite, reprend le résidu dans de l'acétate d'éthyle, lave successivement par H₂SO₄ 1N, NH₄OH 1N, H₂O, sèche et évapore à sec. On obtient 14,6 g de térapeptide contenant une légère impureté. Après une purification par chromatographie sur une colonne de 200 g de silicagel (solvant d'élution: acétate d'éthyle/méthanol (9:1)) et recristallisation dans l'acétate d'éthyle, on obtient 7,00 g (49%) de N-trityl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^e-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 124° déc. $[\alpha]_D^{23} = -58,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-69,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; méthanol). $Rf_M^b = 0,9$; $Rf_A^b = 0,7$; $Rf_P^b = 0,8$; $E_{1,9}^b = 0,7$; $E_{5,8}^b = 0,4$ His (révélation par ninhydrine et chlore). Homogène en chromatographie sur couche mince.

$C_{32}H_{61}O_8N_7S_2$	Calc. C 63,9	H 6,3	O 13,1	N 10,0	S 6,6%
(976,2)	Tr. „ 63,6	„ 6,5	„ 13,5	„ 10,1	„ 6,9%

L-Séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^e-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XVI). On dissout 6,26 g (6,5 mmoles) d'amide térapeptidique XV dans 50 ml d'acide trifluoroacétique, laisse 1 h à 20°, évapore à sec, lave le résidu à l'éther, redissout dans 100 ml de méthanol, traite par 20 ml d'IRA-410 (cycle OH⁻), évapore à sec, redissout dans 10 ml de méthanol et précipite à l'éther. Après filtration et séchage, on obtient 4,40 g (93%) de L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^e-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 69–72° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -46,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-43,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^o = 0,9$; $E_{1,9}^o = 0,7$ Try; $E_{5,8}^o = 0,4$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

N-CBO-L-Glutaminyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^e-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XVII). On dissout 4,10 g (5,5 mmoles) d'amide pentapeptidique XVI et 2,76 g (6,0 mmoles) de N-CBO-L-

glutamate de trichlor-2,4,5-phényle²¹) dans 10 ml de diméthylformamide, maintient 72 h à 20°, ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle, garde 3 h à 0°, filtre, lave le précipité par l'acétate d'éthyle à ébullition, filtre et sèche. On obtient 4,40 g (79%) de N-CBO-L-glutaminy-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 126° déc. $[\alpha]_D^{25} = -40,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,7$; $Rf_A^a = 0,5$; $Rf_P^a = 0,5$; $E_{1,9}^a = 0,6$ Try (révélation par ninhydrine et chlore). Homogène à la chromatographie sur couche mince.

$C_{46}H_{61}O_{12}N_9S_2$	Calc.	C 55,5	H 6,2	O 19,3	N 12,6	S 6,4%
(996,2)	Tr.	.. 55,5	.. 6,3	.. 18,7	.. 13,0	.. 6,2%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminy-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XIX). On dissout 3,19 g (3,2 mmoles) d'amide hexapeptidique XVII dans 32 ml d'acide trifluoroacétique 98%, fait passer un courant d'HBr gazeux à 0° pendant 90 min, évapore à sec, lave le résidu à l'éther, filtre, dissout dans 150 ml de méthanol, traite par 50 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle OH⁻) et évapore à sec. On obtient ainsi 1,90 g (69%) de L-glutaminy-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 163° (déc.), que l'on dissout immédiatement dans 5 ml de diméthylformamide; on ajoute 1,75 g (2,25 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de *p*-nitrophényle^{10b}), maintient 72 h à 20°, ajoute 40 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave par du méthanol à ébullition, filtre et sèche. On obtient ainsi 1,84 g (55%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminy-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 215°. $[\alpha]_D^{25} = -54,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide); $Rf_G^a = 0,8$; $E_{1,9}^a = 0,3$ Try (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN). Homogène à la chromatographie sur couche mince.

