

85. Synthèse de la Val⁵-D-Phe⁸-angiotensine-I et nouvelle synthèse de la Val⁵-angiotensine-I¹⁾²⁾

par St. Guttman

(28 II 61)

Il a été montré³⁾⁴⁾ qu'une substance peptidique, provoquant l'hypertension, est libérée sous l'action de la rénine à partir d'une fraction du plasma appelée angiotensinogène (tabl. 1). Cette substance de nature peptidique, nommée angiotensine-I, a été isolée à partir du plasma de cheval⁵⁾ et à partir du plasma de bœuf⁶⁾. L'étude de sa structure a montré que l'angiotensine de cheval⁷⁾ se distingue de celle de bœuf⁸⁾ par la présence en position 5 d'un reste isoleucyle au lieu d'un reste valyle.

D'après SKEGGS et coll.⁹⁾ et HELMER¹⁰⁾, la substance provoquant l'hypertension ne serait pas le décapeptide lui-même, l'angiotensine-I, mais un octapeptide, l'angiotensine-II, qui prendrait naissance à partir de ce décapeptide sous l'effet d'une peptidase spécifique, que les auteurs nommèrent «Converting Enzyme». L'action du «Converting Enzyme» sur le décapeptide est illustré par le tableau 1.

Le «Converting Enzyme» est présent dans presque tous les organes du corps et est très fortement activé par les ions Cl⁻. L'angiotensine-I apparaît donc *in vivo* comme une substance possédant le même degré d'activité que l'angiotensine-II. La différence d'activité entre les deux angiotensines ne peut être perçue qu'au moyen de mesures sur certains organes isolés et spécialement traités⁹⁾¹⁰⁾.

Alors que l'angiotensine-I de cheval (Ileu⁵-angiotensine-I)⁷⁾ et de bœuf (Val⁵-angiotensine-I)⁸⁾ ont toutes deux été isolées, seule l'angiotensine-II de cheval (Ileu⁵-angiotensine-II)⁷⁾ a pu être isolée jusqu'ici. La synthèse de l'Ileu⁵-angiotensine-II a été effectuée par SCHWARZ et coll.¹¹⁾ et par RITTEL et coll.¹²⁾, mais celle de l'Ileu⁵-

¹⁾ Nous employons la même nomenclature que R. SCHWYZER et coll. (Chimia 11, 335 (1957)) et P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS (Helv. 42, 788 (1959)).

²⁾ L'appellation d'angiotensine est le compromis généralement admis entre les dénominations angiotonine et hypertensine (E. BRAUN-MENENDEZ & I. H. PAGE, Science 127, 242 (1958)).

³⁾ E. BRAUN-MENENDEZ, J. C. FASCILO, L. F. LELOIR & J. M. MUNOZ, J. Physiol. 98, 283 (1940); Science 98, 495 (1943).

⁴⁾ I. H. PAGE, O. M. HELMER, A. A. PLENTL, K. G. KOHLSTAEDT & A. C. CORCORAN, Science 98, 153 (1943); K. G. KOHLSTAEDT, I. H. PAGE & O. M. HELMER, Amer. Heart J. 79, 92 (1940).

⁵⁾ L. T. SKEGGS, W. H. MARSH, R. J. KAHN & N. P. SHUMWAY, J. exp. Medicine 100, 363 (1954); 102, 433 (1955).

⁶⁾ W. S. PEART, Biochem. J. 60, VI (1955); 62, 520 (1956).

⁷⁾ K. E. LENZ, L. T. SKEGGS, K. R. WOOD, J. R. KAHN & N. P. SHUMWAY, J. exp. Medicine 183, 193 (1956).

⁸⁾ D. F. ELLIOTT & W. S. PEART, Nature 177, 527 (1956); Biochem. J. 65, 246 (1957).

⁹⁾ L. T. SKEGGS, W. H. MARSH, J. R. KAHN & N. P. SHUMWAY, J. exp. Medicine 99, 275 (1954); 103, 295 (1956).

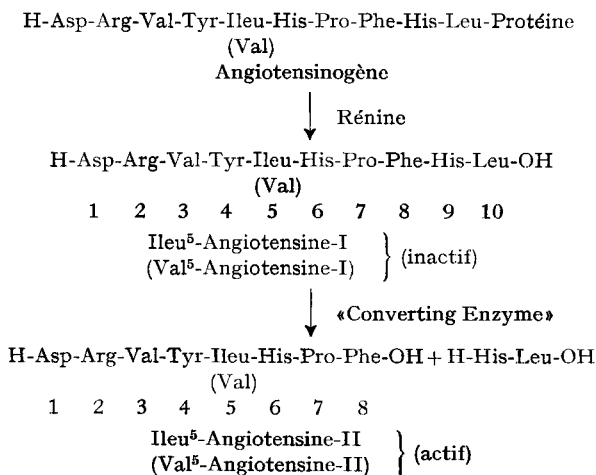
¹⁰⁾ O. M. HELMER, Feder. Proc. 14, 225 (Abstracts, 728) (1955); Amer. J. Physiol. 188, 571 (1957).

¹¹⁾ H. SCHWARZ, F. M. BUMPUS & H. I. PAGE, J. Amer. chem. Soc. 79, 5697 (1957).

¹²⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, Helv. 41, 1274, 1287 (1958), Chimia 11, 335 (1957); W. RITTEL, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER & R. SCHWYZER, Angew. Chem. 69, 179 (1957); Helv. 40, 614 (1957).

angiotensine-I n'a pas encore été réalisée. La Val⁵-angiotensine-I, la Val⁵-angiotensine-II et une quinzaine de leurs analogues ont été synthétisés par SCHWYZER et coll¹²). Dernièrement, la synthèse de quelques analogues de l'Ileu⁵-angiotensine-II a été mentionnée¹³).

Tableau 1



En 1959, ELLIOTT¹⁴) a annoncé une nouvelle synthèse de la Val⁵-angiotensine-I, mais le produit obtenu n'a montré qu'environ 1% de l'activité du produit naturel. Il est apparu qu'au cours de la synthèse, il s'était produit une racémisation presque totale de la phénylalanine en position 8. On devrait donc s'attendre normalement à ce que le produit obtenu possédât au moins 50% de l'activité du produit naturel et non pas seulement 1%. Pour expliquer ce résultat inattendu, ELLIOTT a émis deux hypothèses. Selon la première, le racémate obtenu au cours de la synthèse se serait enrichi, au cours des purifications, en isomère contenant la D-phénylalanine, ce qui fait qu'il n'aurait finalement obtenu que le produit possédant la D-phénylalanine en position 8, les neuf autres acides aminés ayant gardé leur configuration L. Selon la seconde hypothèse, le produit final obtenu contiendrait autant d'isomère L que de D, et il faudrait alors admettre que l'isomère D soit un antagoniste de l'angiotensine-I de forme naturelle et inhibe l'action du «Converting Enzyme», en l'empêchant de transformer l'angiotensine-I inactive en angiotensine-II active. Comme cette dernière hypothèse aurait une importance pratique considérable si elle se révélait exacte, nous avons décidé, pour la vérifier, d'entreprendre la synthèse de l'isomère D lui-même, c'est-à-dire de la Val⁵-D-Phe⁸-angiotensine-I.

Afin d'éviter toute équivoque quant à la pureté optique du produit obtenu, nous sommes proposé d'effectuer cette synthèse selon un schéma excluant tout risque de racémisation. Il fut nécessaire pour cela d'établir un nouveau schéma de synthèse, car les synthèses d'angiotensines et de leurs analogues¹¹)¹²) décrites jusqu'ici

¹³) R. S. SMEBY, P. A. KHAIRALLAH, F. M. BUMPUS & I. H. PAGE, Congress Amer. chem. Soc., Divis. biol. Chemistry 1960, Abstr., 227.

¹⁴) D. F. ELLIOTT, Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels (Proc. of Symposium held in London on 23 & 24 March 1959), p. 99, Pergamon Press 1960.

Tableau 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Asp L	Arg L	Val L	Tyr L	Val L	His L	Pro L	Phe D	His L	Leu L
			CBO-NHNH-CTB XIV ou CBO						
			CBO-NHNH-CTB XV						
		CBO-ONP ²⁵	H-NHNH-CTB XVI						
		CBO	NHNH-CTB XVII						
	CBO-OH ³³	H	NHNH-CTB XVIII				CBO-OH ¹⁷	H	OBzN ¹⁸
OBz CBO-OH ³⁴ ou OBz	CBO		XIX				CBO		OBzN
OBz CBO-ONP XXI OBz	H		XX			OH	H		OBzN
						XI			I
CBO	XXII		NHNH-CTB CBO						OBzN
							XII		
OBz CBO	XXIII		NHNH ₂	H			XIII		OBzN
									OBzN
CBO					XXIV				OBzN
					XXV				OH
H									
Asp L	Arg L	Val L	Tyr L	Val L	His L	Pro L	Phe D	His L	Leu L

Abbreviations: CBO = carbobenzoxy; CTB = tert.-butoxycarbonyl; NP = p-nitrophényl; BzN = p-nitrobenzyle; Me = méthyle; Bz = benzyle

n'excluaient pas une certaine possibilité de racémisation¹⁵⁾ dans plusieurs positions. Dans notre nouveau schéma (Tabl. 2, 3, et 4), les peptides intermédiaires sont construits par addition successive de N-CBO-acides aminés puis condensés entre eux, soit au niveau de la proline par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide¹⁹⁾, soit au niveau de la tyrosine par la méthode à l'azide. Selon les normes actuellement admises en chimie peptidique¹⁶⁾, cette manière de faire doit en effet supprimer tout risque de racémisation. A titre de vérification, nous avons en outre effectué, par le même schéma, la synthèse de la Val⁵-angiotensine-I dont nous avons mesuré l'activité biologique. En outre nous avons contrôlé par dégradation enzymatique l'homogénéité optique des produits intermédiaires et finals obtenus dans la synthèse de ces deux angiotensines.

Tableau 3

5	6	7
Val	His	Pro
L	L	L
		CBO—NHNH—CTB III
CBO—	NHNH ₂ ²⁰⁾	H—NHNH—CTB IV
CBO—	V	NHNH—CTB
CBO—	VI	NHNH ₂
CBO—	NHNH ₂ ²⁰⁾	H—OMe VII
CBO—	VIII	OMe
	CBO—NHNH ₂ ²²⁾	H—OMe VII
	CBO—IX	OMe
CBO—OH ²³⁾	H—X	OMe
ou CBO—ONP ²⁵⁾		
CBO—	VIII	OMe
CBO—	XI	OH
Val	His	Pro

¹⁵⁾ H. SCHWARZ & F. M. BUMPUS, J. Amer. chem. Soc. 81, 890 (1959).

¹⁶⁾ G. T. YOUNG, Proc. Symposium on Methods of Peptide Synthesis, Prague 1958 (Coll. Czechoslov. chem. Commun. 24, 39 (1959), Special issue); J. chem. Soc. 1960, 3902.

