

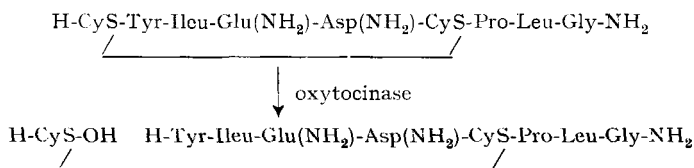
27. Synthèse de la (N-méthyl-Tyr)²-oxytocine

par R. L. Huguenin et R. A. Boissonnas

(7 XII 60)

La concentration sanguine en enzymes capables d'inactiver l'oxytocine (oxytocinases) augmente fortement vers la fin de la grossesse de la femme et ne reprend son niveau normal qu'après l'accouchement¹⁾.

TUPPY & NESVADBA²⁾ ont montré que cette inactivation est due à une scission peptidolytique de l'oxytocine entre les positions 1 et 2 de la molécule:



Une scission de ce type rappelle celle due à la leucine-aminopeptidase³⁾, enzyme qui attaque les chaînes peptidiques à partir de leur extrémité amino-terminale, mais qui est sans action sur les liaisons peptidiques terminales auxquelles participe le groupe amino secondaire d'un acide aminé comme la proline ou l'hydroxyproline³⁾. Cette vue est également supportée par le fait que le L-cystinyl-bis-(L-prolyl-L-leucyl-glycinamide) est un fort inhibiteur compétitif de l'attaque de l'oxytocine par l'oxytocinase sanguine⁴⁾.

Nous nous sommes donc demandé si l'introduction d'un acide aminé portant un groupe amino secondaire, en position 2 de la molécule d'oxytocine, pourrait empêcher l'attaque par l'oxytocinase. Afin d'obtenir un analogue qui soit aussi proche que possible de l'oxytocine elle-même, nous nous sommes décidés à synthétiser la (N-méthyl-Tyr)²-oxytocine (XXIX), qui ne se distingue de l'oxytocine (XXX) que par la présence d'un groupe méthyle sur l'azote de la liaison peptidique 1-2.

La synthèse de peptides contenant de la N-méthyltyrosine s'est heurtée à certaines difficultés inattendues. C'est pourquoi nous avons étudié la préparation des produits intermédiaires et finals en utilisant plusieurs voies de synthèse (voir schéma).

La N-méthyl-L-tyrosine est un acide aminé que l'on rencontre sous forme libre dans la nature⁵⁻⁸⁾. Nous avons modifié sa préparation synthétique par rapport aux

¹⁾ K. FEKETE, *Endokrinol.* 7, 1 (1930); 10, 16 (1932); E. WERLE et coll., *Biochem. Z.* 309, 270 (1941); *Arch. Gynäkol.* 171, 286 (1941); 177, 211 (1950); 187, 106 (1955); E. W. PAGE, *Amer. J. Obstetr. Gynecol.* 52, 1014 (1946); *Science* 105, 292 (1947); K. SEMM, *Klin. Wschr.* 33, 817 (1955); *Naturwiss.* 44, 424 (1957).

²⁾ H. TUPPY & H. NESVADBA, *Mh. Chem.* 88, 977 (1957).

³⁾ E. L. SMITH et coll., *J. biol. Chemistry* 199, 801 (1952); 212, 255, 271 (1955).

⁴⁾ Z. BERANKOVA, I. RYCHLIK & F. ŠORM, *Experientia* 15, 298 (1959); *Collect. czechoslov. chem. Commun.* 25, 2575 (1960).

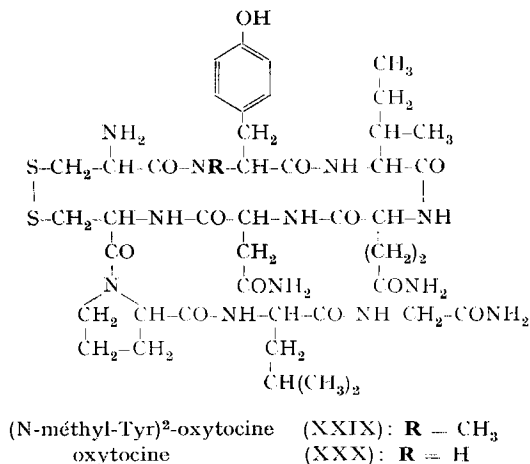
⁵⁾ O. HILLER-BOMBIEN, *Arch. Pharmaz.* 230, 513 (1892).

⁶⁾ H. BLAU, *Z. physiol. Chem.* 58, 154 (1908).

⁷⁾ G. GOLDSCHMIDT, *Mh. Chem.* 33, 1379 (1912).

⁸⁾ E. WINTERSTEINER, *Z. physiol. Chem.* 105, 23 (1919).

méthodes de FISCHER⁹⁾ et de BERGEL¹⁰⁾. Des différentes méthodes que nous avons étudiées, la plus simple et la plus satisfaisante consiste à hydrogéner une solution méthanolique de tyrosinate de méthyle en présence d'un léger excès de formaldéhyde et à saponifier directement le mélange de N-méthyl-L-tyrosinate de méthyle et de N,N-diméthyl-L-tyrosinate de méthyle obtenu. Après neutralisation, la N,N-diméthyl-L-tyrosine reste en solution tandis que la N-méthyl-L-tyrosine cristallise sous forme pure.



A partir de la N-méthyl-L-tyrosine, nous avons préparé les nouveaux dérivés suivants: N-méthyl-L-tyrosinate de t-butyle (V)¹¹⁾, O,N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosine (VI), O,N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle (VII), O-tosyl-N-méthyl-L-tyrosine (VIII)¹²⁾, O-tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosine (IX), O-tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle (X).

Nous avons d'abord tenté de synthétiser la (N-méthyl-Tyr)²-oxytocine en utilisant la méthode récurrente employée récemment par BODANSZKY & DU VIGNEAUD¹³⁾.

Par condensation du O,N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle (VII) avec le L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide¹³⁾, nous avons obtenu le O,N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XXIV) qui, par scission des groupes CBO au moyen d'une solution de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, a fourni le N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XXV). Par réaction avec le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de p-nitrophényle¹³⁾, cet octapeptide a donné un produit donnant une analyse élémentaire correspondant à celle du nonapeptide désiré, mais ne montrant pas le spectre UV. caractéristique des peptides de la tyrosine possédant un hydroxyle phénolique non substitué. Après scission des groupes pro-

⁹⁾ E. FISCHER & W. LIPSCHITZ, Ber. deutsch. chem. Ges. 48, 360 (1915).

¹⁰⁾ F. BERGEL, G. E. LEWIS, S. F. D. ORR & J. BUTLER, J. chem. Soc. 1959, 1431.

¹¹⁾ Préparé d'après la méthode de R. W. ROESKE (Chemistry & Ind. 1959, 1121) pour l'obtention d'esters t-butyliques d'acides aminés.

¹²⁾ En utilisant un procédé analogue à celui employé par B. G. OVERELL & V. PETROW (J. chem. Soc. 1955, 232) pour la préparation de la O-CBO-L-tyrosine.

¹³⁾ M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 81, 5688 (1959).

tecteurs par le sodium dans l'ammoniac liquide, suivie d'oxydation à l'air et de purification par contre-courant, nous avons obtenu un peptide ayant un coefficient de répartition très différent de celui de l'oxytocine et ne donnant pas, après hydrolyse acide, la composition attendue en acides aminés. Nous en avons conclu que la faible réactivité¹⁴⁾ du groupe amino secondaire de la N-méthyl-L-tyrosine terminale de l'octapeptide XXV avait favorisé une réaction secondaire sur l'hydroxyle phénolique, et nous avons décidé de protéger cet hydroxyle au moment de la condensation avec le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de p-nitrophényle. Nous avons choisi pour cette protection le groupe tosylo (= p-toluènesulfonylo), car nous avons vu que le groupe O-tosylo est stable à l'action du gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, tout en étant facilement scindé par le sodium dans l'ammoniac liquide.

Par condensation du O-tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle (X) avec le L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolylo-L-leucylglycinamide¹⁵⁾, nous avons obtenu le O-tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolylo-L-leucylglycinamide (XXVI) qui, par scission du groupe CBO au moyen du gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, a fourni le O-tosyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginylo-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolylo-L-leucylglycinamide (XXVII). Mis en présence de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de p-nitrophényle¹⁵⁾ pendant 16 h à 35°, cet octapeptide n'a subi aucune condensation appréciable et a pu être récupéré inchangé pour la plus grande partie.

Nous avons donc décidé de tenter la synthèse de la (N-méthyl-Tyr)²-oxytocine en utilisant le schéma de synthèse 3 + 6 que nous avons employé précédemment pour la synthèse de nombreux analogues de l'oxytocine¹⁵⁾.

La synthèse du tripeptide protégé nécessaire pour la réalisation de ce type de schéma a été étudiée selon plusieurs voies. La condensation de la O,N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosine (VI) avec le L-isoleucinate de méthyle¹⁶⁾ a donné le O,N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (XIII) qui, par traitement au gaz bromhydrique dans l'acide acétique glacial, a livré le bromhydrate de N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (XIV). Par condensation de ce dernier avec la N-CBO-S-benzyl-L-cystéine¹⁷⁾, nous avons obtenu le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (XXIa). Les essais de conversion de cet ester tripeptidique en hydrazide correspondant ayant échoué, nous l'avons saponifié en N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucine (XXIIIa).

Afin d'éviter cette saponification, la synthèse de ce tripeptide a également été effectuée selon une autre voie. La condensation de la O,N-di-CBO-N-méthyl-L-