$C_{74}H_{90}O_{16}N_{12}S_3$	Calc.	C 59,2	H 6,0	O 17,1	N 11,2	S 6,4%
(1499,8)	Tr.	.. 59,6	.. 6,3	.. 16,7	.. 11,0	.. 6,3%

Sér⁵-Lys⁸-Vasopressine (XX). On dissout 3,0 g (2,0 mmoles) de nonapeptide protégé XIX dans 1300 ml d'ammoniac redistillé sur sodium, ajoute sous agitation du sodium jusqu'à coloration bleue persistante, puis 500 mg de NH₄Cl et évapore à sec sous vide. On dissout le résidu dans 2100 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,8, oxyde en faisant passer un courant d'air dans la solution jusqu'à réaction négative au nitroprussiate, acidifie à pH 4,5 par de l'acide acétique glacial et évapore à sec. On introduit le résidu dans les trois premiers tubes d'un appareil automatique de distribution en contre-courant. Après 650 transferts dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoroacétique (120:160:1), on détermine sur des aliquotes la courbe de répartition²⁹), réunit le contenu des tubes centraux du sommet principal ($K = 0,39$), évapore le *sec*-butanol sous vide et fait passer la solution aqueuse sur IRA-410 (cycle acétate) pour échanger les ions trifluoroacétiques contre des ions acétiques. Le produit ainsi obtenu, qui représente 37% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil, c'est à-dire 750 mg de Sér⁵-Lys⁸-vasopressine, est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse ($Rf_M^o = 0,3$; $Rf_A^o = 0,6$; $Rf_P^o = 0,1$; $E_{1,9}^o = 1,0$ Try; $E_{8,5}^o = 0,8$ His) après révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN. L'hydrolyse totale (HCl 6N, 110°, 16 h) donne les acides aminés constituants dans les rapports attendus.

Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau. Pour l'analyse un échantillon est séché 2 h à 100°.

$C_{45}H_{64}O_{12}N_{12}S_2 \cdot 1CH_3CO_2H \cdot 1H_2O$	Calc.	C 51,0	H 6,4	O 21,7	N 15,2	S 5,8%
(1107,3)	Tr.	.. 50,8	.. 6,6	.. 21,8	.. 15,0	.. 6,0%

N-CBO-L-Valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinat d'éthyle (XXI). On dissout 18,6 g (50 mmoles) de N-CBO-L-valinate de *p*-nitrophényle²²) et 23,4 g (50 mmoles) de bromhydrate de N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinat d'éthyle²³) dans 100 ml d'acétonitrile, ajoute 7,3 ml (52 mmoles) de triéthylamine et agite pendant 72 h à 20°, ajoute 2000 ml de chloroforme, lave trois fois alternativement par Na₂CO₃ 1N et eau, puis par HCl 1N, sèche et évapore à sec. Après deux recristallisations dans l'éthanol, on obtient 32,1 g (64%) de N-CBO-L-valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinat d'éthyle de F. 186°. $[\alpha]_D^{25} = -6,2^\circ \pm 0,2^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-24,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,95$; $Rf_A^a = 0,9$; $Rf_P^a = 0,8$; $E_{1,9}^a = 1,0$ Try; $E_{5,8}^a = 0,8$ His (révélation par ninhydrine et chlore). Homogène à la chromatographie sur couche mince.

$C_{30}H_{42}O_8N_4S$	Calc.	C 58,2	H 6,8	O 20,7	N 9,1	S 5,2%
(618,7)	Tr.	.. 58,2	.. 7,0	.. 20,7	.. 8,8	.. 5,2%

N-CBO-L-Valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XXII). On dissout 18,5 g (30 mmoles) d'ester tripeptidique XXI dans 1800 ml d'éthanol à ébullition, y fait barboter un courant d'ammoniac en chauffant à reflux pendant 3 h. On abaisse progressivement la température de la solution tout en maintenant le courant d'ammoniac. Lorsque la température de la solution est descendue à 0°, on interrompt le courant d'ammoniac et maintient la solution ainsi obtenue 48 h à 20° dans un récipient bien fermé. On évapore à sec, reprend dans l'éthanol, évapore de nouveau à sec, puis lave le résidu par de l'acétate d'éthyle à ébullition. Après séchage, on obtient 23,8 g (80%) de *N-CBO-L-valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide* de F. 160°. $[\alpha]_D^{25} = -9,7 \pm 0,5$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-18,2 \pm 0,5$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,6$; $Rf_A^a = 0,7$; $Rf_P^a = 0,6$; $E_{5,8}^a = 0,6$ His; $E_{1,9}^a = 1,0$ Try (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{28}H_{39}O_7N_5S$	Calc.	C 57,0	H 6,7	O 19,0	N 12,0	S 5,7%
(589,7)	Tr.	57,0	6,9	19,1	11,9	5,4%