Val⁶-D-Phe⁸-Angiotensine-I

La N-CBO-D-phénylalanine¹⁷⁾ a été condensée avec le L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle¹⁸⁾ au moyen du dicyclohexyl-carbodiimide¹⁹⁾ en N-CBO-D-phénylalananyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (I) (rdt 94 %). Celui-ci, après scission sélective du groupe CBO- par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique glacial¹⁸⁾, a donné le dibromhydrate de D-phénylalananyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (II) (rdt 94 %). Le tripeptide central, la N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-proline (XI), a été synthétisé par deux voies différentes (Tabl. 3). Selon la première, le N-CBO-L-valyl-L-histidyl-hydrazide²⁰⁾ a été converti en azide correspondant et condensé avec le L-prolinate de méthyle (VII-A) (obtenu par estérification de la L-proline à l'aide de chlorure de thionyle²¹⁾). Le N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-prolinate de méthyle (VIII) résultant (rdt 70 %) a été saponifié et la N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-proline (XI) a été libérée de son sel sodique par passage sur un échangeur d'ion légèrement acide (rdt 71 %). Selon la deuxième voie, le N-CBO-L-histidylazide²²⁾ a été condensé avec le L-prolinate de méthyle (VII-A) et a donné le N-CBO-L-histidyl-L-prolinate de méthyle (IX) (rdt 60 %), qui, après scission de son groupe CBO- par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique glacial, a fourni le dibromhydrate de L-histidyl-L-prolinate de méthyle (X) (rdt 97 %). Celui-ci a été condensé, soit avec la N-CBO-L-valine²³⁾ par la méthode à l'anhydride mixte²⁴⁾ ou au dicyclohexyl-carbodiimide¹⁹⁾, soit avec le N-CBO-L-valinate de p-nitrophényle²⁵⁾, et a donné le même ester tripeptidique VIII (rdts resp. 49 %, 48 % et 48 %) que celui obtenu par la première voie. Nous n'avons pu transformer qu'avec un mauvais rendement l'ester tripeptidique VIII en hydrazide correspondant VI. SKEGGS et coll.²⁶⁾ ont d'ailleurs rencontré la même difficulté au cours de la synthèse du N-CBO-L-histidyl-L-prolyl-hydrazide. Nous avons pu tourner cette difficulté en introduisant la fonction hydrazide sous forme protégée²⁷⁾. La N-CBO-L-proline²³⁾²⁸⁾ a été condensée par la méthode à l'anhydride mixte²⁴⁾ avec le carbazate de tert.-butyle²⁹⁾ en (N-CBO-L-prolyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (III) (rdt 89 %). Le groupe CBO- a été enlevé par hydrogénation catalytique et le L-prolyl-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (IV) formé (rdt 86 %) a été condensé avec le N-CBO-L-valyl-L-histidylazide (obtenu à partir de l'hydrazide correspondant²⁵⁾) en (N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (V)

¹⁷⁾ C. S. SMITH & A. E. BROWN, J. Amer. chem. Soc. **63**, 2605 (1941).

¹⁸⁾ H. SCHWARZ & K. ARAKAWA, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5691 (1959).

¹⁹⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1957).

²⁰⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, *Helv.* **41**, 1287 (1958).

²¹⁾ M. BRENNER & W. HUBER, *Helv.* **36**, 1114 (1953).

²²⁾ R. W. HOLLEY & E. SONDHEIMER, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1326 (1954).

²³⁾ W. GRASSMANN & E. WÜNSCH, *Chem. Ber.* **91**, 462 (1958).

²⁴⁾ R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **34**, 874 (1951); TH. WIELAND & H. BERNHARD, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 (1951); J. R. VAUGHAN & R. L. OSATO, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3547 (1951); **74**, 676 (1952).

²⁵⁾ B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, *Helv.* **40**, 373 (1957).

²⁶⁾ L. T. SKEGGS, K. E. LENZ, J. R. KAHN & N. P. SHUMWAY, J. exp. Medicine **108**, 283 (1958).

²⁷⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN & P.-A. JAQUENOUD, *Helv.* **43**, 1349 (1960).

²⁸⁾ A. BERGER, O. KURTZ & E. KATSCHALSKY, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5552 (1954).

²⁹⁾ L. A. CARPINO, J. Amer. chem. Soc. **79**, 98 (1957).

(rdt 70 %). La scission sélective du groupe tert.-butoxycarbonyl, au moyen du gaz chlorhydrique dans le dioxanne, a fourni le dichlorhydrate de N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-hydrazide (VI) (rdt 97 %).

Par condensation de l'acide tripeptidique XI avec l'ester tripeptidique II au moyen du dicyclohexyl-carbodiimide¹⁹⁾, nous avons obtenu le N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XII) (rdt 81 %). La scission du groupe CBO- de cet hexapeptide par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique glacial ne se déroule pas d'une manière aussi sélective que dans le cas du tripeptide I. En effet, la fonction ester p-nitrobenzylique est également partiellement scindée et l'ester hexapeptidique XIII obtenu est contaminé par un peu d'acide hexapeptidique correspondant. Ce dernier a pu néanmoins être éliminé par un lavage au K₂CO₃, et le L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XIII) a quand même finalement pu être obtenu, à partir du CBO-hexapeptide, avec un rendement de 80 %.

La condensation des séquences 1-4 et 5-10 a été réalisée par la méthode à l'azide afin d'éviter tout risque de racémisation de la tyrosine en position 4. Ici également, nous avons eu recours à la méthode à l'hydrazide protégé par le groupe tert.-butoxycarbonyl²⁷⁾. En effet, la présence du groupe O-Bz sur l'acide aspartique, en position 1, excluait l'introduction ultérieure de la fonction hydrazide par les voies classiques. Le L-tyrosyl-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XVI) a été obtenu par différentes méthodes. La N-CBO-L-tyrosine³⁰⁾ a été condensée avec le carbazate de tert.-butyle²⁹⁾, par la méthode à l'anhydride mixte²⁴⁾, en (N-CBO-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XIV) (rdt 75 %). Les méthodes à l'ester activé³¹⁾ ou au dicyclohexyl-carbodiimide¹⁹⁾ ont donné des rendements plus faibles et le produit obtenu s'est révélé difficilement purifiable. L'hydrogénation catalytique du (N-CBO-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XIV) a fourni le L-tyrosyl-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XVI) désiré (rdt 93 %). Par condensation de la O,N-diCBO-L-tyrosine³²⁾ avec le carbazate de tert.-butyle²⁹⁾ par la méthode à l'anhydride mixte²⁴⁾, nous avons obtenu le (O,N-diCBO-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XV) (rdt 61 %) qui, après hydrogénéolyse de ses groupes protecteurs CBO-, a fourni le même L-tyrosyl-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XVI) (rdt 80 %). Celui-ci a été condensé avec le N-CBO-L-valinate de p-nitrophényle²⁵⁾ en (N-CBO-L-valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XVII) (rdt 81 %). Par scission hydrogénéolytique du groupe CBO- de ce dernier, nous avons obtenu le (L-valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XVIII) (rdt 91 %) qui, par condensation avec le bromhydrate de N-CBO-L-arginine³³⁾ au moyen du dicyclohexyl-carbodiimide¹⁹⁾, a fourni le (N-CBO-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XIX) (rdt 71 %). Celui-ci a été transformé, par hydrogénation catalytique, en (L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XX) (rdt 90 %), puis converti quantitativement en monochlorhydrate correspondant. Ce dernier a été

³⁰⁾ M. BERGMANN & L. ZERVAS, Ber. deutsch. chem. Ges. 67, 785 (1932).

³¹⁾ M. BODANSZKY, Nature 175, 685 (1955); Acta chim. Acad. Sci. hung. 9, 335 (1956).

³²⁾ E. KATSCHALSKY & M. SELA, J. Amer. chem. Soc. 75, 5284 (1953).

³³⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, R. L. HUGUENIN, P.-A. JAQUENOUD & ED. SANDRIN, Helv. 41, 1868 (1958).

condensé avec le N-CBO-L- β -aspartate de benzyle³⁴⁾ au moyen du dicyclohexyl-carbodiimide en (N-CBO- β -O-benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XXII) (rdt 71 %). Nous avons également essayé la méthode à l'ester activé³¹⁾, en condensant le N-CBO- β -O-benzyl-L-aspartate de p-nitrophényle (XXI) avec le tripeptide XX, mais le rendement a été beaucoup plus bas (43 %) que par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide. Lors de la synthèse du tétra-peptide XXII, tant dans les opérations de condensation que dans celles de purification, il est très important que le groupe guanido de l'arginine soit constamment salifié. Si tel n'est pas le cas, le groupe O-benzylester du tétra-peptide subit une transformation, fournissant un produit que nous n'avons pas encore pu identifier³⁵⁾. En ayant soin de maintenir le pH au-dessous de 7,5, cette transformation du tétra-peptide peut entièrement être évitée. La scission sélective du groupe tert.-butoxycarbonyl du tétra-peptide XXII, au moyen du gaz chlorhydrique dans le dioxanne anhydre, conduit au dichlorhydrate de N-CBO- β -O-benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-hydrazide (XXIII) (rdt 91 %). Celui-ci a été transformé en azide correspondant puis condensé avec l'ester hexapeptidique XIII en chlorhydrate de N-CBO- β -O-benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XXIV) qui, après deux recristallisations seulement, s'est montré analytiquement pur (rdt 46 %).

Les groupes protecteurs de ce décapeptide ont été éliminés en une seule opération par hydrogénation catalytique. Nous avons utilisé comme solvant le tert.-butanol, ainsi que RYDON et coll.³⁶⁾ l'ont préconisé, afin d'éviter une éventuelle transestérification. Le produit brut de scission a été purifié par contre-courant, et la L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucine (XXV) obtenue (rdt 62 %) s'est montrée homogène à la chromatographie sur papier dans trois systèmes de solvants, à la chromatographie en couche mince dans deux systèmes et à l'électrophorèse sur papier à six pH différents, étagés de 1,9 à 10,0. Son point isoélectrique se situe à $7,5 \pm 0,2$. L'hydrolyse acide totale a donné les acides aminés composants dans les rapports attendus. Son comportement envers la chymotrypsine, la carboxypeptidase et la trypsine sera décrit plus loin.

Les activités biologiques de notre Val⁵-D-Phe⁸-angiotensine-I (XXV) ont été déterminées par le Prof. KONZETT et le Dr. STÜRMER³⁷⁾. Sur la pression sanguine du Rat, elle a montré une activité égale à environ 1/100 de celle du Val⁵-hypertensine-II-Asp- β -amide CIBA et à $1/10$ de celle de la L-noradrénaline. Aucune activité inhibitrice ou antagoniste envers la Ileu⁵-angiotensine-I naturelle³⁸⁾ ou envers notre Val⁵-angiotensine-I synthétique n'a pu être mise en évidence.

³⁴⁾ P. M. BRYANT, R. H. MOORE, P. J. PIMLOTT & G. T. YOUNG, *J. chem. Soc.* 1959, 3868.

³⁵⁾ La mobilité électrophorétique de ce produit secondaire est, au pH 1,9, inférieure à celle du tétra-peptide XXII, tandis qu'au pH 5,8 elle lui est identique. La coloration obtenue par révélation à la ninhydrine/Cu⁺⁺ est rouge brun, alors que celle du tétra-peptide XXII est rouge. Le spectre IR. indique une disparition de la fonction ester dans le produit secondaire mais ne permet pas de conclure à l'apparition d'une fonction imide cyclique, ou à celle d'un groupe carboxyle libre.

³⁶⁾ P. C. CROFTS, J. H. H. MARKES & H. N. RYDON, *J. chem. Soc.* 1959 3610.

³⁷⁾ Département pharmacologique SANDOZ (Dir.: Dr. A. CERLETTI), Bâle.

³⁸⁾ Nous remercions vivement le Dr F. M. BUMPUS (Cleveland, USA) qui a bien voulu mettre à notre disposition un échantillon de Ileu⁵-angiotensine-I.

Val⁵-Angiotensine-I

La condensation du L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle¹⁸⁾ avec la N-CBO-L-phénylalanine²³⁾ en présence du dicyclohexyl-carbodiimide¹⁹⁾ ou avec le N-CBO-L-phénylalaninate de p-nitrophényle³⁹⁾ a fourni le N-CBO-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XXVI) (rdt resp. 82 % et 72 %). Par scission sélective du

Tableau 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Asp	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Phe	His	Leu
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
							CBO- ^{OH} ²³⁾		
							ou	H	OBzN ¹⁸⁾
							CBO- ^{ONP} ³⁹⁾		
							CBO-		OBzN
								XXVI	
				CBO-	XI	OH			
						ou	H		OBzN
				CBO-	VI	NHNH ₂		XXVII	
				CBO-					OBzN
						XXVIII			
CBO- ^{OBz}			NHNH ₂ H						OBzN
	XXIII					XXIX			
CBO- ^{OBz}									OBzN
				XXX					
H				XXXI					OH
Asp	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Phe	His	Leu

groupe CBO- de ce dernier par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique, nous avons obtenu le dibromhydrate de L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XXVII) (rdt 95 %). Celui-ci a été condensé, au moyen du dicyclohexyl-carbodiimide, avec l'acide tripeptidique XI en N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XXVIII) (rdt 65 %). Nous avons également obtenu cet hexapeptide par condensation du N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-prolylazide (préparé à partir de l'hydrazide tripeptidique VI) avec l'ester tripeptidique XXVII, mais, dans ce cas, le produit, obtenu dans un état de pureté moins satisfaisant que dans le cas précédent, doit être soumis à une purification très poussée abaissant le rendement à 31 %. L'éloignement du groupe CBO- de l'hexapeptide XXVIII par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique, a fourni le L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XXIX) (rdt. 94 %). Il est intéressant de constater que la scission du groupe CBO- s'effectue d'une manière beaucoup plus sélective que dans le cas de l'isomère optique contenant la D-phénylalanine. L'ester hexapeptidique XXIX obtenu a été condensé avec le chlorhydrate de N-

³⁹⁾ M. GOODMAN & K. C. STUEBEN, J. Amer. chem. Soc. 81, 3980 (1959).