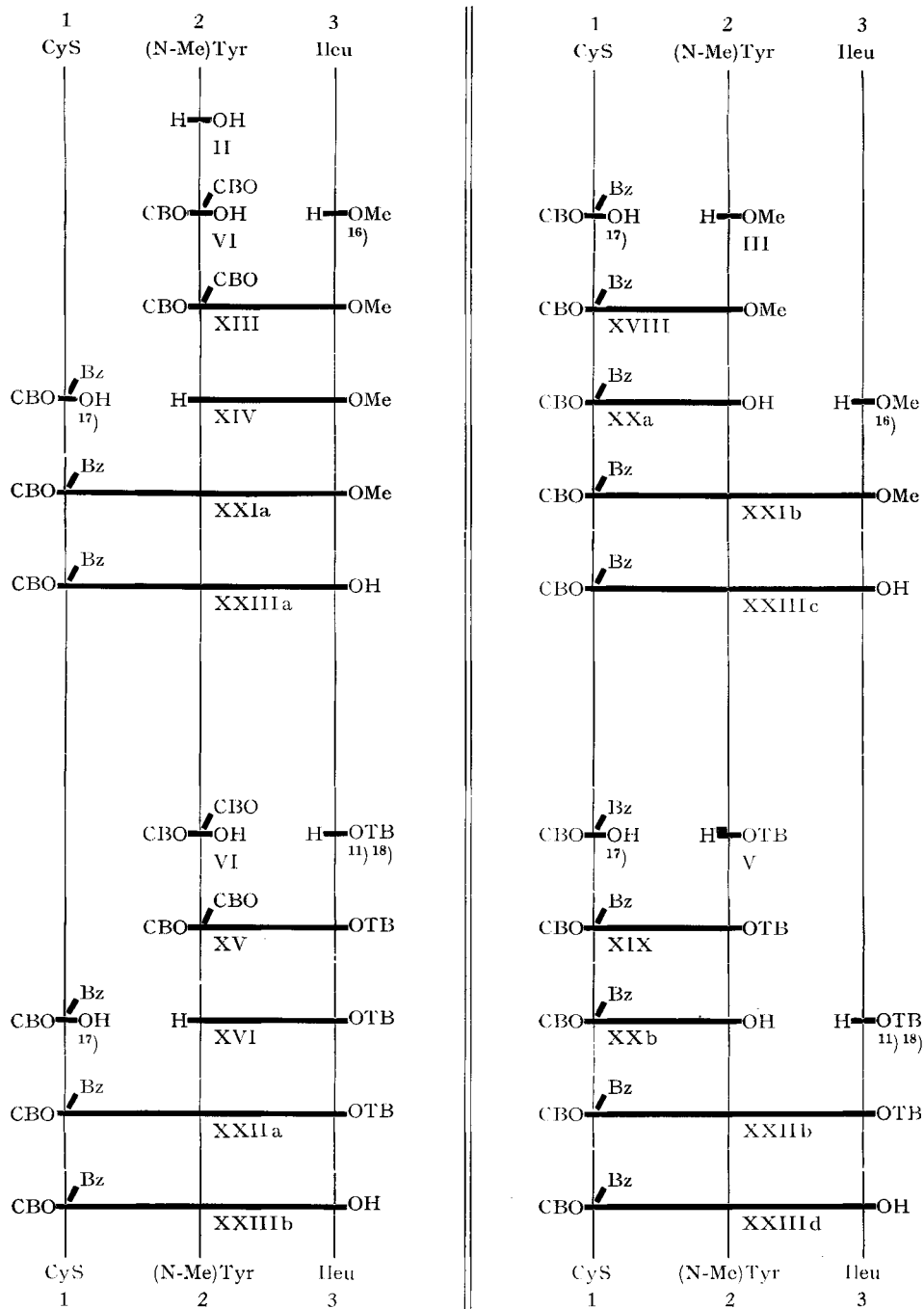
¹⁴⁾ Cf. P.-A. JAQUENOUD, *Chimia* **14**, 373 (1960).

¹⁵⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, *Helv.* **39**, 1421 (1956); P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **42**, 788 (1959); R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, *Helv.* **43**, 182 (1960); R. A. BOISSONNAS & ST. GUTTMANN, *Helv.* **43**, 190 (1960); P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **44**, 113 (1961).

¹⁶⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, *Helv.* **38**, 1491 (1955).

¹⁷⁾ C. R. HARRINGTON & T. H. MEAD, *Biochem. J.* **30**, 1602 (1936); B. HEGEDÜS, *Helv.* **31**, 742 (1948); ST. GOLDSCHMIDT & CH. JUTZ, *Chem. Ber.* **86**, 1116 (1953); B. ISELIN, M. FEURER & R. SCHWYZER, *Helv.* **38**, 1508 (1955).

Schéma de synthèse du tripeptide



Abréviations: CBO = carbobenzoxy

Bz = benzyle

TB = t-butyle

tyrosine (VI) avec le L-isoleucinate de t-butyle¹¹⁾¹⁸⁾ a fourni le O,N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de t-butyle (XV) qui, après scission sélective des groupes CBO par hydrogénation catalytique, a donné le N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de t-butyle (XVI). Par condensation avec la N-CBO-S-benzyl-L-cystéine¹⁷⁾, celui-ci a donné le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de t-butyle (XXIIa). Un bref traitement à l'acide chlorhydrique dans l'acide acétique a permis de scinder la fonction ester t-butylque sans toucher le groupe CBO¹⁹⁾ et a fourni le même acide tripeptidique XXIIIb que ci-dessus.

Un essai pour parvenir à l'hydrazide correspondant par une voie détournée a montré que la condensation du O,N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle (VII) avec le L-isoleucyl-1-t-butoxycarbonyl-2-hydrazide (XII) conduit normalement au O,N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-1-t-butoxycarbonyl-2-hydrazide (XVII) et qu'après scission sélective des groupes CBO, ce dernier se condense avec le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de p-nitrophényle¹³⁾ en tripeptide correspondant, mais que la scission du groupe t-butoxycarbonyl de ce dernier ne permet pas d'obtenir un hydrazide cristallisé.

La condensation de la N-CBO-S-benzyl-L-cystéine¹⁷⁾ avec le N-méthyl-L-tyrosinate de méthyle (III) ou avec le N-méthyl-L-tyrosinate de t-butyle (V) a conduit aux esters dipeptidiques XVIII et XIX correspondants, qui ont été facilement transformés dans la même N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosine (XXa ou b). Cependant la condensation de ce dipeptide avec le L-isoleucinate de méthyle¹⁶⁾ ou le L-isoleucinate de t-butyle¹¹⁾¹⁸⁾ a conduit à des tripeptides qui, tels quels ou après transformation en acide correspondant, possédaient des pouvoirs rotatoires inférieurs à ceux des tripeptides semblables obtenus ci-dessus par la voie récurrente 1 + 2, laquelle offre toute garantie contre le risque de racémisation.

C'est donc l'acide tripeptidique (XXIIIa ou b), obtenu par la voie récurrente, qui a été condensé au moyen du dicyclohexyl-carbodiimide avec le L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide¹⁴⁾ en N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XXVIII).

Les groupes protecteurs (N-CBO et S-benzyle) de ce nonapeptide protégé ont été enlevés par traitement au sodium dans l'ammoniac liquide²⁰⁾. Après oxydation à l'air en solution diluée, le nonapeptide cyclique obtenu a été soumis à un partage à contre-courant pour le débarrasser de quelques impuretés peptidiques mineures²¹⁾. Le coefficient de partage de ce nonapeptide est, dans le système sec-butanol/acide acétique aqueux 0,017N utilisé, le même que celui de l'oxytocine, ce qui permet de conclure que la cyclisation s'est effectuée normalement. Cette déduction est confirmée par les examens électrophorétiques aux pH 1,9 et 5,8, qui montrent que le nonapeptide

¹⁸⁾ G. W. ANDERSON & F. M. CALLAHAN, J. Amer. chem. Soc. 82, 3359 (1960).

¹⁹⁾ Cf. R. A. BOISSONNAS & G. PREITNER, Helv. 36, 875 (1953).

²⁰⁾ V. DU VIGNEAUD, CH. RESSLER, J. M. SWAN, G. W. ROBERTS & P. G. KATSOYANNIS, J. Amer. chem. Soc. 76, 3115 (1954).

²¹⁾ Dans le cas des analogues de l'oxytocine, comme dans celui de l'oxytocine elle-même, la cyclisation oxydative donne toujours naissance, à côté du monomère cyclique désiré, à de petites quantités de dimère et de polymères (cf. N. H. RYDON & coll., J. chem. Soc. 1956, 3157).

obtenu est homogène et qu'il migre comme l'oxytocine²²). L'hydrolyse acide fournit les acides aminés composants dans les rapports attendus. Nous concluons de ces faits que le produit obtenu possède bien la structure I que nous nous étions proposé de synthétiser.

Les activités biologiques de la (N-méthyl-Tyr)²-oxytocine ont été déterminées par le Dr B. BERDE et le Prof. H. KONZETT de notre département pharmacologique (Dir.: Dr A. CERLETTI)²³). Elles sont les suivantes, exprimées en unités internationales par mg: contraction de l'utérus isolé de Rat $1,2 \pm 0,4$; augmentation de la pression interne de la glande mammaire du Lapin $3,1 \pm 0,7$; baisse de la pression sanguine du Coq $0,32 \pm 0,05$; inhibition de la diurèse du Rat env. 0,001. Dans les trois premiers tests cités, aucun effet inhibiteur ou potentiateur n'a pu être observé sur des doses simultanées ou suivantes d'oxytocine.

L'introduction d'un groupe méthyle sur l'azote de la liaison peptidique 1-2 de la molécule d'oxytocine provoque donc une diminution très considérable de l'activité oxytocique, enlevant ainsi tout intérêt à l'examen de la résistance de cet analogue à l'action de l'oxytocinase.

Partie expérimentale²⁴)

Les *F.* sont corrigés (précision $\pm 1^\circ$). Les *séchages au vide* ont été effectués sous 10^{-2} à 10^{-3} Torr (16 h à 60° pour les analyses). Les *évaporations sous vide* ont été conduites dans l'évaporateur rotatif de CRAIG²⁵).

Les *chromatographies sur papier* ont été faites par la méthode ascendante (20-23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040b lavé». Rf_P dans le mélange n-butanol/acide acétique/eau (70:10:20); Rf_M dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:20); Rf_A dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/eau (35:35:30). Rf^a après scission préliminaire du groupe CBO- par un séjour de 40 min à 20° dans une solution à 20% de HBr dans l'acide acétique glacial, évaporation au vide et reprise dans le solvant de chromatographie ou d'électrophorèse; Rf^b après scission préliminaire du groupe CBO- par hydrogénation catalytique et reprise de même; Rf^c sans traitement préalable.

Les *chromatographies sur couche mince*²⁶) sont indiquées par Rf_m. L'adsorbant et le solvant utilisés sont indiqués dans chaque cas particulier (hauteur de développement: 10 à 12 cm). Les exposants a, h et 0 ont la même signification que pour les chromatogrammes sur papier.

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 exposants a, h et 0 ont la même signification que pour les chromatogrammes.

²²) Les produits de dimérisation et de polymérisation de l'oxytocine peuvent facilement être séparés de celle-ci par contre-courant ou par électrophorèse dans ces conditions. Cf. R. A. BOISSONNAS, dans: *Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels*, p. 10 (Pergamon Press, 1960); CH. RESSLER, *Science* 128, 1281 (1958).

²³) Les activités sont exprimées par rapport au «Troisième standard international pour la détermination des activités oxytociques, vasopressiques et antidiurétiques» et ont été déterminées selon les méthodes précédemment utilisées. Cf. B. BERDE, W. DOEPFNER & H. KONZETT, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* 12, 209 (1957); H. KONZETT & B. BERDE, *ibid.* 14, 333 (1959).

²⁴) Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr. W. SCHÖNINGER). Les spectres UV. ont été mesurés dans notre laboratoire spectroanalytique (Dr. H. G. LEEMANN).

²⁵) L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, *Analyt. Chemistry* 22, 1462 (1950).

²⁶) E. STAHL, *Pharmazie* 11, 633 (1956); *Chemiker-Ztg.* 82, 323 (1958).

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

Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et des phérogrammes ont été décrits précédemment²⁸⁾.

Les spectres UV. ont été mesurés après dissolution dans un mélange diméthylformamide/tri-*n*-butyl-amine (97:3).