L-Valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XXIII). On dissout 12,4 g (21 mmoles) d'amide tripeptidique XXII dans 100 ml d'une solution 4,5 N d'HBr dans l'acide acétique anhydre, maintient 1 h à 20°, évapore à sec, lave le résidu à l'éther, le dissout dans 300 ml de méthanol, traite par 100 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle OH⁻), évapore à sec, lave le résidu à l'éther jusqu'à obtention d'une poudre, filtre et sèche. On obtient ainsi 7,90 g (83%) de *L-valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide* de F. 100° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -11,0 \pm 0,5$ ($c = 1,2$; diméthylformamide). $E_{1,9}^a = 1,0$ Try; $E_{5,8}^a = 0,6$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

N-CBO-L-Glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XXIV). On dissout 6,12 g (10 mmoles) *N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-azide*²⁴ et 4,56 g (10 mmoles) d'amide tripeptidique XXIII dans 240 ml de diméthylformamide, maintient 12 h à 20° sous lente concentration au vide, évapore à sec, redissout dans 25 ml de diméthylformamide, ajoute 75 ml d'acétone et laisse cristalliser à 0°. On filtre, lave à l'acétone et sèche. On obtient ainsi 5,65 g (55%) de *N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide* de F. 254°. $Rf_M^a = 0,7$; $Rf_A^a = 0,6$; $Rf_P^a = 0,4$; $E_{1,9}^a = 0,6$ Try; $E_{5,8}^a = 0,3$ His (révélation par ninhydrine et chlore). $[\alpha]_D^{25} = -42,5 \pm 0,5$ ($c = 1,0$; diméthylformamide).

$C_{47}H_{64}O_{12}N_{10}S_2$	Calc.	C 55,1	H 6,3	O 18,7	N 13,6	S 6,3%
(1025,2)	Tr.	54,1	6,2	18,6	13,7	6,0%

L-Glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XXV). On dissout 4,15 g (4,0 mmoles) d'amide hexapeptidique XXIV dans 40 ml d'une solution 4,5 N d'HBr dans l'acide acétique anhydre, laisse 1 h à 20°, concentre au vide, précipite à l'éther, filtre et sèche. On obtient 4,0 g de bromhydrate d'hexapeptide pur, que l'on transforme en la base libre en traitant sa solution méthanolique par IRA-410 (cycle OH⁻). Pendant ce traitement une grande partie de l'hexapeptide très peu soluble reste irréversiblement adsorbé sur l'échangeur d'ions. On concentre la solution méthanolique jusqu'à cristallisation du produit. Après filtration, lavage au méthanol et séchage, on obtient 1,43 g (40%) de *L-glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide* de F. 236°. $[\alpha]_D^{25} = -16,5 \pm 0,5$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $E_{1,9}^a = 0,6$ Try; $E_{5,8}^a = 0,3$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{39}H_{58}O_{10}N_{10}S_2,1\frac{1}{2}H_2O$	Calc.	C 51,0	H 6,7	O 20,0	N 15,3	S 7,0%
(918,1)	Tr.	51,0	7,0	20,2	15,6	7,1%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XXVI). On dissout 505 mg (0,65 mmole) de *N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate* de *p*-nitrophényle^{10b} et 580 mg (0,65 mmole) d'amide hexapeptidique XXV dans 3 ml de diméthylformamide, maintient 48 h à 20°, puis ajoute, au mélange pris en masse, 20 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave par du méthanol à ébullition, filtre et sèche. On obtient ainsi 920 mg (92%) de *N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-valyl-N^ε-tosyl-L-lysyl-glycinamide* de F. 268°. $[\alpha]_D^{25} = -35,6 \pm 0,5$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,8$; $Rf_A^a = 0,8$; $Rf_P^a = 0,6$ (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN).