CBO- β -O-benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-azide (préparé à partir de l'hydrazide tétrapeptidique XXIII correspondant) en N-CBO- β -O-benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XXX) (rdt 56 %, après purification par contre-courant).

La scission des groupes protecteurs a été effectuée en une seule opération par hydrogénation catalytique. La L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucine (XXXI) ainsi obtenue (rdt 89 %) s'est montrée homogène, sans autre purification, à la chromatographie sur papier dans trois systèmes, à la chromatographie en couche mince dans deux systèmes, à la répartition à contre-courant et à l'électrophorèse sur papier à six pH étagés de 1,9 à 10,0. Le point isoélectrique est de $7,5 \pm 0,2$. L'hydrolyse acide totale a donné les acides aminés composants dans les rapports attendus. Le comportement envers les enzymes protéolytiques est décrit ci-dessous.

Les activités biologiques ont été déterminées par le Dr E. STÜRMER³⁷). Par rapport au Val⁵-hypertensine-II-Asp- β -amide CIBA, notre Val⁵-angiotensine-I (XXXI) a montré, sur une base molaire, une activité de 110 % sur la pression sanguine du Rat, et de 120 % sur l'iléum isolé du Cobaye.

Attaques enzymatiques

Les deux décapeptides XXV et XXXI ainsi que les deux hexapeptides libres (obtenus par hydrogénéolyse des groupes protecteurs des hexapeptides protégés XII et XXVIII) ont été soumis à l'action de la carboxypeptidase et de la chymotrypsine. En outre, les deux décapeptides ont également été soumis à l'action de la trypsine⁴⁰). Dans chaque cas, les fragments finals obtenus ont été séparés par électrophorèse sur papier au pH 1,9, élués et hydrolysés, et leur contenu en acides aminés a été déterminé. Les résultats de ces attaques enzymatiques sont résumés dans le tableau 5.

L'hexapeptide L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucine n'est pas attaqué par la chymotrypsine, même après 24 h; par contre la carboxypeptidase libère très rapidement la totalité de la leucine, le peptide résiduel demeurant inchangé, même après une digestion prolongée; son hydrolyse totale fournit Val, His, Pro et Phe.

L'hexapeptide L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucine est très rapidement attaqué par la chymotrypsine et complètement scindé en deux fragments. L'un fournit, après hydrolyse totale, His et Leu, l'autre, Val, His, Pro et Phe. Il n'y a aucun autre peptide résiduel et une digestion prolongée n'amène pas de changement. La carboxypeptidase libère également très rapidement Leu, His et Phe. L'unique peptide résiduel demeure sans changement, même après une prolongation de l'attaque; hydrolyse totale montre qu'il ne contient que Val, His et Pro.

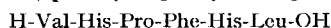
La Val⁵-D-Phe⁸-angiotensine-I (XXV) est scindée rapidement et complètement par la chymotrypsine en deux fragments. L'hydrolyse totale fournit pour l'un d'eux Val, His, Pro, Phe et Leu, et pour l'autre Asp, Arg, Val et Tyr. On ne peut déceler aucun autre peptide résiduel et une attaque prolongée ne provoque pas de changement. La carboxypeptidase donne très rapidement la totalité de la leucine et un peptide rési-

⁴⁰) Nous avons renoncé à l'interprétation de l'attaque par la leucinaminopeptidase, car la préparation d'enzyme que nous avons à disposition (Methods of Enzymology, Vol. II, p. 89, Academic Press 1955; stade 3) n'a pas montré toute la spécificité optique généralement admise pour cet enzyme.

duel demeurant inchangé, même après prolongation de l'attaque, et donnant par hydrolyse totale Asp, Arg, Val, Tyr, His, Pro et Phe. La trypsine transforme totalement le décapeptide en deux fragments seulement. L'hydrolyse du premier donne Asp et Arg et celle du second Val, Tyr, His, Pro, Phe et Leu.

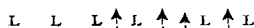
Tableau 5

Hexapeptide XII (après hydrogénéolyse des groupes protecteurs)



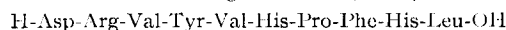
Carboxypeptidase

Hexapeptide XXVIII (après scission des groupes protecteurs)



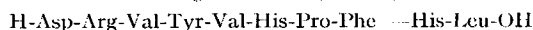
Chymotrypsine Carboxypeptidase

Val⁵-D-Phe⁸-angiotensine-I (XXV)



Trypsine Chymotrypsine Carboxypeptidase

Val⁵-angiotensine-I (XXXI)



Trypsine Chymo- trypsine Carboxypeptidase

La *Val⁵-angiotensine-I (XXXI)* est très rapidement et entièrement transformée par la chymotrypsine en trois fragments, fournissant respectivement, après hydrolyse, Asp, Val, Arg et Tyr; Val, His, Pro et Phe; His et Leu. La carboxypeptidase ne libère que Leu, His et Phe, même après une prolongation de l'attaque. Le peptide résiduel unique donne par hydrolyse Asp, Arg, Tyr, His, Val et Pro. La trypsine scinde complètement le décapeptide XXXI en deux fragments seulement. Après hydrolyse totale, le premier donne Asp et Arg, tandis que le second fournit Val, Tyr, His, Pro, Phe et Leu.

Conclusion

Le niveau d'activité biologique de notre *Val⁵-angiotensine-I*, ainsi que les résultats des attaques enzymatiques effectuées tant sur la *Val⁵-D-Phe⁸-angiotensine-I (XXV)* et sur la *Val⁵-angiotensine-I (XXXI)* que sur les deux hexapeptides XII et XXVIII, permettent de conclure que selon le schéma que nous avons utilisé, il ne s'est pas produit de racémisation au cours de la synthèse de ces peptides. Comme la *Val⁵-D-Phe⁸-angiotensine*, obtenue optiquement pure, ne s'est pas révélée être antagoniste de la *Val⁵-* ou *Ileu⁵-angiotensine-I*, la possibilité d'une action inhibitrice envers le «Converting Enzyme» doit donc être exclue.

Nous exprimons notre vive reconnaissance au Dr R. A. BOISSONNAS pour son intérêt et ses précieux conseils. Nous remercions également le Dr H. SCHWARZ pour une discussion générale du problème faisant l'objet de ce travail.

Partie expérimentale⁴¹⁾

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 CRAIG⁴²⁾.

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

Les électrophorèses sur papier ont été effectuées dans l'appareil à électrophorèse sous haute tension de WIELAND & PFLEIDERER⁴³⁾: 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, b et o ont la même signification que pour les chromatogrammes.

Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et phérogrammes ont été décrits précédemment⁴⁴⁾.

Val⁵-D-Phe⁸-Angiotensine-I

N-CBO-D-Phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (I). On dissout 6,60 g (22 mmoles) de N-CBO-D-phénylalanine¹⁷⁾ et 8,86 g (22 mmoles) de L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (voir préparation du tripeptide XXVI, p. 740) dans 150 ml d'acétonitrile, refroidit à -5° , ajoute 5,76 g (28 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite le tout 1 h à -5° et 24 h à 20° . On sépare la dicyclohexylurée (4,00 g) par filtration, évapore le filtrat à sec, triture le résidu dans l'éther de pétrole jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent, redissout dans 500 ml d'acétate d'éthyle, lave par H₂O et NaHCO₃ 1N puis NH₄OH 1N, sèche sur Na₂SO₄ et évapore à sec. On obtient 14,18 g (94%) de tripeptide analytiquement pur qu'on peut utiliser sans autre pour la suite de la synthèse. Pour le cristalliser, on le dissout dans 85 ml d'acétate d'éthyle bouillant, ajoute environ 70 ml d'éther de pétrole et garde la solution à 0° pendant 7–10 jours. Après séparation par filtration des cristaux formés, lavage avec un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole 1:2 et séchage, on obtient 12,2 g (81%) de N-CBO-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle de F. 124–127°. $[\alpha]_D^{25} = -20,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $+5,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$ diméthylformamide). Rf_M^a = 0,95; Rf_A^a = 0,90; Rf_P^a = 0,78. E_{5,8}^a = 0,9 His; E_{1,9}^a = 1,0 Glu (homogène à la ninhydrine, au réactif de PAULY et au chlore).

C ₃₆ H ₄₀ O ₈ N ₆	Calc.	C 63,1	H 5,9	O 18,7	N 12,3%
(684,7)	Tr.	„ 63,0	„ 6,0	„ 18,4	„ 12,3%

D-Phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle, 2HBr (II). A une solution de 6,85 g (10 mmoles) de N-CBO-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (I) dans 33 ml d'acide acétique on ajoute 42 ml d'une solution 3,6N de HBr dans l'acide acétique et laisse 20 min à 20° . On ajoute 300 ml d'éther anhydre, sépare par filtration le précipité formé et le dissout dans 100 ml d'isopropanol bouillant. Immédiatement après dissolution, la cristallisation commence et, même à chaud, on obtient une masse cristalline épaisse. Après 12 h à 0° , on filtre, lave par l'isopropanol, puis l'éther et l'éther de pétrole, et sèche. On obtient 6,71 g (93%) de dibromhydrate de D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle cristallin, non hygroscopique, de F. 166° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -31,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; méthanol); $-20,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthyl-

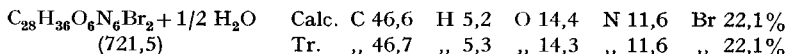
⁴¹⁾ Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr. W. SCHÖNIGER). Nous remercions de sa collaboration expérimentale dans la préparation des produits de départ M. E. FLÜCKIGER.

⁴²⁾ L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, *Analyt. Chemistry* 22, 1462 (1950).

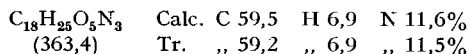
⁴³⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 67, 257 (1955).

⁴⁴⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 43, 200 (1960).

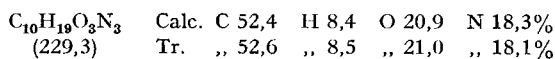
formamide). $Rf_M^0 = 0,95$; $Rf_A^0 = 0,90$; $Rf_P^0 = 0,78$. $E_{5,8}^0 = 0,9$ His; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Glu (homogène à la ninhydrine, au chlore et au réactif de PAULY).



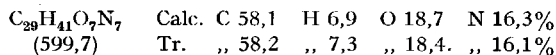
(*N*-CBO-L-(Prolyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (III). A une solution de 24,9 g (100 mmoles) de *N*-CBO-L-proline²⁸⁾ et de 14,0 ml (100 mmoles) de triéthylamine dans 500 ml de tétrahydrofurane anhydre on ajoute, à -5° sous forte agitation, 9,60 ml (100 mmoles) de chloroformiate d'éthyle. Après 20 min on introduit 13,2 g (100 mmoles) de carbazate de tert.-butyle²⁹⁾ et garde le mélange obtenu 4 h à 20° . Après évaporation du tétrahydrofurane on reprend le résidu dans 50 ml d'acétate d'éthyle, lave la solution obtenue par HCl 1N, eau, NH_4OH 1N, sèche sur Na_2SO_4 , évapore à sec et triture la mousse qui en résulte dans l'éther de pétrole jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent. Après séchage sous vide poussé on obtient 32,5 g (89%) de (*N*-CBO-L-prolyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide sans F. bien déterminé. Ce produit est très soluble dans tous les solvants organiques à l'exception de l'éther de pétrole. Il peut être obtenu à l'état cristallin (F. 164°) à partir de sa solution éthérée, mais avec de très grandes pertes. Le produit cristallisé et celui non cristallisé donnent exactement la même analyse, le même pouvoir rotatoire, et sont tous deux homogènes et identiques à la chromatographie et à l'électrophorèse. $Rf_M^b = 1,0$; $Rf_A^b = 0,86$; $Rf_P^b = 0,90$; $Rf_A^a = 0,72$; $Rf_P^a = 0,67$; $Rf_P^b = 0,25$. $E_{5,8}^b = 1,3$ His; $E_{5,8}^a = 2,0$ His; $E_{1,9}^b = 1,3$ Try; $E_{1,9}^a = 1,1$ His (homogène à la ninhydrine, à l'isatine, au chlore et au réactif de FOLIN). $[\alpha]_D^{21} = -83,4^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; méthanol).