A. Dérivés de la N-méthyl-L-tyrosine

N-Tosyl-O,N-diméthyl-L-tyrosine (I). A une solution de 40,0 g (119 mmoles) de N-tosyl-L-tyrosine⁹⁾ dans 600 ml de NaOH 1N on ajoute, sous forte agitation, 45,5 ml (480 mmoles) de sulfate de méthyle²⁹⁾. Après 1 h $\frac{1}{2}$ d'agitation, la suspension obtenue est chauffée à 70° pour dissoudre le sel sodique ayant précipité, puis on acidifie par 30 ml de HCl 4N. L'huile jaune se séparant se transforme, par refroidissement à 0° sous agitation, en un solide blanc qu'on essore, lave à l'eau glacée et sèche une nuit à 50° au vide poussé. On obtient ainsi 42,5 g (98%) de N-tosyl-O,N-diméthyl-L-tyrosine de F. 138° (litt.⁹⁾: 97%; F. 141–142°). $[\alpha]_D^{20} = -26,7 \pm 1^\circ$ ($c = 5,4$; éthanol), $-19^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide) (litt.⁹⁾: $-26,75^\circ$ ($c = 5,6$; éthanol)).

$C_{18}H_{21}O_3NS$	Calc.	C 59,5	H 5,8	O 22,0	N 3,9	S 8,8%
(363,4)	Tr.	59,2	5,8	21,9	4,0	8,9%

N-Méthyl-L-tyrosine (II). – a) *A partir de N-tosyl-O,N-diméthyl-L-tyrosine* (I). A une suspension de 92 g de phosphore rouge dans 500 ml d'acide iodhydrique à 57% préalablement chauffée 1 h à 75°, on ajoute 78,0 g (215 mmoles) de N-tosyl-O,N-diméthyl-L-tyrosine³⁰⁾. Après 1 h d'ébullition à reflux, la solution, débarrassée par filtration du phosphore restant, est évaporée au vide à 50°. Le résidu est dissous dans 100 ml d'eau chaude et presque complètement décoloré par addition de 5 ml d'une solution aqueuse à 40% d'hydrogénosulfite de Na. L'adjonction d'ammoniaque concentrée jusqu'à pH 7–8 (environ 100 ml) fait précipiter la N-méthyl-L-tyrosine, qu'on essore et lave avec 100 ml d'eau glacée. La substance est purifiée par dissolution dans 400 ml de NaOH 2N, filtration et précipitation par addition d'acide acétique 4N jusqu'à pH 6. Après séchage au vide poussé, une nuit à 60°, du produit essoré et lavé à l'eau, on obtient 34,8 g (83%) de N-méthyl-L-tyrosine de F. 292–295° (déc.)³¹⁾ (litt.^{5) 6) 7) 8)}: des F. compris entre 233° (déc.) et 280° (déc.) sont indiqués pour le produit naturel). $[\alpha]_D^{21} = +19,6 \pm 0,5^\circ$ ($c = 3,8$; HCl 10%) (litt.⁹⁾: $+19,75^\circ$ ($c = 3,87$; HCl 11%); 7): $+18,6^\circ$ ($c = 2$; HCl 11%)). $Rf_M^0 = 0,46$; $Rf_P^0 = 0,43$; $Rf_A^1 = 0,53$; $E_{0,8}^0 = 0,5$ Try; $E_{1,9}^0 = 0,79$ Try³²⁾ (révélation par ninhydrine³³⁾, FOLIN).

$C_{10}H_{13}O_3N$	Calc.	C 61,5	H 6,7	O 24,6	N 7,2%
(195,2)	Tr.	61,7	6,7	24,5	7,3%

b) *A partir de L-tyrosinate de méthyle*. A 19,5 g (100 mmoles) de L-tyrosinate de méthyle^{16) 34)}, dissous dans 750 ml de méthanol, on ajoute 11,0 ml³⁵⁾ d'une solution aqueuse à 35% de formaldéhyde et l'on hydrogène à 25° en présence de 15 g de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN³⁶⁾.

²⁸⁾ R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, *Helv.* **43**, 182 (1960); St. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **43**, 200 (1960).

²⁹⁾ FISCHER⁹⁾ effectue la méthylation au moyen d'iodure de méthyle et de NaOH, en bouteille à pression.

³⁰⁾ FISCHER⁹⁾ effectue la scission au moyen d'acide iodhydrique et d'iodure de phosphonium, en tube scellé, à 100°.

³¹⁾ Par chauffage, à partir de 280°, à raison de 3° par min.

³²⁾ L'absence de L-tyrosine et de N,N-diméthyl-L-tyrosine peut être contrôlée par électrophorèse à pH 1,9 (révélation par FOLIN), ces substances présentant respectivement des valeurs de migration de $E_{1,9}^0 = 0,94$ Try, et de $E_{1,9}^0 = 0,62$ Try. Un échantillon de N,N-diméthyl-L-tyrosine a été préparé par saponification de son ester méthylique (IV); $[\alpha]_D^{21} = +73^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 3,6$; HCl 10%, et $c = 2,2$; H₂O). R. E. BOWMAN & H. H. STROUD (*J. chem. Soc.* **1950**, 1342) indiquent $[\alpha]_D^{19} = +74,3^\circ$ ($c = 2,07$; H₂O).

³³⁾ La N-méthyl-L-tyrosine réagit plus faiblement à la ninhydrine que la L-tyrosine.

³⁴⁾ E. FISCHER, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **41**, 855, note 2 (1908).

³⁵⁾ Cette quantité correspond à un excès d'environ 35%. En employant 1 équivalent de formaldéhyde, nous avons obtenu un produit renfermant une certaine quantité, difficilement éliminable, de la substance de départ.

³⁶⁾ R. KUHN & J. HAAS, *Angew. Chem.* **67**, 785 (1955).

L'absorption d'hydrogène est terminée après 5 à 7 h. Après éloignement du catalyseur, la solution est évaporée au vide à 25°. Le résidu est dissous dans 200 ml de méthanol, additionné de 200 ml de NaOH 4N et laissé 1 h à 40°. Après addition de 200 ml de HCl 4N et refroidissement à 0°, on essore le produit ayant précipité, le lave à l'eau glacée (2 fois 200 ml), au méthanol et à l'éther, obtenant ainsi, après séchage au vide, 12,5 g (64%) de N-méthyl-L-tyrosine de F. 291–294° (déc.)³¹). $[\alpha]_D^{25} = +20,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 3,6$; HCl 10%). Les caractéristiques sont celles du produit préparé par la méthode a).

N-Méthyl-L-tyrosinate de méthyle (III). Dans un mélange, préparé à -10° , de 400 ml de méthanol et de 48 ml (667 mmoles) de chlorure de thionyle, on dissout 19,5 g (100 mmoles) de N-méthyl-L-tyrosine (II) et chauffe lentement sous agitation. Après 6 h d'ébullition et un repos d'une nuit à température ordinaire, la solution est évaporée au vide à 35°, le résidu est pulvérisé dans 1 l d'éther sec, essoré, lavé à l'éther et séché au vide sur KOH. Les 24,2 g de chlorhydrate de N-méthyl-L-tyrosinate de méthyle ainsi obtenus sont dissous dans 150 ml d'eau. On ajoute 250 ml de chloroforme, 250 ml de Na_2CO_3 1N, secoue et sépare; la phase aqueuse est extraite encore plusieurs fois au chloroforme (3 fois 125 ml). Les solutions chloroformiques réunies sont séchées sur MgSO_4 , évaporées au vide et séchées plusieurs heures à 25° au vide poussé, fournissant 19,5 g (93%) de N-méthyl-L-tyrosinate de méthyle de F. 109–111°, inchangé par recristallisation dans 10 volumes d'acétate d'éthyle chaud (litt.⁹): F. 111–112°; 7): 116–117°. $[\alpha]_D^{25} = +39,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,9$; méthanol); $+34,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,6$; éthanol) (litt.¹⁰): $+32^\circ$ ($c = 1,44$; éthanol). $\text{Rf}_M^0 = 0,95$; $\text{Rf}_P^0 = 0,62$; $\text{Rf}_A^0 = 0,9$; $\text{E}_{1,9}^0 = 1,36$ Glu; $\text{E}_{5,8}^0 = 1,10$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN). Spectre UV: $\lambda_{\text{max}} = 280,5 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,31$); $287,5 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,22$).

$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}$	Calc.	C 63,2	H 7,2	O 22,9	N 6,7	OCH_3 14,8%
(209,2)	Tr.	63,5	7,0	22,9	6,8	14,5%

N,N-diméthyl-L-tyrosinate de méthyle (IV). 1,95 g (10,0 mmoles) de L-tyrosinate de méthyle¹⁶)³⁴) et 1,70 ml de solution aqueuse à 35% de formaldéhyde sont dissous dans 100 ml de méthanol et hydrogénés à pression ordinaire, à 23°, en présence de 2,0 g de catalyseur selon KUHN³⁶), contenant 48 mg de palladium par g. L'absorption d'hydrogène est terminée en 4 h. La solution, débarrassée par centrifugation du catalyseur, est évaporée au vide, puis séchée à 25° au vide poussé. Le produit obtenu (2,20 g; F. 125°) est recristallisé dans 5 ml d'acétonitrile bouillant. On obtient ainsi 1,58 g (71%) de N,N-diméthyl-L-tyrosinate de méthyle cristallin de F. 128°. Pour l'analyse, un échantillon est recristallisé encore une fois dans le même solvant (F. 130°). L'absence de L-tyrosinate de méthyle et de N-méthyl-L-tyrosinate de méthyle est vérifiée par électrophorèse à pH 5,8 (révélation par FOLIN). $[\alpha]_D^{25} = +46,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,9$; éthanol); $+80^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,3$; acide acétique à 95%). $\text{Rf}_M^0 = 0,99$; $\text{Rf}_P^0 = 0,63$; $\text{Rf}_A^0 = 0,96$; $\text{E}_{1,9}^0 = 1,38$ Glu; $\text{E}_{5,8}^0 = 0,98$ His (révélation par FOLIN).

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{N}$	Calc.	C 64,6	H 7,7	O 21,5	N 6,3	OCH_3 13,9%
(223,3)	Tr.	64,7	7,4	21,5	6,2	13,6%

N-Méthyl-L-tyrosinate de t-butyle (V). Dans un flacon en verre épais contenant 15 ml de diméthoxy-1,2-éthane refroidi à 0°, on fait couler goutte à goutte 2,00 ml de H_2SO_4 conc. en agitant d'un mouvement circulaire; on ajoute ensuite 2,00 g (10,2 mmoles) de N-méthyl-L-tyrosine (II) dont la majeure partie se dissout, refroidit le mélange à -30° , introduit environ 15 ml d'isobutylène liquéfié, ferme hermétiquement le récipient et secoue 20 h à température ordinaire. Il ne subsiste pas d'insoluble. Après refroidissement à -30° pour supprimer la surpression, le flacon est ouvert et on fait couler son contenu dans 100 ml de Na_2CO_3 2,2N préalablement refroidi à $+5^\circ$. La température finale est de $+14^\circ$. On extrait à l'éther (3 fois 80 ml), sèche sur K_2CO_3 les solutions étherées réunies et évapore au vide à 25°. On secoue le sirop jaune pâle obtenu avec de l'éther de pétrole pour le débarrasser du solvant retenu, essore et sèche à 25° au vide poussé, obtenant ainsi 1,80 g (70%) de produit cristallisé de F. 107–113°. Une recristallisation dans 4,5 ml de benzène chaud, additionné après coup de 3 ml d'éther de pétrole fournit, après refroidissement, 1,20 g d'aiguilles groupées en houpettes et fondant à 117–118°. Pour l'analyse, on recristallise encore 2 fois dans le même système: F. 118–119°. Le produit est soluble dans le chloroforme, l'acétonitrile, l'éther, un peu soluble dans l'eau chaude, insoluble dans l'éther de pétrole, l'eau froide. $[\alpha]_D^{25} = +39^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; acide acétique); $+35,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; mé-

thanol); $+28^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,99$; $Rf_P^0 = 0,78$; $Rf_A^0 = 0,94$; $E_{1,9}^0 = 1,2$ Glu; $E_{8,8}^0 = 0,86$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN).