$C_{75}H_{93}O_{16}N_{13}S_3,1H_2O$	Calc.	C 58,2	H 6,2	O 17,6	N 11,8	S 6,2%
(1546,9)	Tr.	58,1	6,4	17,8	11,9	6,2%

Val⁷-Lys⁸-Vasopressine (XXVII). On dissout 0,800 g (0,52 mmole) de nonapeptide protégé XXVI dans 800 ml d'ammoniac redistillé sur sodium, ajoute sous agitation du sodium jusqu'à coloration bleue persistante, puis 200 mg de NH₄Cl et évapore à sec sous vide. On dissout le résidu dans 560 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,6, oxyde en faisant passer un courant d'air dans la solution jusqu'à réaction négative au nitroprussiate, acidifie à pH 4,5 par de l'acide acétique glacial et évapore à sec. On introduit le résidu dans les trois premiers tubes d'un appareil automatique de distribution en contre-courant. Après 230 transferts dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoracétique (120:160:1), on détermine sur des aliquotes la courbe de répartition²⁹⁾, réunit le contenu des tubes centraux du sommet principal ($K = 0,55$), évapore le *sec*-butanol sous vide et fait passer la solution aqueuse sur IRA-410 (cycle acétate) pour échanger les ions trifluoracétiques contre des ions acétiques. Le produit ainsi obtenu, qui représente 48% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil, c'est-à-dire 270 mg de Val⁷-Lys⁸-vasopressine, est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse ($Rf_M^0 = 0,3$; $Rf_A^0 = 0,4$; $Rf_P^0 = 0,1$; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,8$ His) après révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN. L'hydrolyse totale (HCl 6N, 110°, 16 h) donne les acides aminés constituants dans les rapports attendus.

Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau.

N^α-CBO-N^ε-Formyl-L-lysyl-glycinate d'éthyle (XXVIII). On dissout 91,2 g (187 mmoles) de N^α-CBO-N^ε-formyl-L-lysinate de trichlor-2,4,5-phényle³¹⁾ dans 135 ml de diméthylformamide, ajoute 135 ml d'acétate d'éthyle puis 28,9 g (280 mmoles) de glycinate d'éthyle fraîchement distillé. Après un séjour d'une nuit à 20°, la solution, additionnée de 400 ml d'acétate d'éthyle et refroidie à -15°, se prend en une masse cristalline (aiguilles). Après essorage, lavage au moyen de diméthylformamide/acétate d'éthyle 1:4, puis d'acétate d'éthyle seul, le produit est secoué à 3 reprises avec 1 l d'éther de pétrole. On obtient, après séchage au vide poussé à 40°, 59,9 g (81%) de N^α-CBO-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinate d'éthyle de F. 139-140°, homogène en chromatographie sur couche mince de silicagel (système benzène/acétone 2:1). $[\alpha]_D^{25} = -17° \pm 1,5°$ ($c = 1,1$; acide acétique 95%); $-8° \pm 1°$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^h = 0,6$; $Rf_P^h = 0,4$; $Rf_A^h = 0,6$ (substance chromatographiée à l'état de chlorhydrate). $E_{1,9}^h = 1,0$ Glu; $E_{5,8}^h = 1,0$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{19}H_{27}O_6N_3$	Calc. C 58,0	H 6,9	O 24,4	N 10,7%
(393,4)	Tr. ,, 57,7	,, 7,1	,, 24,4	,, 10,5%

Ce dipeptide a été préparé, avec des rendements inférieurs, par les méthodes à l'anhydride mixte et au dicyclohexyl-carbodiimide.