L-Prolyl-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (IV). On hydrogène 27,2 g (75 mmoles) de (*N*-CBO-L-prolyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (III) dissous dans 750 ml de méthanol en présence de 7,5 g de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN⁴⁵⁾, préhydrogéné. L'absorption de H_2 est très rapide et au bout de 75 min elle se stabilise à 1100 ml. Le catalyseur est éliminé par centrifugation et la solution, filtrée à travers de l'Hyflo-Supercel, est évaporée à sec. On épuise le résidu à l'éther bouillant, filtre, concentre la solution éthérée à 100 ml et maintient 12 h à 0° . Après filtration et séchage on obtient 14,8 g (86%) de *L*-prolyl-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide cristallin de F. 119° . $[\alpha]_D^{21} = -45,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-40,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 1,0$; $Rf_A^0 = 0,90$; $Rf_P^0 = 0,70$. $E_{5,8}^0 = 1,3$ His; $E_{1,9}^0 = 1,3$ Try (révélation par ninhydrine, isatine, chlore et FOLIN; homogène).



(*N*-CBO-L-Valyl-L-histidyl-L-prolyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (V). On dissout 4,02 g (10 mmoles) de *N*-CBO-L-valyl-L-histidyl-hydrazide³⁰⁾ dans 40 ml de HCl 1N, refroidit à -5° , ajoute 0,69 g (10 mmoles) de $NaNO_2$ en deux portions à 30 sec d'intervalle et agite 3 min. Après adjonction d'une solution aqueuse de K_2CO_3 à 50% refroidie à -5° on extrait l'azide dipeptidique par trois portions de 30 ml d'acétate d'éthyle également refroidies à -5° . La solution d'azide est rapidement séchée sur Na_2SO_4 , additionnée de 2,29 g (10 mmoles) de *L*-prolyl-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (IV), puis maintenue pendant 16 h à 0° et 48 h à 20° . On lave par H_2O et $NaHCO_3$ 1N sèche sur Na_2SO_4 , évapore à sec, dissout le résidu dans 20 ml d'acétate d'éthyle et ajoute de l'éther de pétrole jusqu'à l'apparition d'un trouble. Après 12 h à 0° on obtient un précipité floconneux, lequel, après filtration, lavage et séchage, donne 4,13 g (70%) de (*N*-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide de F. env. 150° . $[\alpha]_D^{22} = -78,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-38,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_H^a = 0,44$; $Rf_A^a = 0,50$; $Rf_P^a = 0,17$. $E_{5,8}^a = 1,1$ His; $E_{1,9}^a = 1,0$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN, PAULY, chlore; homogène).



N-CBO-L-Valyl-L-histidyl-L-prolyl-hydrazide, 2HCl (VI). On dissout en chauffant légèrement 3,00 g (5,0 mmoles) d'hydrazide tripeptique protégé V dans 15 ml de dioxanne anhydre. Après

⁴⁵⁾ R. KUHN & H. J. HAAS, Angew. Chem. 67, 785 (1955).

refroidissement à 20° on ajoute 10,7 ml d'une solution fraîchement préparée de gaz chlorhydrique 7N dans du dioxanne anhydre. Après 15 min la solution devient trouble et un précipité huileux s'y forme lentement. Après 45 min, on ajoute quelques gouttes d'éthanol pour dissoudre le précipité. L'adjonction de 100 ml d'éther provoque la cristallisation de 2,76 g (97%) de dichlorhydrate de N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-hydrazide de F. 172–175° (déc.) $[\alpha]_D^{25} = -55,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; méthanol); $-73,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; HCl 1N); $-32,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; pyridine). $Rf_P^0 = 0,73$; $Rf_M^0 = 0,44$; $Rf_A^0 = 0,50$; $Rf_B^0 = 0,17$. $E_{5,8}^0 = 0,6$ His; $E_{5,8}^1 = 1,1$ His; $E_{1,9}^0 = 0,7$ His; $E_{1,9}^1 = 1,0$ His (révélation par chlore, FOLIN et PAULY; homogène).

$C_{24}H_{35}O_5N_7Cl_2$	Calc.	C 50,3	H 6,2	O 14,0	N 17,1	Cl 12,4%
(572,5)	Tr.	50,5	6,4	14,3	16,8	12,0%

L-Proline de méthyle, HCl (VII). A une suspension, refroidie à -5° , de 115,1 g (1,0 mole) de L-proline dans 1000 ml de méthanol anhydre on ajoute sous forte agitation, sans que la température dépasse 0° , 130 ml de chlorure de thionyle, agite encore 2 h à 20° , puis 90 min à ébullition. Un contrôle chromatographique indique une estérification totale. On évapore à sec, redissout le résidu dans 250 ml de méthanol et évapore à sec, répète ces opérations trois fois puis sèche au vide poussé. Le résidu huileux commence à cristalliser après 24 h à 0° et lentement se prend en une masse cristalline compacte. On triture dans l'éther sec, filtre, suspend à nouveau dans l'éther sec, agite pendant 2 h, filtre et sèche au vide poussé sur KOH. On obtient ainsi 163,2 g (99%) de chlorhydrate de L-proline de méthyle de F. 71° . $[\alpha]_D^{25} = -32,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,1$; méthanol); $-35,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide); $-34,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; eau; litt. ⁴⁶) $-31,4^\circ$. $Rf_M^0 = 0,46$; $Rf_A^0 = 0,55$; $Rf_P^0 = 0,51$. $E_{5,8}^0 = 1,9$ His; $E_{1,9}^0 = 1,0$ (révélation par ninhydrine, chlore et isatine; homogène).

$C_6H_{12}O_2NCl$	Calc.	C 43,4	H 7,3	O 19,3	N 8,5	Cl 21,4%
(165,6)	Tr.	43,1	7,4	19,3	8,4	21,4%

L-Proline de méthyle (VII-A). On ajoute 12,4 g (75 mmoles) de chlorhydrate de L-proline de méthyle (VII) à 45 ml de K_2CO_3 à 50% refroidi à 0° . Après dissolution très rapide, l'ester libre se sépare sous la forme d'une huile épaisse. On l'extrait par l'éther, sèche la solution étherée sur Na_2SO_4 et évapore l'éther à 15° sous pression réduite. On obtient 9,0 à 9,5 g (93 à 98%) de L-proline de méthyle sous la forme d'une huile incolore qu'on utilise immédiatement pour la suite de la synthèse. Si l'évaporation de l'éther se fait à une température plus élevée, ou si l'on essaie de sécher le résidu huileux au vide poussé jusqu'à poids constant, les pertes en proline de méthyle deviennent trop importantes, la base obtenue étant assez volatile.

N-CBO-L-Valyl-L-histidyl-L-proline de méthyle (VIII). – a) *Par la méthode à l'azide*: A un mélange de 10,0 g (25 mmoles) de N-CBO-L-valyl-L-histidyl-hydrazide²⁰, de 100 ml de HCl 1N et 150 ml d'acétate d'éthyle, refroidi à -5° , on ajoute sous forte agitation 1,75 g (25,4 mmoles) de $NaNO_2$ en trois portions égales à 30 sec d'intervalle. On agite encore 5 min, puis ajoute 30 ml de K_2CO_3 aqueux à 50%, sépare les phases et extrait la phase aqueuse par deux portions de 50 ml d'acétate d'éthyle. Les solutions organiques réunies sont séchées sur Na_2SO_4 , additionnées de 3,36 g (26 mmoles) de L-proline de méthyle (VII-A), maintenues 12 h à 0° et 3 h à 20° , puis lavées cinq fois à l'eau, au $NaHCO_3$, séchées sur Na_2SO_4 et évaporées à sec. On obtient 9,20 g d'ester tripeptidique, sous la forme d'une mousse solide, qui est analytiquement pure et peut être utilisée directement pour la suite de la synthèse. Pour obtenir la cristallisation, on dissout dans 75 ml d'acétate d'éthyle, ajoute 25 ml d'éther de pétrole et maintient la solution homogène 48 h à 0° . Après séparation par filtration des cristaux formés, le filtrat est additionné d'encre 25 ml d'éther de pétrole et gardé 48 h à -20° . Une seconde masse cristalline se forme, qui, après filtration, lavage et séchage, est réunie à la première fraction. On obtient ainsi au total 8,74 g (70%) de N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-proline de méthyle de F. 96–98°. $[\alpha]_D^{25} = -66,9^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-33,6^\circ \pm 0,9^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,63$; $Rf_A^0 = 0,59$; $Rf_P^0 = 0,26$. $E_{5,8}^0 = 1,5$ His; $E_{1,9}^0 = 0,9$ His (révélation par ninhydrine, chlore et PAULY; homogène); $E_{5,8}^1 = 0,7$ His; $E_{1,9}^1 = 1,0$ Try (révélation par chlore et PAULY; homogène).

$C_{25}H_{33}O_6N_5$	Calc.	C 60,1	H 6,7	O 19,2	N 14,0%
(499,6)	Tr.	59,5	6,9	19,7	14,0%

⁴⁶) B. F. ERLANGER, H. SACHS & E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. 76, 1809 (1954).

b) *Par la méthode à l'anhydride mixte*: A une solution d'anhydride mixte, préparée à partir de 1,04 g (4,0 mmoles) de N-CBO-L-valine²³, 0,56 ml (4,0 mmoles) de triéthylamine et 0,39 ml (4,0 mmoles) de chloroformate d'éthyle dans 20 ml de tétrahydrofurane, on ajoute à -5° , 5 ml d'une solution aqueuse contenant 1,20 g (2,8 mmoles) de L-histidyl-L-prolinate de méthyle, 2 HBr (X), puis 0,84 ml (6,0 mmoles) de triéthylamine. Après 4 h on évapore la solution à sec, reprend le résidu dans 40 ml d'acétate d'éthyle, lave par H_2O et $NaHCO_3$ 1N et extrait le tripeptide par trois portions de 10 ml de HCl 1N. On réunit les solutions acides, sature avec du K_2CO_3 et extrait par l'acétate d'éthyle. On sèche la solution organique sur Na_2SO_4 , évapore à sec et cristallise le résidu comme en a). On obtient 690 mg (49%) d'ester tripeptidique identique au produit obtenu en a). Si on ajoute la triéthylamine au bromhydrate d'ester dipeptidique X avant l'adjonction de celui-ci à la solution d'anhydride mixte, une très grande partie de l'ester dipeptidique se cyclise en dicétopipérazine. Le produit de réaction doit alors être purifié par contre-courant, soit dans le système sec.-butanol/acétate d'éthyle/acide acétique 1N 1:1:2, soit dans le système n-butanol/acide toluènesulfonique à 2% 1:1, et le rendement en tripeptide VIII est abaissé à 35–40%.

c) *Par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide*: On dissout 502 mg (2 mmoles) de CBO-L-valine²³ et 856 mg (2,0 mmoles) de dibromhydrate de L-histidyl-L-prolinate de méthyle (X) dans un mélange de 15 ml d'acétonitrile et 1,5 ml d'eau contenant 0,56 ml (4,0 mmoles) de triéthylamine. On ajoute encore 515 mg (2,5 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide, garde 12 h à 20° , sépare la dicyclohexylurée (315 mg) par filtration et évapore le filtrat à sec. Après purification comme décrit en b), on obtient 480 mg (48%) d'ester tripeptidique identique au produit obtenu en a).

d) *Par la méthode à l'ester activé*: On maintient une solution de 744 mg (2,0 mmoles) de N-CBO-L-valinate de p-nitrophényle²⁵, 856 mg (2,0 mmoles) de dibromhydrate d'ester dipeptidique X et 0,56 ml (2,0 mmoles) de triéthylamine dans un mélange de 10 ml d'acétonitrile et 1,0 ml d'eau, 48 h à 20° . Après évaporation à sec et purification comme en b), on obtient 480 mg (48%) d'ester tripeptidique identique au produit obtenu en a).