$C_{14}H_{21}O_3N$	Calc.	C 66,9	H 8,4	O 19,1	N 5,6%
(251,3)	Tr.	„ 67,0	„ 8,3	„ 18,9	„ 5,9%

O, N-Di-CBO-N-méthyl-L-tyrosine (VI). A une solution, maintenue dans un bain de glace et vigoureusement agitée, de 9,30 g (47,6 mmoles) de N-méthyl-L-tyrosine (II) dans 45 ml de NaOH 2N, on ajoute goutte à goutte, en 1 h, 19 ml (134 mmoles) de chloroformiate de benzyle³⁷⁾ et simultanément une solution de NaOH 4N de manière à maintenir le pH entre 9 et 10. Des adjonctions d'eau (160 ml en tout) permettent de rendre la suspension fluide. On agite encore 2 h à température ordinaire, sépare par centrifugation le précipité de la phase aqueuse, lave l'un et l'autre avec deux fois 100 ml d'éther, suspend à nouveau le précipité dans la phase aqueuse et acidifie à pH 2 avec 9 ml de HCl conc.; le précipité est extrait par 200 ml d'acétate d'éthyle; la phase organique est lavée par 30 ml de HCl 1N puis par NaCl aqueux à 10% (3 fois 120 ml), séchée sur Na_2SO_4 et évaporée au vide à 30° . L'huile obtenue (17,3 g) est dissoute dans 100 ml d'éther; par adjonctions successives d'éther de pétrole (400 ml en tout), en attendant chaque fois que le trouble produit se résolve en fines aiguilles, on obtient, après essorage, lavage à l'éther – éther de pétrole (1:4) et séchage au vide à 25° , 17,2 g (78%) de *O, N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosine* de F. 91–94°, inchangé après recristallisation dans 5 volumes de CCl_4 bouillant. Le produit ne donne pas de coloration avec le réactif de FOLIN-CIocalteu. Soluble dans le méthanol, l'acétonitrile, insoluble dans l'éther de pétrole, l'eau. $[\alpha]_D^{21} = -50^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide); $-55^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; méthanol).

$C_{26}H_{25}O_7N$	Calc.	C 67,4	H 5,4	O 24,1	N 3,0%
(463,5)	Tr.	„ 67,4	„ 5,3	„ 24,3	„ 3,0%

O, N-Di-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle (VII). Dans 14 ml de pyridine, on dissout, par chauffage à 80° , 9,29 g (20,0 mmoles) de *O, N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosine* (VI) et 6,00 g (13,5 mmoles) de phosphite tri-p-nitrophénylique³⁸⁾. Après un repos d'une nuit à 25° , on sépare par filtration une petite quantité d'insoluble, évapore le filtrat au vide à 45° , dissout le résidu d'évaporation dans un mélange de 600 ml d'éther et de 200 ml de HCl 1N, extrait encore la phase organique par 200 ml de HCl 1N, 3 fois par 200 ml de $NaHCO_3$ 1N et 200 ml d'eau alternativement, 3 fois par 200 ml de NaCl à 2%, sèche sur Na_2SO_4 , évapore au vide à 25° . La substance semi-solide obtenue est cristallisée par dissolution dans 100 ml d'éther suivie d'additions d'éther de pétrole par petites quantités (200 ml en tout), en attendant chaque fois que le trouble formé se transforme en cristaux. Après 2 jours à -15° , on essore, lave avec un mélange d'éther – éther de pétrole (1:2), sèche au vide à 25° et obtient ainsi 9,64 g (82%) de *O, N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle* sous forme de fines aiguilles jaune très pâle, de F. 84–86°. Pour l'analyse, on recristallise encore 2 fois dans 15 volumes d'éthanol bouillant: F. inchangé. Le produit est très peu soluble dans l'éthanol froid. $[\alpha]_D^{22} = -72,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide); $-87^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; pyridine). $Rf_M^A = 0,45$; $Rf_P^A = 0,43$; $Rf_A^A = 0,57$. $E_{1,9}^A = 1,0$ Glu (révélation par ninhydrine, FOLIN).

$C_{32}H_{28}O_9N_2$	Calc.	C 65,7	H 4,8	O 24,6	N 4,8%
(584,6)	Tr.	„ 65,7	„ 5,1	„ 24,5	„ 4,8%

O-Tosyl-N-méthyl-L-tyrosine (VIII). On dissout 5,86 g (30,0 mmoles) de N-méthyl-L-tyrosine (II) dans 60,0 ml de NaOH 1N, ajoute 3,75 g (15,0 mmoles) de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dissous dans 35 ml d'eau; la solution limpide, refroidie à $+10^\circ$, est agitée vigoureusement avec 6,0 g (31,5 mmoles) de chlorure de p-toluènesulfonyle dissous dans 150 ml d'éther. Le mélange réactionnel s'épaississant, on le dilue avec 100 ml d'eau et 50 ml d'éther. Après 1 h $\frac{1}{2}$ d'agitation à $+10^\circ$, le précipité formé est séparé par centrifugation, lavé sur filtre par H_2O (2 fois 50 ml) et soigneusement essoré. On décompose le complexe cuivrique par dissolution dans 300 ml de HCl 4N à 40° . La solution verte est filtrée puis additionnée rapidement de 900 ml d'eau, ce qui provoque la séparation rapide de fines aiguilles. Après un séjour de 16 h à la glacière, essorage, lavage à l'eau, à l'acétone, à l'éther, puis séchage à 50° au vide poussé, on obtient 7,89 g (75%) de *O-tosyl-N-*

³⁷⁾ H. J. PANNEMAN, A. F. MARX & J. F. ARENS, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 78, 487 (1959).

³⁸⁾ W. STRECKER & CH. GROSSMANN, Ber. deutsch. chem. Ges. 49, 63 (1916); B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, Helv. 40, 373 (1957).

méthyl-L-tyrosine de F. 265° (déc.). Soluble dans HCl 4N tiède, dans l'acide acétique à 95% chaud. $[\alpha]_D^{22} = +30,6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,3$; HCl 4N). $Rf_M^0 = 0,70$; $Rf_P^0 = 0,78$; $Rf_A^0 = 0,72$; $E_{1,9}^0 = 0,6$ Try (révélation par ninhydrine; coloration extrêmement faible au réactif de FOLIN).

$C_{17}H_{19}O_3NS$	Calc. C 58,4	H 5,5	O 22,9	N 4,0	S 9,2%
(349,4)	Tr. „ 58,2	„ 5,7	„ 23,1	„ 4,1	„ 9,3%

Soumis à l'action d'une solution 3,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique 1 h à 20°, le produit est recouvré inaltéré. Scindé par le sodium dans l'ammoniac liquide, il se transforme en N-méthyl-L-tyrosine (II).

O-Tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosine (IX). Dans un mélange de 24,0 ml de NaOH 1N et de 16 ml de dioxanne, on dissout 6,99 g (20,0 mmoles) de *O*-tosyl-N-méthyl-L-tyrosine (VIII). La solution obtenue est diluée par 100 ml d'un mélange eau – dioxanne (88:12), placée dans un bain de glace et, sous vigoureuse agitation, additionnée aussitôt de 4,0 ml (28,2 mmoles) de chloroformiate de benzyle³⁷⁾. Le pH est maintenu entre 10,0 et 10,5 par addition progressive, contrôlée au pH-stat, d'une solution de NaOH 1N – dioxanne (88:12). Lorsque la consommation d'alcali cesse, on ajoute encore 0,5 ml (3,5 mmoles) de chloroformiate de benzyle et continue d'agiter jusqu'à cessation de l'addition de solution alcaline (volume total consommé: 47,5 ml). Le précipité formé est séparé par centrifugation, lavé à l'eau puis soumis à trois reprises à une agitation dans HCl 4N (150 ml chaque fois), suivie de centrifugation. Il est ensuite lavé sur filtre jusqu'à neutralité et séché une nuit à 40° au vide poussé. Le produit obtenu (9,12 g) est dissous dans 45 ml d'acide acétique chaud; par addition de 4 ml d'eau et refroidissement, de fines aiguilles se séparent. Après un séjour de 2 h à la glacière, essorage, lavage par un mélange d'acide acétique et d'eau (20:4) puis séchage à 40° au vide poussé, on obtient 8,23 g (84%) de *O*-tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosine de F. 143–146°, produit qui est soumis à l'analyse. Un échantillon, recristallisé dans 5 volumes d'acide acétique chaud, voit son F. s'élever à 146–148° (F. inchangé par recristallisation supplémentaire). Soluble dans le méthanol tiède, le diméthylformamide, faiblement soluble dans l'éther, insoluble dans l'eau, l'éther de pétrole. $[\alpha]_D^{22} = -44^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,5$; diméthylformamide). $E_{1,9}^0 = 0,6$ Try (révélation par ninhydrine; coloration très faible par FOLIN).

$C_{25}H_{25}O_7NS$ (483,5)	Calc. C 62,1	H 5,2	O 23,2	N 2,9	S 6,6%
$C_{25}H_{25}O_7NS, \frac{1}{2}H_2O$ (492,5)	Calc. „ 61,0	„ 5,3	„ 24,4	„ 2,8	„ 6,5%
	Tr. „ 60,9	„ 5,5	„ 24,2	„ 2,8	„ 6,6%

O-Tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle (X). A une solution, refroidie à 0°, de 6,30 g (12,8 mmoles) d'hémihydrate de *O*-tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosine (IX) et de 2,23 g (16,0 mmoles) de p-nitrophénol dans un mélange de 25 ml de diméthylformamide et de 20 ml d'acétonitrile, on ajoute 2,82 g (13,7 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide, agite $\frac{1}{2}$ h à 0° puis une nuit à 20°. Après refroidissement à –15°, séparation par filtration de la dicyclohexylurée formée (2,41 g; 84%), on triture le résidu à l'éther de pétrole, le dissout dans 200 ml d'acétate d'éthyle, extrait par Na_2CO_3 0,1N jusqu'à décoloration complète (7 fois 200 ml), sèche la phase organique sur Na_2SO_4 et l'évapore au vide à 25°. Après séchage au vide poussé, 1 h à 25°, on dissout le produit dans 40 ml de benzène, ajoute de l'éther de pétrole jusqu'à apparition d'un léger trouble, amorce la solution et laisse reposer une nuit à la glacière. On obtient ainsi, après essorage et lavage par un mélange de benzène – éther de pétrole (1:1), 6,07 g (70%) de cristaux de F. 51–54°. Une recristallisation supplémentaire dans le même système permet d'obtenir 5,63 g (64%) de *O*-tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle de F. 67–68°, retenant 1 molécule de benzène. $[\alpha]_D^{21} = -60^\circ \pm 1,5^\circ$ ($c = 0,9$; acide acétique à 95%). $Rf_M^0 = 0,65$; $Rf_P^0 = 0,8$; $Rf_A^0 = 0,7$; $E_{1,9}^0 = 0,9$ Try (révélation par ninhydrine, faible coloration par FOLIN).