N-CBO-L-Prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinate d'éthyle (XXX). On dissout 32,0 g (81,3 mmoles) d'ester dipeptidique XXVIII dans 600 ml d'éthanol et hydrogène en présence de 5 g de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN³⁰⁾. Au cours des 15 premières minutes de l'hydrogénation (pendant lesquelles la consommation d'hydrogène atteint $\frac{4}{5}$ de la valeur finale, on introduit, à des intervalles de 5 min, 41, 20 et 20 ml de HCl 1N aqueux (81 mmoles). L'hydrogénation terminée on sépare le catalyseur par centrifugation, filtre sur charbon actif, évapore au vide puis sèche au vide poussé à 40°. Le produit obtenu (22,8 g), homogène à l'électrophorèse ($E_{1,0}^0 = 1,0$ Glu; $E_{5,8}^0 = 1,0$ His) est dissous dans 75 ml de diméthylformamide et additionné successivement d'une solution de 28,5 g (77 mmoles) de N-CBO-L-prolinate de *p*-nitrophényle²⁵⁾ dans 75 ml de diméthylformamide, puis, de 10,8 ml (77 mmoles) de triéthylamine. Après agitation d'une nuit à 20°, la solution est secouée avec 140 ml d'eau et de 140 ml de benzène, le mélange est refroidi à +5° environ, et le précipité jaune formé est séparé par filtration centrifuge, secoué à nouveau dans 140 ml d'eau et 140 ml de benzène, séparé comme indiqué précédemment puis trituré soigneusement dans l'éther pour éliminer le *p*-nitrophénol. Après recristallisation dans 100 ml d'acétonitrile, on obtient 24,5 g (65%) de N-CBO-L-prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinate d'éthyle sous forme d'aiguilles incolores de F. 138-140°. $[\alpha]_D^{25} = -39,5° \pm 1°$ ($c = 1$; diméthylformamide); $-60° \pm 2°$ ($c = 1$; éthanol à 96%). $Rf_M^a = 0,55$; $Rf_P^a = 0,5$; $Rf_A^a = 0,6$; $E_{1,9}^a = 1,1$ Try; $E_{5,8}^a = 0,9$ His (révélation par isatine, ninhydrine et chlore).

$C_{24}H_{34}O_7N_4$	Calc. C 58,8	H 7,0	O 22,8	N 11,4%
(490,6)	Tr. ,, 58,7	,, 7,2	,, 23,0	,, 11,5%

³⁰⁾ R. KUHN & J. HAAS, Angew. Chem. 67, 785 (1955).

N-CBO-L-Prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinamide (XXXI). On dissout 20,0 g (40,8 mmoles) d'ester tripeptidique XXX dans 400 ml d'éthanol absolu et sature la solution par NH₃ à 0°. Après un séjour de 2 jours à 20° en récipient fermé, la solution est évaporée au vide à 20° et le résidu d'évaporation est recristallisé deux fois dans l'acétonitrile. On obtient ainsi 11,9 g (63%) de *N-CBO-L-prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinamide* de F. 155–157°, homogène en chromatographie sur couche mince de silicagel ou d'alumine (système chloroforme/méthanol 9:1; révélation par iode). $[\alpha]_D^{22} = -64,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,2$; acide acétique 95%); $-38,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^O = 0,8$; $Rf_A^O = 0,8$ (révélation par chlore).

C ₂₂ H ₃₁ O ₆ N ₅	Calc.	C 57,3	H 6,8	O 20,8	N 15,2%
(461,5)	Tr.	„ 57,5	„ 6,8	„ 21,5	„ 15,2%

L-Prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinamide (XXXII). – a) On hydrogène 4,6 g (10 mmoles) d'amide tripeptidique protégé XXXI, dissous dans 100 ml de méthanol, en présence de 1 g de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN³⁰). Après 3 h, l'absorption d'hydrogène ayant cessé, on sépare le catalyseur par centrifugation, évapore la liqueur méthanolique au vide et sèche le résidu d'évaporation au vide poussé à 30°. On obtient 3,3 g (100%) de *L-prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinamide*. $Rf_M^O = 0,25$; $Rf_P^O = 0,20$; $Rf_A^O = 0,35$ (produit chromatographié à l'état de bromhydrate); $E_{1,9}^O = 1,1$ Try; $E_{5,8}^O = 0,9$ His (révélation par isatine, chlore et ninhydrine).