N-CBO-L-Histidyl-L-prolinate de méthyle (IX). A une solution de N-CBO-L-histidylazide (préparé à partir de 18,2 g (60 mmoles) d'hydrazide correspondant²²) dans 300 ml d'acétate d'éthyle on ajoute 9,00 g (70 mmoles) de L-prolinate de méthyle (VII-A) et maintient la solution obtenue 12 h à 0° . On évapore à sec et purifie le résidu par une répartition en contre-courant de 15 transferts dans le système n-butanol/eau en utilisant 250 ml + 250 ml de solvant par tube. L'ester dipeptidique est localisé par le réactif de PAULY et se trouve principalement dans la phase supérieure des tubes 12 à 15. Ces phases sont réunies et évaporées à sec. Le résidu est trituré par l'éther de pétrole jusqu'à pulvérisation complète. Après filtration, lavage et séchage, on obtient 16,1 g (67%) de N-CBO-L-histidyl-L-prolinate de méthyle de F. env. 90° (déc.). Cet ester n'a pas pu être obtenu sous forme cristalline, malgré de nombreux essais. $[\alpha]_D^{25} = -53,1^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,1$; méthanol); $-35,7^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,48$; $Rf_A^0 = 0,85$; $Rf_B^0 = 0,12$. $E_{5,8}^0 = 1,4$ His; $E_{1,9}^0 = 1,1$ His (révélation par ninhydrine, chlore et PAULY; homogène).

$C_{20}H_{24}O_5N_4$	Calc. C 60,0	H 6,0	O 20,0	N 14,0%
(400,4)	Tr. „ 59,8	„ 6,4	„ 19,7	„ 13,7%

L-Histidyl-L-prolinate de méthyle, 2 HBr (X). On dissout 12,0 g (30 mmoles) d'ester dipeptidique IX dans 100 ml d'acide acétique contenant 30% de gaz bromhydrique. Après 60 min on concentre sous pression réduite à 30° à env. 50 ml et précipite le bromhydrate d'ester dipeptidique en le versant, sous forte agitation, dans 1000 ml d'éther anhydre. On filtre, lave à plusieurs reprises le précipité hygroscopique par de l'acétate d'éthyle anhydre et sèche sous vide. On obtient ainsi 12,5 g (97%) de dibromhydrate de L-histidyl-L-prolinate de méthyle de F. 146° (déc.). $[\alpha]_D^{21} = -36,8^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,1$; méthanol); $-34,4^{\circ}$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,48$; $Rf_A^0 = 0,85$; $Rf_B^0 = 0,12$. $E_{5,8}^0 = 1,4$ His; $E_{1,9}^0 = 1,1$ His (révélation par ninhydrine, chlore et PAULY; homogène).

$C_{12}H_{20}O_3N_4Br_2$	Calc. C 33,7	H 4,7	N 13,1	Br 37,3%
(428,1)	Tr. „ 33,8	„ 4,9	„ 13,1	„ 37,3%

N-CBO-L-Valyl-L-histidyl-L-proline (XI). A une solution de 5,50 g (11 mmoles) d'ester tripeptidique VIII dans 30 ml de méthanol, ajustée au pH 8,0 (test sur papier humide!), on ajoute 5,5 ml de NaOH 4N aqueux et maintient 2 h à 20° . On dilue la solution par 300 ml de méthanol, fait

passer sur une colonne de IRC-50 (cycle acide) et lave cette dernière par 2×200 ml de méthanol. Si la solution méthanolique contient une proportion d'eau plus grande que celle indiquée, la totalité de Na^+ n'est plus retenue par la résine. Après évaporation de la solution méthanolique, on dissout le résidu dans 25 ml de CH_2Cl_2 et ajoute 20 ml d'acétate d'éthyle. Ce dernier provoque une précipitation partielle du tripeptide, mais celui-ci repasse en solution après chauffage à l'ébullition. Après 24 h à -20° , on obtient un dépôt cristallin très fin, qui passe à travers le filtre. On centrifuge, lave par plusieurs portions d'acétate d'éthyle, puis d'éther, et sèche au vide. On obtient 3,79 g (71%) de N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-valine de F. 176° . $[\alpha]_D^{25} = -44,4^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; méthanol); $-21,4^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $\text{Rf}_M^A = 0,19$; $\text{Rf}_A^A = 0,31$; $\text{Rf}_P^A = 0,26$. $\text{E}_{5,8}^A = 0,8$ His; $\text{E}_{1,9}^A = 1,3$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore et PAULY; homogène).

$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_6\text{N}_5$	Calc.	C 59,4	H 6,4	O 19,7	N 14,4%
(485,5)	Tr.	59,0	6,5	19,9	14,5%

N-CBO-L-Valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XII).

On suspend 2,57 g (3,6 mmoles) de dibromhydrate d'ester tripeptidique II dans un mélange de 50 ml de CH_2Cl_2 et 3 ml d' H_2O , agite jusqu'à dissolution totale, refroidit à 0° , ajoute 2 ml de K_2CO_3 aqueux à 50%, agite 10 min, centrifuge, sépare les phases, sèche la solution organique sur Na_2SO_4 , évapore à sec à 30° et sèche au vide poussé jusqu'au poids constant. On obtient 1,93 g (97%) de mousse solide. On dissout ce produit dans un mélange de 35 ml d'acétonitrile et 20 ml de CH_2Cl_2 , ajoute 1,70 g (3,5 mmoles) de tripeptide XI, chauffe jusqu'à dissolution totale, refroidit à -10° , ajoute 0,93 g (4,5 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide, maintient 12 h à 20° , ajoute encore 206 mg (1 mmole) de dicyclohexyl-carbodiimide, chauffe 5 h à 50° , refroidit à 0° et filtre. On évapore le filtrat à sec et triture le résidu dans l'éther sec jusqu'à l'obtention d'un produit pulvérulent. L'hexapeptide brut (3,23 g) ainsi obtenu nécessite une purification. On le dissout dans 200 ml d'acétate d'éthyle et lave avec 6×20 ml d'eau, puis avec NH_4OH 1N, sèche sur Na_2SO_4 et évapore à sec. On dissout le résidu dans 15 ml d'acétate d'éthyle, filtre et ajoute de l'éther de pétrole jusqu'à l'apparition d'un trouble. Après 4 h à 0° on obtient un dépôt cristallin. On ajoute de nouveau de l'éther de pétrole et garde 2 j. à 0° . On filtre, lave avec un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole, puis sèche. On obtient 2,90 g (81%) de N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle cristallin de F. $155-160^\circ$ $[\alpha]_D^{20} = -16,8^\circ \pm 0,5$ ($c = 1,9$; méthanol). $K = 0,81$ dans le système sec.-butanol/acétate d'éthyle/acide acétique/eau 8:2:1:14. $\text{Rf}_M^A = 0,95$; $\text{Rf}_A^A = 0,86$; $\text{Rf}_P^A = 0,50$; $\text{Rf}_A^B = 0,57$. $\text{E}_{5,8}^A = 1,0$ His; $\text{E}_{1,9}^A = 1,2$ Glu; $\text{E}_{5,8}^B = 0,9$ His; $\text{E}_{1,9}^B = 1,3$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore et PAULY; homogène).

$\text{C}_{52}\text{H}_{63}\text{O}_{11}\text{N}_{11}$	Calc.	C 61,3	H 6,2	O 17,3	N 15,1%
(1018,1)	Tr.	60,7	6,5	17,3	14,5%

L-Valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XIII). On dissout 1,54 g (1,5 mmole) d'ester hexapeptidique XII dans 8 ml d'acide acétique, ajoute 8 ml d'une solution 4,5N d'HBr dans l'acide acétique, garde 20 min à 20° , met au vide pendant 5 min pour éloigner la majeure partie de HBr, puis ajoute 50 ml d'éther, filtre et sèche. On obtient 1,75 g de tribromhydrate d'ester hexapeptidique avec un F. 240° (déc.), mais contaminé par env. 15% d'acide hexapeptidique correspondant, dû à l'acidolyse partielle de la fonction ester p-nitrobenzylique. On dissout le produit dans un mélange de 4 ml d'eau et 20 ml de chloroforme, refroidit à 0° , ajoute 2 ml de NH_4OH 4N, sépare les phases, sèche la solution organique et évapore à sec. On redissout le résidu dans 5 ml de chloroforme, ajoute 40 ml d'éther sec, garde 30 min à 0° , filtre et lave le précipité à l'éther. On obtient 1,05 g (80%) de L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle de F. 150° (déc.). $[\alpha]_D^{21} = -22,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-18,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $\text{Rf}_M^A = 0,67$; $\text{Rf}_A^A = 0,70$; $\text{Rf}_P^A = 0,60$. $\text{E}_{5,8}^A = 1,0$ His; $\text{E}_{1,9}^A = 1,2$ Glu; $\text{E}_{1,9}^B = 1,3$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore et PAULY; homogène).

$\text{C}_{44}\text{H}_{57}\text{O}_9\text{N}_{11} + \text{H}_2\text{O}$	Calc.	C 58,6	H 6,6	O 17,7	N 17,0%
(902,0)	Tr.	58,8	6,9	17,3	16,7%

(N-CBO-L-Tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XIV). On dissout 31,5 g (100 mmoles) de N-CBO-L-tyrosine³⁰ dans 500 ml de tétrahydrofurane contenant 14,0 ml (100 mmoles) de triéthylamine, refroidit à -5° , agite et ajoute lentement 9,60 ml de chloroformiate d'éthyle.

Après 10 min on ajoute 13,2 g (100 mmoles) de carbazate de tert.-butyle²⁹), agite 4 h à 20° et 30 min à 50°, puis évapore à sec. On reprend le résidu par 500 ml d'acétate d'éthyle, lave par H₂O, NH₄OH 1N, sèche sur Na₂SO₄, évapore à sec, redissout le résidu dans 300 ml d'éther et précipite par adjonction de 800 ml d'éther de pétrole. On filtre, lave le précipité à l'éther de pétrole, sèche et obtient 32,2 g (75%) de (N-CBO-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide de F. 90–100° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -19,9 \pm 1,0^\circ$ ($c = 1,1$; méthanol); $-20,4^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 1,0$; $Rf_A^0 = 0,97$; $Rf_B^0 = 0,27$. $E_{6,8}^0 = 1,3$ His; $E_{1,9}^0 = 0,8$ His (révélation par ninhydrine, chlore, FOLIN et PAULY; homogène).

$C_{22}H_{27}O_6N_3$	Calc.	C 61,5	H 6,3	O 22,4	N 9,8%
(429,5)	Tr.	„ 61,3	„ 6,9	„ 22,2	„ 9,9%

La synthèse par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide donne avec un bon rendement un produit qui est cependant difficilement purifiable. Par la méthode au p-nitrophénylester, le composé désiré ne se forme qu'avec un très faible rendement.