$C_{31}H_{28}O_9N_2S$ (604,6)	Calc. C 61,6	H 4,7	O 23,8	N 4,6	S 5,3%
$C_{31}H_{28}O_9N_2S, C_6H_6$ (682,7)	Calc. „ 65,1	„ 5,0	„ 21,1	„ 4,1	„ 4,7%
	Tr. „ 64,7	„ 4,9	„ 20,9	„ 4,4	„ 4,9%

B. Dérivés de la L-isoleucine

N-CBO-L-Isoleucyl-1-t-butoxycarbonyl-2-hydrazide (XI). A une solution, refroidie à –10°, de 2,65 g (10,0 mmoles) de N-CBO-L-isoleucine³⁹⁾ et de 1,40 ml (10,0 mmoles) de triéthylamine dans 80 ml de tétrahydrofurane on ajoute, sous agitation, 1,00 ml (10,4 mmoles) de chloro-

³⁹⁾ P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv. 44*, 113 (1961).

formiate d'éthyle, puis, 10 min plus tard, 1,375 g (10,4 mmoles) de carbazate de *t*-butyle⁴⁰⁾. On agite une nuit à température ordinaire, évapore la solution au vide à 30°, dissout le résidu dans 100 ml d'acétate d'éthyle, éloigne le chlorhydrate de triéthylamine insoluble, lave la solution avec H₂O (3 fois 50 ml), NH₄OH 1N (3 fois 50 ml), NaCl à 15% (3 fois 50 ml), sèche sur Na₂SO₄, évapore au vide et sèche à 25° au vide poussé. La poudre blanche obtenue (3,50 g) est recristallisée par dissolution dans 3–4 volumes de chloroforme bouillant et addition d'éther de pétrole (2 fois la quantité de chloroforme employée). Après une nuit à –15°, on obtient 3,12 g (82%) de fines aiguilles de N-CBO-*L*-isoleucyl-1-*t*-butoxycarbonyl-2-hydrazide de F. 168–170°. Soluble dans l'acide acétique, l'acétonitrile, insoluble dans l'eau, l'éther de pétrole. $[\alpha]_D^{25} = -17^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide); $-43^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; méthanol). $Rf_M^0 = 0,98$; $Rf_P^0 = 0,95$; $Rf_A^0 = 0,95$ (révélation par FOLIN).

$C_{19}H_{29}O_5N_3$	Calc.	C 60,1	H 7,7	O 21,1	N 11,1%
(379,4)	Tr.	., 60,3	., 7,6	., 21,2	., 11,0%

L-Isoleucyl-1-*t*-butoxycarbonyl-2-hydrazide (XII). Une solution de 9,00 g (23,7 mmoles) de N-CBO-*L*-isoleucyl-1-*t*-butoxycarbonyl-2-hydrazide (XI) dans 120 ml de méthanol est hydrogénée, à température et pression ordinaires pendant 6 h, en présence de 4 g de catalyseur selon KUHN³⁶⁾ (contenant 48 mg de palladium par g de catalyseur). Après filtration sur charbon actif (MERCK, pour analyse), la solution, contenant des ions Cl (provenant probablement du catalyseur), est passée sur 80 ml d'Amberlite IRA 410 sous forme basique, évaporée au vide puis séchée à 25° au vide poussé. La substance cristallise au contact de l'éther. Elle est recristallisée par dissolution dans 25 volumes d'éther chaud, adjonction de 50 volumes d'éther de pétrole et repos à la glacière. On isole ainsi, sous forme de plaquettes, 3,03 g (52%) de *L*-isoleucyl-1-*t*-butoxycarbonyl-2-hydrazide de F. 97–100°. De la liqueur-mère conservée à –20°, on obtient une seconde fraction; recristallisée dans les mêmes conditions, elle fournit 0,41 g (7%) de produit de F. 96–99°. Pour l'analyse, un échantillon est recristallisé encore une fois de la même manière: F. 98–100°. Le produit est soluble dans l'eau chaude, le chloroforme, l'acétonitrile, le méthanol, insoluble dans l'éther de pétrole. $[\alpha]_D^{25} = +24^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,7$; acide acétique); $+44^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,6$; acide acétique à 95%). $Rf_M^0 = 0,98$; $Rf_P^0 = 0,76$; $Rf_A^0 = 0,98$; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Glu; $E_{2,8}^0 = 1,1$ His (révélation par FOLIN, ninhydrine, chlore); $Rfm^0 = 0,2$ (silicagel; chloroforme/méthanol, 9:1; révélation par FOLIN).

$C_{11}H_{23}O_3N_3$	Calc.	C 53,9	H 9,5	O 19,6	N 17,1%
(245,3)	Tr.	., 53,9	., 9,5	., 19,8	., 17,2%

C. Séquence (N-Me)Tyr-Ileu

O,*N*-Di-CBO-*N*-méthyl-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucinate de méthyle (XIII). A une solution, refroidie à –10°, de 927 mg (2,0 mmoles) de *O*,*N*-di-CBO-*N*-méthyl-*L*-tyrosine (VI) et de 0,300 ml (2,14 mmoles) de triéthylamine dans 10 ml de chloroforme, on ajoute sous agitation 0,220 ml (2,29 mmoles) de chloroformiate d'éthyle. Dix minutes plus tard, on ajoute une solution de 436 mg (2,40 mmoles) de chlorhydrate de *L*-isoleucinate de méthyle¹⁶⁾ et de 0,340 ml (2,43 mmoles) de triéthylamine dans 6 ml de chloroforme, agite encore 1 h à température ordinaire et laisse reposer une nuit. Le mélange de réaction, dilué d'un volume de chloroforme, est lavé par HCl 1N glacé, H₂O, NH₄OH 1N, et enfin par NaCl à 5% jusqu'à neutralité. Après séchage sur Na₂SO₄, évaporation du filtrat au vide et séchage à 25° au vide poussé, on obtient, sous forme d'huile épaisse, 1,160 g (98%) de *O*,*N*-di-CBO-*N*-méthyl-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucinate de méthyle. Soluble dans l'éther, l'acétonitrile, insoluble dans l'éther de pétrole. $[\alpha]_D^{25} = -18^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; méthanol); $+10^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 4,0$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,98$; $Rf_P^0 = 0,75$; $Rf_A^0 = 0,93$; $E_{1,9}^0 = 1,1$ Tyr; $E_{2,8}^0 = 0,84$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN).

$C_{33}H_{38}O_8N_2$	Calc.	C 67,1	H 6,5	O 21,7	N 4,7	OCH ₃ 5,3%
(590,7)	Tr.	., 67,1	., 6,5	., 21,5	., 4,9	., 5,0%

Ce dipeptide protégé a été également préparé par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide dans l'acétonitrile avec un rendement de 76%. $[\alpha]_D^{25} = -21^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; méthanol); $+10^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,9$; diméthylformamide).

⁴⁰⁾ L. A. CARPINO, J. Amer. chem. Soc. 79, 98 (1957).

N-Méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle, HBr (XIV). On dissout 4,10 g (6,94 mmoles) de l'ester dipeptidique XIII dans 40 ml d'une solution 3,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique. Après un repos d'une heure à température ordinaire, on évapore au vide à 35°, triture le résidu à l'éther sec renouvelé plusieurs fois, sépare par filtration la poudre obtenue, la lave à l'éther et la sèche à 25° au vide poussé. On obtient 2,41 g (86%) de bromhydrate de N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle de F. 190° environ (instantané). Soluble dans l'eau, le méthanol. $[\alpha]_D^{22} = -18^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,2$; diméthylformamide); $+6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,9$; méthanol). $Rf_M^0 = 0,98$; $Rf_P^0 = 0,75$; $Rf_A^0 = 0,93$; $E_{1,9}^0 = 1,1$ Try; $E_{8,8}^0 = 0,9$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN).

$C_{17}H_{26}O_4N_2Br$ (402,3)	Calc.	C 50,7	H 6,5	O 15,9	N 7,0	Br 19,9	OCH ₃ 7,7%
Tr.	..	50,4	.. 7,1	.. 16,3	.. 7,1	.. 19,3	.. 7,7%

O, N-Di-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de t-butyle (XV). On dissout 1,17 g (2,00 mmoles) de O, N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle (VII) et 0,52 g (2,78 mmoles) de L-isoleucinate de t-butyle⁴¹⁾ dans 4 ml de tétrahydrofurane. Après un repos de 48 h, on évapore au vide à 30°, dissout le résidu dans 40 ml d'acétate d'éthyle, lave par H₃PO₄ 1 N (6 fois 25 ml), H₂O, Na₂CO₃ 1 N (7 fois 25 ml), H₂O, sèche sur Na₂SO₄ et évapore au vide à 30°. Après séchage à 45° au vide poussé, on obtient, à l'état non cristallisé, 0,97 g (77%) de O, N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de t-butyle. Soluble dans le benzène, insoluble dans l'éther de pétrole. $[\alpha]_D^{22} = +9^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,4$; diméthylformamide); $-17,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$; méthanol). $Rf_M^0 = 0,99$; $Rf_P^0 = 0,80$; $Rf_A^0 = 0,95$; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Try; $E_{8,8}^0 = 0,8$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN).

$C_{38}H_{44}O_8N_2$ (632,7)	Calc.	C 68,3	H 7,0	O 20,2	N 4,4%
Tr.	..	68,4	.. 7,0	.. 20,3	.. 4,2%

N-Méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de t-butyle (XVI). Une solution de 5,07 g (8,01 mmoles) de l'ester dipeptidique XV dans 100 ml de méthanol est hydrogénée en présence de 500 mg de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN³⁶⁾. L'hydrogénation dure 1 h $\frac{1}{2}$. Le catalyseur est séparé par centrifugation. La mousse hygroscopique obtenue par évaporation de la solution au vide, à 25°, est dissoute dans 50 ml d'éther. Une petite quantité d'insoluble est séparée par centrifugation. Le produit (2,4 g) obtenu par évaporation au vide de la solution étherée contient une impureté mise en évidence par chromatographie et électrophorèse. Une distribution à contre-courant (5 transferts seulement) dans le système sec-butanol/eau/acide acétique (500:700:0,6) permet de l'éliminer, car elle est plus soluble dans la phase inférieure. Par évaporation au vide, à 25°, du contenu des tubes ne contenant plus d'impureté, on obtient 1,74 g (57%) de N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de t-butyle, sous forme d'une mousse. $[\alpha]_D^{22} = -14,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,5$; méthanol). $Rf_M^0 = 0,99$; $Rf_P^0 = 0,80$; $Rf_A^0 = 0,95$; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Try; $E_{8,8}^0 = 0,8$ His; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Glu; $E_{8,8}^0 = 0,3$ Try (révélation par FOLIN, ninhydrine).