b) On dissout 9,0 g (19,5 mmoles) d'amide tripeptidique protégé XXXI dans 20 ml d'acide acétique anhydre, ajoute 40 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à 20°, puis introduit la solution dans 10 volumes d'éther sous vive agitation. Après filtration, lavage à l'éther et séchage au vide à 20°, le précipité est ajouté à une suspension de 50 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle OH⁻) dans 60 ml de méthanol et le mélange est introduit sur une colonne contenant encore 50 ml de la même résine. On lave au méthanol, évapore l'éluat au vide à 30°, pulvérise dans l'éther la masse vitreuse obtenue et sèche au vide poussé à 30°. On obtient ainsi 6,3 g (99%) de produit présentant les caractéristiques indiquées sous a).

N-CBO-L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinamide (XXXIII). Dans 100 ml de diméthylformamide, on dissout 5,7 g (17,6 mmoles) d'amide tripeptidique XXXII et 9,3 g (15,2 mmoles) de *N-CBO-L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-azide*²⁴) et agite 1 nuit à 20° sous lente concentration au vide. La suspension gélatineuse obtenue est additionnée de 500 ml d'acétone. Le précipité, séparé par filtration puis lavé au moyen du mélange diméthylformamide/acétone 1:5 puis d'acétone seule, est séché au vide poussé à 40°. On obtient ainsi 6,39 g (47%) de *N-CBO-L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinamide* de F. 202–206°. $[\alpha]_D^{22} = -61^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,3$; acide acétique 95%); $-41,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,3$; diméthylformamide). $Rf_M^A = 0,7$; $Rf_P^A = 0,65$; $Rf_A^A = 0,65$ (révélation par ninhydrine et chlore).

C ₄₁ H ₅₆ O ₁₁ N ₁₀ S	Calc.	C 54,9	H 6,3	O 19,6	N 15,6	S 3,6%
(897,0)	Tr.	„ 54,4	„ 6,6	„ 19,3	„ 15,7	„ 3,7%

L-Glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinamide (XXXIV). A une solution de 5,48 g (6,11 mmoles) d'hexapeptide protégé XXXIII dans 10 ml d'acide acétique anhydre, on ajoute 40 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre et laisse reposer 1 h à 20°. La solution est ensuite introduite dans 1 l d'éther sous vive agitation et le précipité formé est essoré, lavé à l'éther, séché au vide à 30°, puis dissous dans 30 ml de méthanol, contenant en suspension 25 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle OH⁻). Cette suspension est introduite sur une colonne contenant encore 25 ml de la même résine; on lave au méthanol, évapore le filtrat au vide et sèche au vide poussé à 30°. On obtient ainsi 4,27 g (92%) de *L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinamide*. $Rf_M^O = 0,25$; $Rf_P^O = 0,15$; $Rf_A^O = 0,4$; $E_{1,9}^O = 0,7$ Try; $E_{5,8}^O = 0,55$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéiny-L-tyrosyl-L-phénylalaniny-L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinamide (XXXV). On dissout 361 mg (0,47 mmole) d'hexapeptide XXXIV dans 0,5 ml de diméthylformamide à 40° et ajoute après refroidissement à 20° une solution de 367 mg (0,47 mmole) de *N-CBO-S-benzyl-L-cystéiny-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de p-nitrophényle*^{10b}). Après séjour de 20 h à 20°, le mélange de réaction pris en masse

est trituré dans 6 ml d'acétone, le précipité gélatineux est séparé, lavé avec le mélange diméthylformamide/acétone 1:4 puis à l'acétone et séché au vide. On purifie le produit en le suspendant à 3 reprises dans 5 ml de méthanol bouillant, et en filtrant chaque fois à chaud. Après séchage au vide poussé à 60°, on obtient 506 mg (76%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phényl-alanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^ε-formyl-L-lysyl-glycinamide de F. 227° (déc.). $[\alpha]_D^{22} = -43^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,4$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,75$; $Rf_A^a = 0,75$; $E_{1,9}^a = 0,5$ Try; $E_{5,8}^a = 0,3$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{69}H_{85}O_{15}N_{13}S_2$	Calc. C 59,2	H 6,1	O 17,1	N 13,0	S 4,6%
(1400,7)	Tr. ,, 58,9	,, 6,2	,, 16,8	,, 12,9	,, 4,5%