(O,N-Di-CBO-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XV). A une solution de 44,9 g (100 mmoles) de O,N-di-CBO-L-tyrosine³²) et de 14,0 ml (100 mmoles) de triéthylamine dans 1000 ml de tétrahydrofurane anhydre, refroidie à -5° , on ajoute sous forte agitation 9,60 ml (100 mmoles) de chloroformiate d'éthyle et, 10 min plus tard, 13,2 g (100 mmoles) de carbazate de tert.-butyle²⁹). On agite encore 4 h à 20° puis évapore à sec, reprend le résidu dans 1000 ml d'acétate d'éthyle, lave par H₂O et NH₄OH 1N, sèche sur Na₂SO₄ et évapore à sec. Le résidu est dissous dans 100 ml d'acétate d'éthyle bouillant, additionné de 400 ml d'éther et maintenu 12 h à 0°. Le produit cristallin est isolé par filtration, lavé par l'éther et séché sous vide poussé. On obtient ainsi 32 à 35 g (57 à 66%) de (O,N-di-CBO-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide de F. 147°. $[\alpha]_D^{25} = -18,4^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1,5$; méthanol); $-18,7^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 2,0$; diméthylformamide). Après scission des groupes protecteurs par HBr/acide acétique, la migration chromatographique et électrophorétique de ce composé est identique à celle de XIV.

$C_{30}H_{33}O_8N_3$	Calc.	C 63,9	H 5,9	O 22,7	N 7,5%
(563,6)	Tr.	„ 63,7	„ 5,9	„ 23,1	„ 7,3%

L-Tyrosyl-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XVI). – a) A partir de (O,N-di-CBO-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide: On hydrogène 34,3 g (61,0 mmoles) de XV dissous dans 800 ml de méthanol, en présence de 6,1 g de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN⁴⁵), préhydrogéné. L'absorption de H₂ est très rapide et au bout de 50 à 60 min elle se stabilise à 2500 ml. Le catalyseur est éliminé par centrifugation et la solution, légèrement colorée par une suspension colloïdale de catalyseur, est traitée par 2–3 g de charbon actif, puis filtrée et évaporée à sec. On triture le résidu obtenu dans l'éther de pétrole et, après filtration et séchage, on le suspend 30 min dans l'acétate d'éthyle bouillant. Après 12 h à 0°, on filtre, lave et sèche. On obtient 14,6 g (93%) de L-tyrosyl-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide de F. 167°. $[\alpha]_D^{25} = +27,1^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-3,1^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $+45,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^0 = 1,0$; $Rf_A^0 = 0,95$; $Rf_B^0 = 0,76$. $E_{6,8}^0 = 1,0$ His; $E_{1,9}^0 = 1,1$ Try (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène).

$C_{14}H_{21}O_4N_3$	Calc.	C 56,9	H 7,1	O 21,7	N 14,2%
(295,3)	Tr.	„ 56,8	„ 7,2	„ 22,0	„ 14,2%

b) A partir de (N-CBO-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XIV) on obtient, après scission hydrogénolytique du groupe CBO- de XIV, le même produit que ci-dessus avec un rendement de 75–85%.

(N-CBO-L-Valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XVII). On dissout 14,8 g (50 mmoles) de L-tyrosyl-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XVI) et 18,7 g (50 mmoles) de N-CBO-L-valinate de p-nitrophényle²⁵) dans 20 ml de diméthylformamide et laisse reposer 36 h à 20°. Le produit de réaction est dissous dans 500 ml d'acétate d'éthyle, lavé rapidement par H₃PO₄ 1N et H₂O, puis par NaHCO₃ 1N jusqu'à ce que l'eau de lavage devienne incolore, séché sur Na₂SO₄ et évaporé à sec. On dissout le résidu dans un mélange de 40 ml d'acétate d'éthyle et 300 ml d'éther bouillant et garde la solution obtenue 12 h à 20°. L'hydrazide dipeptidique cristallise. Après filtration, lavage à l'éther et séchage, on obtient 21,4 g (81%) de (N-CBO-L-valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide de F. 128–131°. $[\alpha]_D^{25} = -42,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-11,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-23,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; pyridine);

$-20,4^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,0$; acide acétique à 95%). $Rf_M^A = 1,0$; $Rf_A^A = 0,73$; $Rf_B^A = 0,59$; $Rf_M^B = 0,98$; $Rf_A^B = 0,93$; $Rf_B^B = 0,72$. $E_{5,8}^A = 0,8$ His; $E_{1,9}^A = 1,2$ Glu; $E_{5,8}^B = 0,7$ His; $E_{1,9}^B = 0,7$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène).

$C_{27}H_{36}O_7N_4$	Calc.	C 61,3	H 6,9	O 21,2	N 10,6%
(529,6)	Tr.	„ 61,2	„ 7,1	„ 21,1	„ 10,2%

(*L*-Valyl-*L*-tyrosyl)-1-(*tert*.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XVIII). A une suspension de 3,00 g de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN⁴⁵), préhydrogéné dans 250 ml de méthanol, on ajoute une solution de 15,9 g (30 mmoles) d'hydrazide dipeptidique XVII dans 250 ml de méthanol. Après que la consommation de H_2 est terminée, on sépare le catalyseur par centrifugation et traite la solution (colorée en brun clair par une suspension colloïdale de catalyseur) par 1 à 2 g de charbon actif ou d'oxyde d'aluminium. On filtre, évapore à sec, dissout le résidu dans 100 ml d'acétate d'éthyle et laisse cristalliser 12 h à 0° . On filtre, lave à l'éther et sèche. On obtient une première fraction de 7,80 g de dipeptide pur. Le filtrat et l'éther de lavage réunis sont évaporés à sec et le résidu, cristallisé dans 30 ml d'acétate d'éthyle. On obtient ainsi encore 2,24 g de produit de même qualité que la première fraction, soit au total 10,04 g (85%) de (*L*-valyl-*L*-tyrosyl)-1-(*tert*.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide de F. 135° .

Si, après l'évaporation du méthanol, on élimine les dernières traces de ce solvant par un séchage trop poussé ou par trituration du résidu dans l'éther de pétrole, le dipeptide obtenu ne se dissout plus dans l'acétate d'éthyle et, dans ce cas, la cristallisation est remplacée par un lavage dans un mélange d'acétate d'éthyle/éther 1:1. Le produit obtenu est également analytiquement pur et le rendement dépasse alors 90%. $[\alpha]_D^{25} = -13,4^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,0$; méthanol); $-8,4^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $+32,9^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,0$; acide acétique à 95%). $Rf_M^A = 1,0$; $Rf_A^A = 0,93$; $Rf_B^A = 0,72$. $E_{5,8}^A = 0,7$ His; $E_{1,9}^A = 0,9$ Try (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène).

$C_{19}H_{30}O_5N_4$	Calc.	C 57,7	H 7,9	O 20,2	N 14,2%
(394,5)	Tr.	„ 57,4	„ 7,9	„ 20,2	„ 13,8%

(*N*-CBO-*L*-Arginyl-*L*-valyl-*L*-tyrosyl)-1-(*tert*.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XIX). On dissout 8,95 g (23,0 mmoles) de bromhydrate de *N*-CBO-*L*-arginine⁸) et 10,0 g (25,5 mmoles) d'hydrazide dipeptidique XVIII dans 65 ml de pyridine, ajoute 65 ml d'acétonitrile, refroidit à -5° la solution homogène obtenue, ajoute 6,20 g (30 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite 12 h à 20° . Après élimination par filtration de la dicyclohexylurée (5,01 g), on évapore le filtrat à sec, triture le résidu dans l'éther de pétrole jusqu'à pulvérisation complète et décante. On dissout le précipité dans un mélange de 700 ml d'acétate d'éthyle et de 100 ml d'acide acétique 1*N*, sépare les phases et extrait la solution organique par 4×100 ml d'acide acétique 1*N*. On contre-extrait les solutions aqueuses réunies par 4×100 ml d'acétate d'éthyle, réunit les solutions organiques et évapore à sec. On reprend le résidu dans un mélange de 400 ml d'acétate d'éthyle et de 100 ml d'acide acétique 0,5*N*, sépare les phases et extrait la phase organique par 4×100 ml d'acide acétique 0,5*N*. Pendant ces extractions une partie du tripeptide formé précipite à l'état pur. Il est isolé par filtration. Les extraits aqueux réunis contiennent une seconde fraction de tripeptide pur. On les évapore à sec, réunit le résidu au tripeptide précipité au cours des extractions, dissout le tout (17,6 g) dans 500 ml de méthanol, fait passer la solution obtenue sur une colonne de 100 ml de IRA-410 (cycle basique) lave la résine par 100 ml de méthanol et évapore la solution méthanolique à sec. On dissout le résidu (13,1 g), à chaud, dans un mélange de 100 ml d'acétate d'éthyle et 30 ml de méthanol et laisse cristalliser 2 j à 0° . Après filtration, lavage et séchage, on obtient 11,6 g (71%) de (*N*-CBO-*L*-arginyl-*L*-valyl-*L*-tyrosyl)-1-(*tert*.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide de F. 160° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -26,8 \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,0$; méthanol); $-12,7^{\circ} \pm 0,5$ ($c = 1,1$; diméthylformamide/eau 8:2); $-16,6^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,0$; acide acétique). $Rf_M^A = 0,64$; $Rf_A^A = 0,64$; $Rf_B^A = 0,28$; $Rf_M^B = 0,55$; $Rf_A^B = 0,51$; $Rf_B^B = 0,58$. $E_{5,8}^A = 1,4$ His; $E_{1,9}^A = 1,3$ Glu; $E_{5,8}^B = 1,1$ His; $E_{1,8}^B = 1,1$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore, FOLIN et PAULY; homogène).

$C_{33}H_{48}O_8N_8 + 1\frac{1}{2} H_2O$	Calc.	C 55,7	H 7,2	O 21,4	N 15,7%
(711,8)	Tr.	„ 55,9	„ 7,3	„ 21,4	„ 15,7%

(*CBO*-*L*-Arginyl-*L*-valyl-*L*-tyrosyl)-1-(*tert*.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide, HCl (XIX-A). On dissout 7,12 g (10 mmoles) d'hydrazide tripeptidique XIX dans 30 ml de méthanol chaud, refroidit à 20° , ajoute 5 ml d'une solution 2*N* d'HCl dans l'éther, agite un instant puis précipite par adjonction de 300 ml d'éther. On filtre, lave le précipité à l'éther et sèche. On obtient ainsi 5,24 g

(72%) de chlorhydrate de (N-CBO-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide de F. 163° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -30,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-10,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). Après scission, soit par HBr / acide acétique, soit par hydrogénation catalytique, le produit se comporte à la chromatographie et à l'électrophorèse exactement comme l'hydrazide tripeptidique XIX.

$C_{33}H_{49}O_8N_8Cl$	Calc.	C 55,0	H 6,8	O 17,7	N 15,5	Cl 4,9%
(721,3)	Tr.	„ 55,0	„ 7,0	„ 17,4	„ 15,4	„ 5,0%

(L-Arginyl-L-valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XX). A une suspension de 1,00 g de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN⁴⁶), préhydrogéné dans 10 ml de méthanol, on ajoute 7,12 g (10 mmoles) d'hydrazide tripeptidique XIX dissous dans 150 ml de méthanol. L'hydrogénation est effectuée pendant au moins 12 h et, après consommation de la quantité théorique d'hydrogène, le catalyseur est éliminé par centrifugation. La solution colorée en brun clair par une suspension colloïdale de catalyseur, est traitée par env. 1 g de charbon actif, puis, après filtration, évaporée à sec. Le résidu est trituré dans l'acétate d'éthyle jusqu'à l'obtention d'un produit pulvérulent blanc. Après filtration et séchage, on obtient 4,95 g (90%) de (L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide qui se décompose à 175° et ne devient liquide qu'à 225°. $[\alpha]_D^{25} = -19,0^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1,2$; méthanol); $-25,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,55$; $Rf_A^0 = 0,51$; $Rf_P^0 = 0,58$. $E_{5,8}^0 = 1,1$ His; $E_{1,9}^0 = 1,1$ Glu (révélation à la ninhydrine, chlore, FOLIN et SAKAGUCHI; homogène).