$C_{20}H_{32}O_4N_2$ (364,5)	Calc.	C 65,9	H 8,9	O 17,6	N 7,7%
$C_{20}H_{32}O_4N_2, 1 H_2O$ (382,5)	Calc.	.. 62,8	.. 9,0	.. 20,9	.. 7,3%
	Tr.	.. 62,8	.. 8,7	.. 21,4	.. 6,9%

Stocké à -20° , le produit non utilisé présente, après quelques semaines, un changement dans son comportement électrophorétique: en particulier à pH 5,8, le produit se comporte comme une substance neutre. $E_{8,8}^0 = 0,3$ Try (révélation par ninhydrine et FOLIN).

(O, N-Di-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-1)-t-butoxycarbonyl-2-hydrazide (XVII). On laisse réagir pendant 16 h à 25° une solution de 1,20 g (2,05 mmoles) de O, N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle (VII) et de 676 mg (2,75 mmoles) de L-isoleucyl-1-t-butoxycarbonyl-2-hydrazide (XII) dans 1,5 ml de tétrahydrofurane. Après évaporation au vide à 25°, le résidu est dissous dans 45 ml d'acétate d'éthyle et lavé par H₃PO₄ à 10% (6 fois 25 ml), Na₂CO₃ 1 N

⁴¹⁾ Préparé selon ROESKE¹¹⁾, en isolant intermédiairement l'ester sous la forme de son phosphite: F. 178–180° (déc.); $[\alpha]_D^{23} = +25,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,7$; méthanol).

$C_{10}H_{21}O_2N, H_3PO_3$ (269,3)	Calc.	C 44,6	H 9,0	N 5,2	P 11,5%
Tr.	..	44,8	.. 8,9	.. 5,4	.. 11,4%

On libère l'ester à partir de la solution méthanolique de son sel au moyen d'Amberlite IRA 410 (forme basique). $[\alpha]_D^{22} = +24,8^\circ$ ($c = 100$). ANDERSON & CALLAHAN¹⁸⁾ indiquent $[\alpha]_D^{25} = +26,7^\circ$ ($c = 100$).

(8 fois 25 ml) puis séché sur Na_2SO_4 . Après évaporation au vide et séchage à 25° au vide poussé, on obtient 1,10 g (78%) d'une mousse qu'on cristallise par dissolution dans 7,5 ml de benzène et adjonction d'éther de pétrole jusqu'à apparition d'un léger trouble. Le lendemain les aiguilles séparées sont essorées, lavées par un mélange de benzène – éther de pétrole 1:1 et séchées au vide à 25° . On obtient ainsi 640 mg de (O, N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-1)-t-butoxycarbonyl-2-hydrazide de F. 97° (instantané). Par adjonction progressive d'éther de pétrole à la liqueur-mère, une deuxième fraction (311 mg) de même pureté est obtenue (rendement total 67%). $[\alpha]_D^{25} = -40^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,4$; acide acétique à 95%). $E_{1,9}^{\text{H}} = 0,8$ Try; $E_{1,9}^{\text{A}} = 1,05$ Glu; $E_{5,8}^{\text{H}} = 0,7$ His; $E_{5,8}^{\text{A}} = 0,9$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN, chlore); $\text{Rfm}^0 = 0,8$ (silicagel; chloroforme/méthanol, 9:1; révélation par FOLIN).

$\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{O}_9\text{N}_4$	Calc.	C 64,3	H 6,7	O 20,8	N 8,1%
(690,8)	Tr.	„ 64,2	„ 6,8	„ 20,5	„ 8,1%

Ayant éliminé les groupes CBO par hydrogénation catalytique puis condensé le produit résultant avec la N-CBO-S-benzyl-L-cystéine¹⁷) dans l'acétonitrile au moyen du dicyclohexylcarbodiimide, on obtient, après les lavages habituels, un produit non cristallisable, mais homogène en chromatographie sur couche mince (silicagel; chloroforme/méthanol, 9:1; révélation par FOLIN et chlore); la scission du groupe t-butoxycarbonyl n'a pas conduit à un hydrazide cristallisé.

D. Séquence CyS-(N-Me)Tyr

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosinate de méthyle (XVIII). Dans 40 ml de tétrahydrofurane, débarrassé de peroxydes par passage sur une colonne de 100 ml d'alumine, on dissout, sous atmosphère d'azote, 3,45 g (10,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine¹⁷), 2,30 g (11,0 mmoles) de N-méthyl-L-tyrosinate de méthyle (III), refroidit à -5° , ajoute 2,30 g (11,1 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide dissous dans 17 ml de tétrahydrofurane dépourvu de peroxydes, agite 3 h à 0° puis une nuit à 25° . Après refroidissement à -10° , séparation par filtration de la dicyclohexylurée (2,12 g, 94%), évaporation du filtrat au vide à 25° , on élimine l'excès de dicyclohexylcarbodiimide en dissolvant l'huile obtenue dans le chloroforme et en la reprécipitant à l'éther de pétrole. On décante, dissout le résidu huileux dans 100 ml d'acétate d'éthyle, lave avec H_2SO_4 1N glacé, H_2O , NH_4OH 1N, H_2O , sèche sur Na_2SO_4 , évapore au vide puis sèche à 25° au vide poussé. On obtient 4,80 g (89%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosinate de méthyle sous forme d'une huile épaisse qu'on n'a pas pu faire cristalliser. $[\alpha]_D^{25} = -104^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; méthanol); $-97^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,2$; diméthylformamide). $\text{Rf}_M^{\text{A}} = 0,98$; $\text{Rf}_P^{\text{A}} = 0,80$; $\text{Rf}_A^0 = 0,93$; $E_{1,9}^{\text{A}} = 1,0$ Try (révélation par FOLIN, chlore; le produit scindé réagit très faiblement à la ninhydrine); $\text{Rfm}^0 = 0,8$ (silicagel; chloroforme/méthanol, 9:1; révélation par FOLIN).

$\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$	Calc.	C 64,9	H 6,0	O 17,9	N 5,2	S 6,0	OCH_3 5,8%
(536,6)	Tr.	„ 64,6	„ 5,8	„ 18,1	„ 5,0	„ 6,0	„ 5,9%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosinate de t-butyle (XIX). A une solution, refroidie à -10° , de 675 mg (1,95 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine¹⁷) et de 503 mg (2,00 mmoles) de N-méthyl-L-tyrosinate de t-butyle (V) dans 8 ml d'acétonitrile, on ajoute 450 mg (2,18 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide dissous dans 2 ml du même solvant, agite 1 h à 0° puis 5 h à 25° . Après refroidissement à -5° et séparation de la dicyclohexylurée (428 mg; 98%), le filtrat est évaporé au vide à 25° jusqu'à consistance sirupeuse, trituré plusieurs fois dans l'éther de pétrole puis dissous dans 30 ml d'acétate d'éthyle. La solution est lavée par H_3PO_4 1N (5 fois 10 ml), H_2O , NH_4OH 1N (3 fois 10 ml), H_2O jusqu'à neutralité, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée au vide à 25° . On purifie encore le produit par dissolution dans 10 ml de méthanol suivie de précipitation par 30 ml d'acide acétique 0,5N. On centrifuge, lave le culot à l'eau, sèche à 25° au vide poussé. On obtient ainsi, sous forme d'une mousse hygroscopique, 0,88 g (78%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosinate de t-butyle. Soluble dans l'éther. $[\alpha]_D^{25} = -83^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$; diméthylformamide); $-81^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,3$; méthanol). $\text{Rfm}^0 = 0,8$ (silicagel; chloroforme/méthanol, 9:1; révélation par FOLIN). $E_{1,9}^{\text{A}} = 0,75$ Try; $E_{5,8}^{\text{A}} = 0,5$ Try (révélation par ninhydrine, FOLIN).

$\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$	Calc.	C 66,4	H 6,6	O 16,6	N 4,8	S 5,5%
(578,7)	Tr.	„ 66,7	„ 6,7	„ 16,6	„ 4,7	„ 5,4%

Un essai de condensation du N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de p-nitrophényle¹³⁾ avec le N-méthyl-L-tyrosinate de t-butyle (V) dans le diméthylformamide a conduit, après les lavages habituels, à un produit hétérogène présentant à l'électrophorèse, à côté de la tache attendue, une importante tache basique ($E_{1,9}^a = 1,2$ Glu; $E_{5,8}^a = 1,2$ His) réagissant positivement à la ninhydrine et faiblement au réactif de FOLIN.

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosine (XX). – a) *A partir de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosinate de méthyle (XVIII).* A une solution de 3,81 g (7,10 mmoles) de l'ester dipeptidique XVIII dans 20 ml de méthanol, on ajoute 7,1 ml de NaOH aqueux 4N, laisse reposer 1 h à 25°, acidifie par HCl 4N (7,5 ml), précipite par adjonction de 10 à 15 volumes d'eau, centrifuge, dissout le culot dans 30 ml d'acétate d'éthyle, extrait par NaHCO₃ 0,25N (3 fois 110 ml), acidifie par HCl 4N (23 ml) les solutions hydrogénocarbonatées, réextrait par de l'acétate d'éthyle (3 fois 70 ml), lave la phase organique à l'eau jusqu'à neutralité, sèche sur Na₂SO₄, évapore au vide puis sèche une nuit à 25° au vide poussé, obtenant ainsi 3,50 g (94%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosine sous forme d'une mousse blanche fondant à partir de 70°. Soluble dans NH₄OH, un peu soluble dans l'éther, insoluble dans l'eau, l'éther de pétrole. $[\alpha]_D^{25} = -82^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,8$; acide acétique à 95%). $E_{5,8}^a = 0,28$ Glu (révélation par FOLIN). $E_{1,9}^a = 0,75$ Try; $E_{5,8}^a = 0,5$ Try (révélation par ninhydrine, FOLIN).

$C_{28}H_{30}O_6N_2S$	Calc.	C 64,3	H 5,8	O 18,4	N 5,4	S 6,1%	Equiv. 523
(522,6)	Tr.	„ 63,9	„ 5,9	„ 18,4	„ 5,2	„ 6,1%	„ 520

b) *A partir de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosinate de t-butyle (XIX).* On fait barboter un courant de gaz chlorhydrique sec, pendant 20 min à +15°, dans une solution de 321 mg (0,555 mmole) de l'ester dipeptidique XIX dans 5 ml d'acide acétique. On évapore à sec au vide à 25°, reprend dans 25 ml d'acétate d'éthyle, lave la solution obtenue par HCl 1N (2 fois 10 ml), H₂O, puis extrait par Na₂CO₃ 0,5N (3 fois 10 ml). Les solutions carbonatées réunies sont acidifiées par H₂SO₄ 4N puis extraites par de l'acétate d'éthyle (3 fois 10 ml). La solution organique est lavée par H₂SO₄ 1N (5 ml) puis par H₂O jusqu'à neutralité, séchée sur Na₂SO₄, évaporée au vide, séchée enfin au vide poussé une nuit à 25°, livrant 221 mg (76%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosine se comportant à l'électrophorèse comme le produit préparé par la méthode a). $[\alpha]_D^{25} = -83^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$; acide acétique à 95%).