(N^ε-For-Lys)⁸-vasopressine (XXXVI). On dissout 738 mg (0,527 mmole) de nonapeptide protégé XXXV dans environ 150 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute lentement du sodium jusqu'à persistance de la coloration bleue. Après adjonction de 0,50 g de NH₄Cl, on évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 500 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 7 et ajoute du ferrocyanure de potassium en solution aqueuse 0,05N jusqu'à coloration jaune pâle (employé 5,0 ml, soit 24% de la théorie). On acidifie à pH 4,5, adsorbe le peptide sur 65 ml d'Amberlite IRC-50 (XE-64) (cycle acide) et, après lavage par 200 ml d'acide acétique à 1% pour éliminer les sels présents³¹), élue la substance par 300 ml d'acide acétique à 50%. On évapore au vide à 30°, reprend dans 20 ml d'eau, passe la solution sur 15 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle acétate) pour éliminer les ions ferrocyanure résiduels, lave la résine par 70 ml d'acide acétique 0,01N, évapore au vide à 30° et soumet le résidu d'évaporation à une distribution en contre-courant dans le système *sec*-butanol/eau/acide acétique 2500:3500:3. Après 367 transferts, on détermine sur des aliquotes la courbe de répartition^{2b}). On réunit le contenu des tubes centraux du sommet principal ($K = 0,23$), évapore au vide le *sec*-butanol et lyophilise la solution aqueuse. Le résidu (142 mg) contient 19,3 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 115 mg (0,106 mmole) de base libre de (N^ε-formyl-Lys)⁸-vasopressine. Le produit est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse sur papier. $Rf_M^o = 0,5$; $Rf_P^o = 0,2$; $Rf_A^o = 0,5$; $E_{1,9}^o = 0,5$ Try; $E_{5,8}^o = 0,3$ His (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN). Un témoin d'arginine-vasopressine a donné les valeurs: $Rf_M^o = 0,3$; $Rf_P^o = 0,15$; $Rf_A^o = 0,45$; $E_{1,9}^o = 0,9$ Try; $E_{5,8}^o = 0,6$ His. L'hydrolyse totale (HCl 6N, 16 h à 115° en l'absence d'air) donne les acides aminés dans les rapports attendus. Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau. Pour l'analyse, un échantillon est séché au vide poussé, 16 h à 100°.

$C_{47}H_{65}O_{13}N_{13}S_2 \cdot \frac{1}{2}CH_3CO_2H$	Calc. C 51,7	H 6,1	O 20,1	N 16,3	S 5,8%
(1114,3)	Tr. ,, 51,8	,, 6,5	,, 19,9	,, 16,3	,, 5,4%

SUMMARY

Six new analogues of Lysine-vasopressin have been synthesized: Asp(NH₂)⁴-lysine-vasopressin, Ala⁴-lysine-vasopressin, Ser⁴-lysine-vasopressin, Ser⁵-lysine-vasopressin, Val⁷-lysine-vasopressin and (N^ε-For-Lys)⁸-vasopressin. All were prepared by the 3 + 6 scheme. The hexapeptides necessary for the synthesis of the former four were prepared by recurrent synthesis, those utilized for the synthesis of the last two, by condensation of two tripeptides. The analogues substituted in position 4 were found to still possess a significant level of activity, whereas those substituted in positions 5 or 7 were almost inactive. Masking of the ε-amino group of lysine in position 8 caused no decrease in the oxytocic activities, but affected, to a different degree, the pressor and the antidiuretic activities.

Laboratoires de chimie pharmaceutique,
SANDOZ SA., Bâle

³¹) H. B. F. DIXON, Biochim. biophys. Acta 34, 251 (1959).