$C_{25}H_{42}O_8N_8 + H_2O$	Calc.	C 52,8	H 7,7	O 19,7	N 19,7%
(568,7)	Tr.	„ 52,8	„ 7,7	„ 19,6	„ 19,7%

N-CBO-β-O-Benzyl-L-aspartate de p-nitrophényle (XXI). On suspend 7,15 g (20 mmoles) de N-CBO-L-β-aspartate de benzyle³⁴) et 6,00 g (13,5 mmoles) de tri-p-nitrophényl-phosphite²⁵)⁴⁷) dans 20 ml de pyridine, agit 12 h à 20°, ajoute 200 ml d'acétate d'éthyle, lave avec HCl 1N, puis avec alternativement NaHCO₃ 1N et H₂O jusqu'à disparition de la couleur jaune, sèche sur Na₂SO₄ et évapore à sec. On redissout le résidu dans 50 ml d'acétate d'éthyle, ajoute de l'éther de pétrole jusqu'au trouble, induit la cristallisation en grattant, garde 3 h à -10°, filtre, lave le précipité cristallin par un mélange d'acétate d'éthyle/éther de pétrole 2:1 et sèche. Après une recristallisation dans les mêmes conditions on obtient 4,85 g (51%) de N-CBO-β-O-benzyl-L-aspartate de p-nitrophényle de F. 76°. $[\alpha]_D^{25} = -30,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-16,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide).

$C_{25}H_{22}O_8N_2$	Calc.	C 62,8	H 4,6	O 26,8	N 5,9%
(478,5)	Tr.	„ 62,7	„ 4,5	„ 26,9	„ 6,0%

(N-CBO-β-O-Benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide (XXII). - a) Par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide: A une solution de 1,79 g (5,0 mmoles) de N-CBO-L-β-aspartate de benzyle³⁴) et de 2,75 g (5,0 mmoles) d'hydrazide tripeptidique XX dans 7,5 ml de diméthylformamide, on ajoute 1,0 ml de HCl 5N dans l'éther, évapore rapidement l'éther sous vide, ajoute sous forte agitation 20 ml d'acétonitrile et, après refroidissement à -5°, 1,24 g (6,0 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide. On laisse reposer 14 h à 20°, sépare la dicyclohexylurée par filtration (1,34 g), évapore l'acétonitrile sous pression réduite, ajoute au résidu 50 ml d'acétate d'éthyle et sépare par filtration le térapeptide brut précipité. Ce produit (4,24 g) contenant, à côté du térapeptide formé, des traces de tripeptide XX, est soumis à une purification par répartition à contre-courant dans le système sec.-butanol/acétate d'éthyle/eau 1:1:2. Après 8 transferts, le térapeptide se rassemble dans les tubes 6, 7 et 8, tandis que l'hydrazide tripeptidique reste dans les tubes 1 et 2. On évapore à sec le contenu réuni des tubes 6, 7 et 8, sèche sous vide poussé, redissout dans 25 ml de chloroforme bouillant et laisse cristalliser 2 j. à 0°. On centrifuge, lave le culot à l'acétate d'éthyle, filtre et sèche. On obtient ainsi 3,31 g (71%) de chlorhydrate de (N-CBO-β-O-benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl)-1-(tert.-butoxycarbonyl)-2-hydrazide de F. 142-144° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -24,1^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-11,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,40$; $Rf_A^0 = 0,47$. $E_{5,8}^0 = 0,6$ His; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore, FOLIN et SAKAGUCHI; homogène).

$C_{44}H_{60}O_{11}N_8Cl$	Calc.	C 57,0	H 6,5	O 19,0	N 13,6	Cl 3,8%
(926,5)	Tr.	„ 56,5	„ 6,7	„ 18,4	„ 13,4	„ 3,6%

⁴⁷) W. STRECKER & CH. GROSSMANN, Ber. deutsch. chem. Ges. 49, 63 (1916).

b) *Par la méthode à l'ester actif*: On chauffe pendant 8 h à 50° une solution de 478 mg (1,0 mmole) de N-CBO-β-O-benzyl-L-aspartate de p-nitrophényle et 551 mg (1,0 mmole) d'hydrazide tripeptidique XX dans 2 ml de diméthylformamide additionné de 0,2 ml de HCl 5N dans l'éther. On ajoute ensuite 25 ml d'acétate d'éthyle et garde le mélange 3 h à 0°. On décante et triture le résidu dans l'éther jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent. On filtre et purifie le précipité obtenu comme ci-dessus en a). On obtient 403 mg (43%) de tétrapeptide possédant les mêmes caractéristiques que celui obtenu en a).

N-CBO-β-O-Benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-hydrazide, 2HCl (XXIII). On dissout 2,78 g (3,0 mmoles) d'hydrazide tétrapeptidique XXII dans 15 ml de dioxanne à 40°. Après dissolution totale, on ajoute 20 ml d'une solution 4N d'HCl dans le dioxanne, fraîchement préparée, et garde la solution obtenue à 20°. La cristallisation commence après environ 10 min et, au bout de 45 min, la solution se transforme en une masse compacte. On ajoute 100 ml d'éther, triture, filtre, lave abondamment le précipité avec de l'acétate d'éthyle et sèche. On obtient ainsi (91%) de N-CBO-β-O-benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-hydrazide, 2 HCl de F. 168–172° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -29,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,2$; méthanol); $-12,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,66$; $Rf_A^0 = 0,71$; $Rf_P^0 = 0,90$. $E_{3,8}^0 = 0,7$ His; $E_{1,9}^0 = 1,1$ Glu (révélation par chlore, FOLIN et SAKAGUCHI; homogène).

$C_{39}H_{55}O_9N_9Cl_2$	Calc. C 54,3	H 6,2	O 16,7	N 14,6	Cl 8,2%
(862,8)	Tr. „ 54,2	„ 6,5	„ 16,5	„ 14,5	„ 8,0%

N-CBO-β-O-Benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalananyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle, HCl (XXIV). A une solution de 431 mg (0,5 mmole) d'hydrazide tétrapeptidique XXIII dans un mélange de 1,5 ml de diméthylformamide, de 1 ml de HCl 1N et de 0,5 ml de H_2O , refroidi à -5° , on ajoute sous forte agitation 0,1 ml d'une solution aqueuse de $NaNO_2$ 5N (0,5 mmole). L'azide formé qui précipite est remis en solution par adjonction de 5 ml d'acétate d'éthyle. On agite 5 min à -5° , ajoute 1 ml de $NaHCO_3$ 1N, centrifuge, sépare les phases, extrait la phase aqueuse avec 3×5 ml d'acétate d'éthyle, sèche sur Na_2SO_4 les solutions organiques réunies et, après filtration, ajoute 442 mg (0,5 mmole) d'ester hexapeptidique XIII. On évapore l'acétate d'éthyle à 0° sous vide et garde la solution restante 48 h à 0°. On évapore le diméthylformamide à 30° sous vide poussé, triture le résidu dans l'éther jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent, filtre et sèche. Les 782 mg de décapeptide brut obtenus sont dissous dans un mélange de 5 ml d'isopropanol et 5 ml de chloroforme et additionnés de 2 ml d'éther. On obtient un gros précipité, que l'on dissout en chauffant légèrement, puis garde la solution homogène obtenue 12 h à -20° . Le produit qui cristallise est séparé par centrifugation et, après décantation du solvant et une recristallisation dans les mêmes conditions, on obtient 390 mg (46%) de chlorhydrate de N-CBO-β-O-benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalananyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle de F. 180–200° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -27,0^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1,1$; méthanol). $Rf_M^0 = 0,12$; $Rf_A^0 = 0,39$; $Rf_P^0 = 0,18$. $E_{3,8}^0 = 0,5$ His; $E_{1,9}^0 = 1,2$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore, bleu de bromophénol, PAULY, FOLIN et SAKAGUCHI; homogène); $E_{1,9}^0 = 1,0$ Try (révélation par les mêmes réactifs que ci-dessus sauf la ninhydrine; homogène). Après hydrolyse par HCl 6N (110°; 14 h), on obtient les acides aminés composants dans les rapports suivants: His 2,14, Arg 1,07, Asp 0,97, Val 1,92, Tyr 0,96, Phe 1,00 et Leu 1,00.

$C_{83}H_{105}O_{18}N_{18}Cl + 1\frac{1}{2} H_2O$	Calc. C 58,4	H 6,4	O 18,3	N 14,7%
(1705,3)	Tr. „ 58,4	„ 6,5	„ 18,4	„ 14,4%

L-Aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalananyl-L-histidyl-L-leucine (XXV). On ajoute à une suspension préhydrogénée de 500 mg de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN⁴⁶) une solution de 270 mg (0,16 mmole) d'ester décapeptidique XXIV dissous dans 30 ml d'un mélange de tert.-butanol/eau 1:1. Après 8 h d'hydrogénation on élimine le catalyseur par centrifugation et évapore la solution à sec. On obtient 173 mg de poudre blanche, homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse. On la soumet à une répartition à contre-courant dans le système sec.-butanol/eau/acide trifluoroacétique 6000:8000:50. Après 200 transferts, une détermination colorimétrique (ninhydrine et FOLIN) met en évidence, à côté d'un sommet mineur, un sommet principal ($K = 1,96$) contenant le décapeptide désiré. On réunit le contenu des tubes 120 à 150, concentre à 10 ml, lyophilise, dissout le résidu dans 100 ml d'eau,

fait passer la solution obtenue sur 20 ml d'IRA-45 (cycle acétique), lave la résine par l'acide acétique 0,1N, filtre les solutions réunies, évapore à sec et sèche jusqu'au poids constant sur P_2O_5 et KOH. On obtient ainsi 143 mg (62%) de L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-D-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucine de F. 235° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -64,0^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1,2$; acide acétique 0,05 N). $Rf_M^0 = 0,12$; $Rf_A^0 = 0,39$; $Rf_P^0 = 0,18$. $E_{5,8}^0 = 0,5$ His; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Val (révélation par ninhydrine, chlore, bleu de bromophénol, FOLIN, PAULY et SAKAGUCHI; homogène). Point isoélectrique: $7,5 \pm 0,2$.

Peu soluble dans l'eau, le méthanol, le propanol; soluble dans l'acide acétique dilué, NH_4OH dilué et dans un mélange de méthanol/eau 1:1. L'hydrolyse totale par HCl 6N (110°; 14 h) a donné les acides aminés composants dans les rapports: Asp 0,97, Arg 0,98, Val 1,89, Tyr 1,01, His 1,96, Phe 0,94, Leu 1,13 et Pro (présent mais non déterminé).

$C_{61}H_{87}O_{14}N_{17}$, $CH_3CO_2H + 5H_2O$	Calc. C 52,8	H 7,1	O 23,5	N 16,6%
(1432,6)	Tr. „ 52,9	„ 7,4	„ 23,8	„ 17,2%

L'activité biologique, déterminée par le Prof. KONZETT et le Dr STÜRMER, sur la pression sanguine du Rat est env. 1/100 de celle de Val⁵-hypertensine-II-Asp-β-amide CIBA et de 1/10 de celle de la L-noradrénaline. Jusqu'à un rapport de poids de 10:1 aucune action antagoniste envers l'Ileu⁵-angiotensine-I naturelle³⁸) et envers notre Val⁵-angiotensine-I (XXXI) n'a pu être mise en évidence.

Val⁵-Angiotensine-I

N-CBO-L-Phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XXVI). — a) *Par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide:* On dissout 9,05 g (16 mmoles) de dibromhydrate de L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle¹⁸) dans 15 ml d'eau, ajoute 30 ml d'une solution de K_2CO_3 à 50%, extrait le précipité huileux par 150 ml d'acétate d'éthyle, lave la phase aqueuse par 2 × 50 ml d'acétate d'éthyle, sèche sur Na_2SO_4 les solutions organiques réunies, évapore à sec et sèche au vide poussé jusqu'à poids constant. On obtient 6,05 g (15 mmoles) (rdt.: 94%) d'ester dipeptidique libre, sous la forme d'une mousse solide. On le dissout dans 100 ml d'acétonitrile, ajoute 4,50 g (15 mmoles) de N-CBO-L-phénylalanine²³), refroidit à -10° , ajoute 3,71 g (18 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite pendant 1 h à -5° et 24 h à 20° . La dicyclohexylurée est séparée par filtration (3,20 g) et le résidu d'évaporation du filtrat est trituré dans l'éther de pétrole jusqu'à obtention d'une poudre légèrement jaunâtre. On filtre, redissout le précipité dans 300 ml d'acétate d'éthyle, lave plusieurs fois à l'eau, puis par NH_4OH 1N, sèche et évapore à sec. On dissout le résidu (9,65 g) dans 50 ml d'acétate d'éthyle, ajoute de l'éther de pétrole jusqu'à l'apparition d'un trouble, puis ajoute encore 10 ml d'acétate d'éthyle et garde la solution limpide 76 h à 0° . L'ester tripeptidique cristallise sous forme d'aiguilles. On filtre, lave, sèche et obtient 8,41 g (82%) de N-CBO-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle de F. 156°. $[\alpha]_D^{25} = -30,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-18,5 \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,95$; $Rf_A^0 = 0,90$; $Rf_P^0 = 0,75$. $E_{5,8}^0 = 1,0$ His; $E_{1,9}^0 = 1,1$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore et PAULY; homogène).