E. Séquence CyS-(N-Me)Tyr-Ileu

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (XXI). – a) *Par condensation de la N-CBO-S-benzyl-L-cystéine avec le dipeptide XIV.* On dissout 2,45 g (6,09 mmoles) de bromhydrate de N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (XIV) dans 40 ml d'eau, ajoute 9 ml de Na₂CO₃ 1N, extrait au chloroforme (3 fois 10 ml), sèche rapidement les solutions chloroformiques sur Na₂SO₄, ajoute, après éloignement de l'agent desséchant, 1,90 g (5,50 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine¹⁷⁾ puis, après refroidissement à –5°, 1,26 g (6,10 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et 30 ml d'acétonitrile. Après 20 h d'agitation à température ordinaire, on refroidit à 0°, sépare par filtration la dicyclohexylurée (1,16 g, 94%), évapore le filtrat au vide à 25°, triture plusieurs fois à l'éther de pétrole le résidu huileux, le dissout dans 120 ml d'acétate d'éthyle, lave avec HCl 1N glacé, NH₄OH 1N, H₂O jusqu'à neutralité, puis sèche sur MgSO₄. Après évaporation au vide et séchage d'une nuit à 25° au vide poussé, on obtient 3,40 g (95%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle non cristallisé. Non scindé, le produit ne comporte pas d'impureté réagissant à la ninhydrine. Après scission du groupe CBO par une solution de gaz bromhydrique 3,5N dans l'acide acétique 1 h à 20°, on observe à l'électrophorèse, à pH 5,8 et 1,9, quelques faibles taches accessoires migrant vers la cathode davantage que la tache principale et réagissant à la ninhydrine mais non au FOLIN. $[\alpha]_D^{25} = -80^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,2$; acide acétique à 95%). $Rf_M^a = 0,97$; $Rf_P^a = 0,87$; $Rf_A^a = 0,95$; $E_{1,9}^a = 0,75$ Try; $E_{5,8}^a = 0,45$ His (révélation par ninhydrine, chlore, FOLIN).

$C_{35}H_{43}O_7N_3S$	Calc.	C 64,7	H 6,7	O 17,2	N 6,5	S 4,9	OCH ₃ 4,8%
(649,8)	Tr.	„ 64,4	„ 6,6	„ 17,0	„ 6,5	„ 5,1	„ 5,0%

b) *Par condensation du dipeptide XXa avec le L-isoleucinate de méthyle.* Une solution de 455 mg (2,50 mmoles) de chlorhydrate de L-isoleucinate de méthyle dans 10 ml de méthanol est passée sur 10 ml d'Amberlite IRA 410 (forme basique) puis évaporée au vide à 20°. Au résidu on ajoute 10 ml d'acétonitrile, et 1,045 g (2,00 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosine

(XXa), refroidit à -10° et ajoute 454 mg (2,20 mmole) de dicyclohexyl-carbodiimide. Après agitation pendant une nuit, le mélange de réaction est soumis au même traitement que le produit préparé par la méthode a). On obtient 1,22 g (94%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle se comportant chromatographiquement et électrophorétiquement comme la substance obtenue sous a). $[\alpha]_D^{25} = -61^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,6$; acide acétique à 95%).

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de t-butyle (XXII). — a) *Par condensation de la N-CBO-S-benzyl-L-cystéine avec le dipeptide XVI.* A une solution, refroidie à -5° , de 426 mg (1,23 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine¹⁷ et de 502 mg (1,31 mmole) de N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de t-butyle (XVI) dans 5 ml de tétrahydrofurane, on ajoute 320 mg (1,55 mmole) de dicyclohexyl-carbodiimide et agit 20 h à température ordinaire. Après refroidissement à -15° , le précipité de dicyclohexylurée formé (262 mg, 95%) est séparé par filtration. On évapore le filtrat au vide à 25° , dissout le résidu dans 15 ml d'acétate d'éthyle, extrait par H_3PO_4 1N (3 fois 8 ml), H_2O , NH_4OH 1N (3 fois 8 ml), H_2O jusqu'à neutralité, sèche sur Na_2SO_4 , évapore au vide et sèche à 25° au vide poussé. On obtient 850 mg (100%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de t-butyle non cristallisé. Soluble dans le benzène, insoluble dans l'éther de pétrole. $Rf_M^a = 0,98$; $Rf_P^a = 0,82$; $Rf_A^a = 0,88$; $E_{1,9}^a = 0,9$ Try; $E_{3,8}^a = 0,5$ Try (révélation par ninhydrine, FOLIN). Non scindé, le produit ne comporte pas d'impureté réagissant à la ninhydrine. Après scission du groupe CBO par une solution de gaz bromhydrique 3,5N dans l'acide acétique, on observe à l'électrophorèse, à pH 5,8 et 1,9, quelques taches secondaires réagissant à la ninhydrine mais non au FOLIN et migrant vers la cathode davantage que la tache principale.

$C_{38}H_{49}O_7N_3S$	Calc.	C 66,0	H 7,1	N 6,1	S 4,6%
(691,9)	Tr.	66,2	7,2	6,3	4,4%

b) *Par condensation du dipeptide XXa avec le L-isoleucinate de méthyle.* Voir sous la préparation du tripeptide XXIII sous d).

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucine (XXIII). — a) *A partir de l'ester méthylique XXIa.* Une solution de 1,29 g (1,99 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (XXIa) dans 20 ml d'acétone et 10 ml de méthanol est additionnée de 4,00 ml de NaOH 4N. Après un repos de 1 h à 25° , on ajoute 4,10 ml de HCl 4N, puis 150 ml d'eau. On centrifuge, dissout le culot dans 7 ml de méthanol et le précipité à nouveau par 150 ml d'eau. Après centrifugation et séchage au vide poussé, le solide blanc (1,13 g) ne contenant plus de groupe méthoxyle est dissous dans 35 ml d'acétate d'éthyle puis extrait par Na_2CO_3 0,5N (3 fois 10 ml). Les solutions carbonatées réunies sont acidifiées par H_2SO_4 4N et réextraites par de l'acétate d'éthyle. Après lavage à l'eau, jusqu'à neutralité, des solutions organiques réunies, séchage sur Na_2SO_4 , évaporation au vide puis séchage à 25° au vide poussé, on obtient 0,79 g (62%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucine de F. 185–190° (le produit suinte dès 70°). $[\alpha]_D^{25} = -75,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,6$; acide acétique à 95%). $Rf_M^a = 0,98$; $Rf_P^a = 0,82$; $Rf_A^a = 0,88$; $E_{1,9}^a = 0,9$ Try; $E_{3,8}^a = 0,5$ Try (révélation par ninhydrine, FOLIN).

$C_{34}H_{41}O_7N_3S$	Calc.	C 64,2	H 6,5	O 17,6	N 6,6	S 5,0%	Equiv. 636
(635,8)	Tr.	64,6	6,7	17,2	6,6	4,9%	640

b) *A partir de l'ester t-butylrique XXII.* On dissout 175 mg (0,253 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de t-butyle (XXII) dans 3 ml d'acide acétique, y fait barboter un courant de gaz chlorhydrique sec pendant 30 min à $+15^\circ$, évapore au vide à 25° , dissout le résidu dans 15 ml d'acétate d'éthyle, lave avec HCl 1N (2 fois 10 ml), H_2O , puis extrait par Na_2CO_3 0,5N (3 fois 5 ml). Les solutions carbonatées réunies sont acidifiées par H_2SO_4 4N puis réextraites par de l'acétate d'éthyle (3 fois 10 ml). Après lavage à l'eau, jusqu'à neutralité, des solutions organiques réunies, séchage sur Na_2SO_4 , évaporation au vide et séchage à 25° au vide poussé, on obtient 128 mg (79%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucine. $[\alpha]_D^{25} = -72,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,3$; acide acétique à 95%). Le produit se comporte chromatographiquement et électrophorétiquement, après scission du groupe CBO, comme le produit obtenu sous a).

Equiv. Calc. 636 Tr. 638

c) *A partir de l'ester méthylique XXIb.* Dans les mêmes conditions de saponification et d'isoleu-
ment que celles indiquées sous a), l'ester méthylique XXIb donne avec un rendement de 53% un acide tripeptidique de $[\alpha]_D^{25} = -60^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,8$; acide acétique à 95%).

d) *A partir du dipeptide XXa et du L-isoleucinate de méthyle.* A une solution, refroidie à -10° , de 1,045 g (2,00 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosine (XXa) et de 450 mg (2,40 mmoles) de L-isoleucinate de t-butyle⁴¹) dans 12 ml de tétrahydrofuranne, on ajoute 494 mg (2,39 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite une nuit à 20° . Après refroidissement à -10° , séparation par filtration de la dicyclohexylurée formée (381 mg, 85%), évaporation du filtrat au vide à 30° , trituration du résidu à l'éther de pétrole puis dissolution dans 50 ml d'acétate d'éthyle, lavages par H_3PO_4 1N, H_2O , Na_2CO_3 1N, H_2O , séchage sur Na_2SO_4 , évaporation au vide puis séchage à 25° au vide poussé, on obtient 1,29 g (93%) d'ester t-butylique tripeptidique. – Après acidolyse de la fonction ester dans les conditions indiquées sous b), on obtient 610 mg (48%) d'acide tripeptidique de $[\alpha]_D^{25} = -38,5^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1,4$; acide acétique à 95%).

F. Octapeptides

O, N-Di-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XXIV). Dans 100 ml de diméthylformamide on dissout, à 50° , 6,80 g (8,16 mmoles) de L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide¹³). Après rapide refroidissement à 30° on ajoute 5,75 g (9,83 mmoles) de O, N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle (VII). La solution jaune, limpide, est agitée une nuit à 20° . L'adjonction de 1,5 l d'acétate d'éthyle fait précipiter la substance sous forme gélatineuse. Après centrifugation, le culot est lavé 4 fois par suspension dans 750 ml d'acétate d'éthyle suivie de centrifugation, puis séché à 30° au vide poussé. Le produit pulvérulent obtenu est traité par 60 ml d'éthanol à 80% bouillant. Le gel obtenu par refroidissement est abandonné 1 h, dilué par 40 ml d'éthanol à 80%, essoré, lavé 4 fois avec le même solvant (40 ml en tout) puis séché au vide poussé une nuit à 45° . On obtient 7,58 g (73%) de O, N-di-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. $211-214^{\circ}$. $[\alpha]_D^{25} = -28^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 2,2$; diméthylformamide). Spectre UV.: $\lambda_{\text{max}} = 268 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 2,83$). $\text{Rf}_M^A = 0,66$; $\text{Rf}_P^A = 0,6$; $\text{Rf}_A^A = 0,65$; $\text{E}_{1,9}^A = 0,6$ Try (révélation par ninhydrine, FOLIN, chlore).

$\text{C}_{64}\text{H}_{82}\text{O}_{15}\text{N}_{11}\text{S}$	Calc. C 60,1	H 6,5	O 18,8	N 12,1	S 2,5%
(1278,5)	Tr. „ 60,5	„ 6,6	„ 19,1	„ 12,0	„ 2,2%

N-Méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XXV). Dans 100 ml d'une solution 4,4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, on introduit 7,35 g (5,75 mmoles) d'octapeptide protégé XXIV finement pulvérisé. La dissolution est totale après $1/2$ h. On laisse reposer encore 45 min, puis fait couler la solution dans 1,2 l d'éther sec vigoureusement agité. Le précipité est séparé par filtration, lavé abondamment par de l'éther anhydre et séché au vide sur KOH. La substance (7,8 g) est dissoute dans 100 ml de méthanol à 95%, portée à 35° et passée rapidement à travers une colonne contenant 100 ml d'Amberlite IRA 410 (forme basique) maintenue à la même température. Après lavage par 500 ml de méthanol à 95% et évaporation au vide à 25° des filtrats réunis, on obtient 4,96 g (84%) de N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. $238-241^{\circ}$ (déc.), utilisé pour l'essai de condensation avec le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de p-nitrophényle. Pour l'analyse, on recristallise 2 fois dans 100 volumes de méthanol à 95% bouillant (le rendement de chaque recristallisation est de 50–60%), ce qui élève le F. à $255-257^{\circ}$ (déc.). Soluble dans l'acide acétique, peu soluble dans le diméthylformamide froid. $[\alpha]_D^{25} = -66^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1,9$; acide acétique). Spectre UV.: $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,29$); $287 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,20$). $\text{Rf}_M^A = 0,66$; $\text{Rf}_P^A = 0,6$; $\text{Rf}_A^A = 0,65$; $\text{E}_{1,9}^A = 0,6$ Try (révélation par ninhydrine, FOLIN, chlore).

$\text{C}_{48}\text{H}_{71}\text{O}_{11}\text{N}_{11}\text{S}$	(1010,2)	Calc. C 57,1	H 7,1	O 17,4	N 15,3	S 3,2%
$\text{C}_{48}\text{H}_{71}\text{O}_{11}\text{N}_{11}\text{S} \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	(1028,2)	Calc. „ 56,1	„ 7,2	„ 18,7	„ 15,0	„ 3,1%
		Tr. „ 56,3	„ 7,3	„ 18,6	„ 15,0	„ 3,3%

Réaction de l'octapeptide XXV avec le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de p-nitrophényle. Dans 50 ml de diméthylformamide on dissout, à 50° environ, 4,34 g (4,23 mmoles) d'octapeptide XXV et, après refroidissement à 30° , 2,36 g (5,06 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de p-nitrophényle¹³). Après 20 h d'agitation à température ordinaire on ajoute à la solution, filtrée d'un léger trouble, 400 ml d'acétate d'éthyle, sépare par centrifugation le gel formé puis le lave plu-

sieurs fois par suspension dans l'acétate d'éthyle suivie de centrifugation. Le culot est séché à 40° au vide poussé, puis dissous dans 15 ml d'acide acétique et additionné de 30 ml d'eau, ce qui provoque la lente prise en gel de la solution. Après 2 h à 25° on essore, lave avec 25 ml de mélange acide acétique/eau (1:2) et sèche à 40° au vide poussé. On obtient ainsi 2,70 g d'un produit de F. 211–214°. $[\alpha]_D^{22} = -44^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide). Spectre UV.: $\lambda_{\max} = 269 \text{ m}\mu$ ($\log \varepsilon = 3,21$). $Rf_M^a = 0,7$; $Rf_B^a = 0,43$; $Rf_A^a = 0,7$; $E_{1,9}^a = 0,94$ Try (révélation par FOLIN, ninhydrine).

$C_{66}H_{88}O_{14}N_{12}S_2 \cdot 3H_2O$	Calc.	C 57,0	H 6,8	O 19,5	N 12,1	S 4,6%
(1391,6)	Tr.	„ 57,5	„ 6,7	„ 19,5	„ 12,4	„ 4,8%

Lors d'un autre essai, le produit préparé comme indiqué ci-dessus a été purifié par dissolution dans le diméthylformamide suivie de précipitation par addition de 10 volumes d'acide acétique 1N (au lieu de dissolution dans l'acide acétique – précipitation par 2 volumes d'eau). Le produit, de F. 203–209° a donné l'analyse suivante:

$C_{66}H_{88}O_{14}N_{12}S_2$	Calc.	C 59,3	H 6,7	O 16,7	N 12,6	S 4,8%
(1337,6)	Tr.	„ 59,1	„ 6,9	„ 17,2	„ 12,3	„ 4,9%

O-Tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XXVI). Dans 2 ml de diméthylformamide on dissout successivement 208 mg (0,25 mmole) de L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide¹³ et 309 mg (0,45 mmole) de O-tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosinate de p-nitrophényle (X), et laisse reposer 2 jours à 25°. La solution limpide est ensuite additionnée d'un grand volume d'acétate d'éthyle. On sépare par centrifugation le précipité formé et le lave à l'acétate d'éthyle plusieurs fois (par suspensions suivies de centrifugations). Après séchage à l'air, le produit (217 mg) est dissous dans 2 ml d'éthanol à 80% bouillant, filtré à chaud et laissé une nuit à la glacière. Le précipité est essoré, lavé avec peu d'éthanol à 80% glacé, et séché au vide poussé 1 h à 50°. On obtient ainsi 180 mg (55%) de O-tosyl-N-CBO-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 190–200°. $[\alpha]_D^{22} = -63^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,8$; acide acétique à 95%). $Rf_M^a = 0,87$; $Rf_B^a = 0,9$; $Rf_A^a = 0,83$; $E_{1,9}^a = 0,5$ Try (révélation par chlore, ninhydrine).

$C_{63}H_{83}O_{15}N_{11}S_2$	Calc.	C 58,3	H 6,4	N 11,9	S 4,9%
(1298,5)	Tr.	„ 58,1	„ 6,4	„ 11,7	„ 4,9%

O-Tosyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XXVII). On dissout dans 0,5 ml d'acide acétique 92 mg (0,071 mmole) d'octapeptide protégé XXVI, ajoute 0,5 ml d'une solution 3,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique et laisse reposer 3/4 h à température ordinaire. Après une brève concentration au vide à 25°, on précipite le produit par addition de 20 volumes d'éther sec, centrifuge, lave plusieurs fois à l'éther par suspensions suivies de centrifugations, dissout le culot dans 3 ml de méthanol et passe la solution sur une colonne contenant 7 ml d'Amberlite IRA 410 (forme basique) maintenue à 35°, lave avec 30 ml de méthanol, évapore le filtrat au vide puis sèche à 25° au vide poussé. On obtient 83 mg (100%) de O-tosyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 204–210°. Pour l'analyse, un échantillon est séché au vide poussé 2 h à 80°. $[\alpha]_D^{22} = -50^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,96$; acide acétique à 95%). $Rf_M^a = 0,87$; $Rf_B^a = 0,9$; $Rf_A^a = 0,83$; $E_{1,9}^a = 0,5$ Try (révélation par chlore, ninhydrine).

$C_{55}H_{77}O_{13}N_{11}S_2$ (1164,4)	Calc.	O 17,9	N 13,2	S 5,5%	Tr.	O 17,9	N 13,1	S 5,6%
--	-------	--------	--------	--------	-----	--------	--------	--------

Ayant mis à réagir cet octapeptide XXVII avec un fort excès de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de p-nitrophényle, 16 h à 35° dans le diméthylformamide, on a récupéré, la majeure partie du produit de départ.

G. Nonapeptides

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XXVIII). Dans un mélange de 0,30 ml d'eau et de 2,70 ml de tétrahydrofurane débarrassé de peroxydes par passage sur de l'alumine, on dissout successivement, sous courant d'azote, 430 mg (0,60 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginy-L-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide¹⁸ et 382 mg (0,60 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucine (XXIIIa), puis, après refroidissement à 0°, 234 mg

(1,13 mmole) de dicyclohexyl-carbodiimide. Après un repos de 5 h à 0°, tout est pris en masse. On secoue encore une nuit à 20°, suspend le mélange de réaction dans 30 ml d'acétate d'éthyle, sépare l'insoluble par centrifugation et le dissout pour la plus grande partie en le secouant dans un mélange, 4 fois renouvelé, de chloroforme et de HCl 1 N. Les solutions chloroformiques réunies (100 ml environ) sont lavées par HCl 1 N, NaHCO₃ 1 N, séchées rapidement sur Na₂SO₄ puis évaporées au vide à 30°, laissant 0,46 g d'un solide blanc qu'on dissout partiellement dans 2 ml de pyridine. Après une nuit à -15°, l'insoluble, constitué par de la dicyclohexylurée (69 mg, F. 232–233°), est séparé par filtration et le filtrat est évaporé au vide à 30°. Le résidu est extrait 7 fois par 4 ml de benzène bouillant. L'insoluble est séché au vide poussé, fournissant 0,21 g (25%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-N-méthyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 140° environ (la substance suinte dès 120°). Soluble dans le méthanol, le diméthylformamide, l'acide acétique. $[\alpha]_D^{21} = -64^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,7$; diméthylformamide); $-83^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,6$; méthanol). $Rf_M^a = 0,98$; $Rf_P^a = 0,8$; $Rf_A^a = 0,88$; $E_{1,9}^a = 0,5$ Try (révélation par ninhydrine, FOLIN, chlore). Spectre UV.: $\lambda_{max} = 280 m\mu$ ($\log \epsilon = 3,29$); $287 m\mu$ ($\log \epsilon = 3,20$).

C ₆₆ H ₈₈ O ₁₄ N ₁₂ S ₂	(1337,6)	Calc. C 59,3	H 6,7	O 16,7	N 12,6	S 4,8%
C ₆₆ H ₈₈ O ₁₄ N ₁₂ S ₂ · 3H ₂ O	(1391,6)	Calc. „ 57,0	„ 6,8	„ 19,5	„ 12,1	„ 4,6%
		Tr. „ 57,0	„ 6,7	„ 19,4	„ 11,4	„ 4,8%

(N-Méthyl-Tyr)²-Oxytocine (XXIX). On dissout 46 mg (0,033 mmole) du nonapeptide protégé XXVIII dans 50 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et, sous agitation, on ajoute lentement du sodium jusqu'à apparition d'une coloration bleue. Après adjonction de 0,05 ml d'acide acétique, on évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 40 ml d'acide acétique 0,01 N, ajuste le pH à 8,2 et fait passer un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. On acidifie à pH 4,5, concentre à 20 ml au vide à 25°, équilibre la solution avec du sec-butanol et introduit le mélange dans le premier tube d'un appareil de distribution à contre-courant. Après 260 transferts dans le système sec-butanol/acide acétique 0,017 N, on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes⁴²). On obtient un sommet principal $K = 0,41$ et un sommet secondaire $K = 0,19$. Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré au vide à 25°. Le produit obtenu, qui représente les 3/4 de la quantité introduite dans l'appareil, est homogène à l'électrophorèse ($E_{1,9}^0 = 0,5$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,4$ His; révélation par ninhydrine, FOLIN, chlore). L'hydrolyse acide (HCl 6 N; 16 h à 110°) donne les acides aminés constituants dans les rapports attendus.

SUMMARY

Different methods have been investigated for the preparation of N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-N-methyl-L-tyrosyl-L-isoleucine. Condensation of this protected tripeptide with L-glutaminyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide affords N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-N-methyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide. Cleavage of the protecting groups of the resulting nonapeptide with sodium in liquid ammonia, oxidation with air in dilute aqueous solution and purification by counter-current distribution gives the desired cyclic nonapeptide amide: (N-methyl-Tyr)²-oxytocin. This exhibits less than one per cent of the oxytocic potency of oxytocin.

Laboratoires de chimie pharmaceutique SANDOZ, Bâle

⁴²) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).