$C_{36}H_{40}O_8N_6$	Calc. C 63,1	H 5,9	O 18,7	N 12,3%
(684,7)	Tr. „ 63,1	„ 6,3	„ 18,5	„ 12,0%

b) *Par la méthode à l'ester actif:* On dissout 12,2 g (29 mmoles) de N-CBO-L-phénylalaninate de p-nitrophényle³⁹) et 11,7 g (29 mmoles) de L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle, préparé comme ci-dessus, dans 100 ml de tétrahydrofurane anhydre, maintient 48 h à 20° , évapore à sec, purifie et cristallise comme ci-dessus. On obtient 14,3 g (72%) de tripeptide identique à celui préparé par la méthode a).

L-Phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle, 2HBr (XXVII). A une solution de 6,85 g (10 mmoles) d'ester tripeptidique XXVI dans 35 ml d'acide acétique glacial on ajoute 35 ml d'une solution 4,5N d'HBr dans l'acide acétique, maintient 20 min à 20° , concentre sous vide à env. 50 ml et ajoute 300 ml d'éther anhydre. Le bromhydrate de tripeptide précipité est lavé abondamment à l'éther anhydre, et, après filtration et séchage, recristallisé dans un mélange d'isopropanol/acétate d'éthyle. On obtient 6,43 à 6,90 g (90 à 97%) de dibromhydrate de L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle de F. 245°. $[\alpha]_D^{25} = -4,0^\circ \pm 1,0^\circ$ ($c = 1,0$; méth

nol); $-4,0^\circ \pm 2,0^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,95$; $Rf_A^0 = 0,90$; $Rf_P^0 = 0,75$. $E_{5,8}^0 = 1,0$ His; $E_{1,9}^0 = 1,1$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore et PAULY; homogène).

$C_{28}H_{36}O_6N_6Br_2 + \frac{1}{2} H_2O$ (721,5)	Calc. C 46,6 H 5,2 O 14,4 N 11,6 Br 22,2%
Tr.	„ 46,8 „ 5,3 „ 14,7 „ 11,5 „ 22,2%

N-CBO-L-Valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XXVIII). – a) *Par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide*: On procède exactement comme pour son analogue XII comportant une D-phénylalanine à la place de L. Les quantités mises en réaction sont doublées. Le rendement atteint est de 65%. F. 170° (avec ramollissement à 130°). $[\alpha]_D^{25} = -55,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; méthanol); $-27,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,8$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,70$; $Rf_A^0 = 0,67$. $E_{5,8}^0 = 1,0$ His; $E_{1,9}^0 = 1,1$ Glu; $E_{5,8}^0 = 0,7$ His; $E_{1,9}^0 = 1,3$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore et PAULY; homogène).

$C_{55}H_{69}O_{11}H_{11}$ (1018,1)	Calc. C 61,3 H 6,2 O 17,3 N 15,1%
Tr.	„ 61,3 „ 6,4 „ 17,2 „ 14,8%

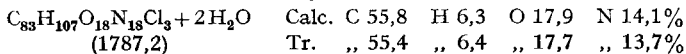
b) *Par la méthode à l'azide*: On dissout 2,28 g (4,0 mmoles) d'hydrazide tripeptidique VI dans un mélange de 16 ml de HCl 0,5N et 30 ml d'acétate d'éthyle, refroidit à -5° , ajoute, en agitant, en trois portions égales à 30 sec d'intervalle, 280 mg (4,0 mmoles) de $NaNO_2$, agite encore 5 min, ajoute 6 ml de K_2CO_3 à 50%, sépare les phases, extrait la phase aqueuse par 2×15 ml d'acétate d'éthyle, sèche sur Na_2SO_4 , les solutions organiques réunies et ajoute 2,10 g (3,8 mmoles) de L-phénylalanyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (préparé à partir du dibromhydrate correspondant XXVII, comme décrit pour l'analogue XII). On maintient la solution obtenue 4 j. à 0° , puis 4 h à 20° , lave par H_2O et $NaHCO_3$, 1N, sèche et évapore à sec. On obtient 3,18 g de produit impur, nécessitant une purification par distribution à contre-courant. Après 190 transferts dans le système sec.-butanol/acétate d'éthyle/eau/acide acétique 8:3:13:1 et mise en évidence par le réactif de PAULY, on obtient deux sommets importants, dont celui ayant un $K = 1,0$, contient l'hexapeptide. On réunit le contenu des tubes 81 à 110, évapore à sec, reprend le résidu dans 200 ml d'acétate d'éthyle, lave par Na_2CO_3 1N, sèche et isole comme pour a). On obtient 1,21 g (31%) de N-CBO-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle possédant les mêmes caractéristiques que celui synthétisé par la méthode a).

L-Valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle (XXIX). On dissout en chauffant légèrement 2,04 g (2,0 mmoles) d'ester hexapeptidique XXVIII dans 12 ml d'acide acétique glacial, refroidit à 20° , ajoute 12 ml d'une solution 4,5N de HBr dans l'acide acétique, maintient 20 min à 20° , met au vide pendant 5 min à 20° et ajoute 50 ml d'éther. On triture dans l'éther sec le précipité obtenu, filtre, lave et sèche. On dissout dans un mélange de 6 ml d'eau et 30 ml de chloroforme, refroidit à 0° , ajoute 6 ml de NH_4OH 4N, sépare les phases, extrait la phase aqueuse par encore 20 ml de chloroforme, réunit les phases organiques, sèche sur Na_2SO_4 et évapore à sec. Par redissolution du résidu dans 6 ml de $CHCl_3$ et adjonction de 100 ml d'éther on obtient, après filtration et séchage, 1,59 g (94%) de L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle de F. 160° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -45,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,3$; méthanol); $-47,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,66$; $Rf_A^0 = 0,70$; $Rf_P^0 = 0,53$. $E_{5,8}^0 = 1,0$ His; $E_{1,9}^0 = 1,1$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore et PAULY; homogène).

$C_{44}H_{57}O_9N_{11} + \frac{1}{2} H_2O$ (893,0)	Calc. C 59,2 H 6,6 O 17,0 N 17,2%
Tr.	„ 59,1 „ 7,1 „ 16,9 „ 16,9%

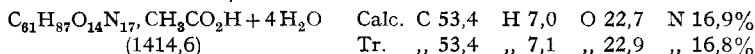
N-CBO-β-O-Benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle, 3HCl (XXX). On dissout 862 mg (1,0 mmole d'hydrazide tétrapeptidique XXIII dans 4 ml de diméthylformamide et 0,5 ml d'HCl 4N, refroidit à -5° , ajoute un mélange de 0,25 ml de $NaNO_2$ aqueux 4N et 0,75 ml de diméthylformamide, agite 5 min, puis ajoute 0,28 ml de triéthylamine et 5 ml d'acétate d'éthyle. On sèche rapidement sur Na_2SO_4 , filtre, ajoute au filtrat 884 mg (1,0 mmole) d'ester hexapeptidique XXIX dissous dans 1 ml de diméthylformamide, évapore l'acétate d'éthyle à température ordinaire, sous pression réduite, garde le résidu 12 h à 0° , évapore le diméthylformamide à sec à 30° sous vide poussé et triture le résidu dans l'éther jusqu'à obtention d'une poudre blanche. On obtient 1,72 g d'un mélange contenant à côté du décapeptide formé quelques impuretés mineures. On purifie par répartition à contre-courant dans le système sec.-butanol/acide acétique 0,1N. Après 40 transferts et localisation du décapeptide et des impuretés par les réactifs de PAULY et de FOLIN, on réunit

le contenu des tubes 15 à 25 ($K = 1,0$), filtre sur Hyflo Supercell et évapore à sec. On dissout le résidu dans un mélange de 20 ml de chloroforme et de 5 ml d'isopropanol, ajoute 1 ml d'une solution 1,5N d'HCl dans l'éther et précipite par l'éther le chlorhydrate du décapeptide. Après essorage du précipité, on le dissout dans un mélange de 5 ml d'isopropanol et de 5 ml de chloroforme, ajoute 2 ml d'éther, redissout le précipité formé en chauffant à ébullition et maintient la solution homogène obtenue 12 h à -20° . On centrifuge, lave le culot plusieurs fois à l'éther, le sèche et obtient ainsi 992 mg (56%) de trichlorhydrate de N-CBO- β -O-benzyl-L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucinate de p-nitrobenzyle de F. 235° (ramollissement à 190°). $[\alpha]_D^{22} = -52,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; méthanol). $Rf_M^b = 0,18$; $Rf_A^b = 0,38$; $Rf_P^b = 0,20$. $E_{1,9}^0 = 1,0$ Try (révélation par chlore, PAULY et FOLIN; homogène). $E_{8,8}^0 = 0,5$ His; $E_{1,9}^0 = 1,1$ Glu (révélation par ninhydrine, chlore, bleu de bromophénol, FOLIN, PAULY et SAKAGUCHI; homogène).



L-Aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucine (XXXI). On chauffe, 10 min à 40° , une suspension de 500 mg de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN⁴⁵) dans 5 ml d'acide acétique à 66%, effectue la préhydrogénation à 20° , puis ajoute 634 mg (0,354 mmole) d'ester décapeptidique XXX dissous dans 20 ml d'acide acétique à 66%. En 2 h l'absorption apparente de H_2 représente 95% de la quantité théorique et l'adjonction d'une seconde portion de 100 mg de catalyseur ne produit aucune augmentation de consommation. On élimine le catalyseur par centrifugation et évapore la solution à sec. On obtient env. 500 mg de produit sous forme d'une mousse solide, homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse.

On le soumet à une répartition à contre-courant dans le système sec.-butanol/eau/acide trifluoroacétique 6000:8000:50. Après 200 transferts, une détermination colorimétrique (ninhydrine et FOLIN) met en évidence un sommet unique ($K = 1,60$) de forme correspondant à la courbe théorique. On réunit le contenu des tubes 100 à 145, filtre, concentre à 10 ml, lyophilise, dissout le résidu dans 100 ml d'eau et fait passer la solution obtenue sur 20 ml de IRA-45 (cycle acétique), lave la résine par 100 ml d'acide acétique 0,1N, filtre les solutions réunies, évapore à sec, triture le résidu dans de l'éther contenant 25% de méthanol, filtre, lave à l'éther et sèche. On obtient ainsi 447 mg (89%) de L-aspartyl-L-arginyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalaninyl-L-histidyl-L-leucine de F. 285-290° (déc.). $[\alpha]_D^{22} = -74^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,6$; acide acétique 0,05N). $Rf_M^b = 0,18$; $Rf_A^b = 0,38$; $Rf_P^b = 0,20$. $E_{8,8}^0 = 0,5$ His; $E_{1,9}^0 = 1,0$ Val (révélation par ninhydrine, chlore, bleu de bromophénol, FOLIN, PAULY et SAKAGUCHI; homogène). Point isoélectrique $7,5 \pm 0,2$. Après hydrolyse totale dans HCl 6N (110° ; 14 h), on obtient les acides aminés composants dans les rapports: Asp 0,95, Arg 1,00, Val 1,84, Tyr 1,05 His 2,00, Phe 0,95, Leu 1,17 et Pro (présent mais non déterminé).



Les activités biologiques ont été déterminées par le Dr E. STÜRMER³⁷). Par rapport à la Val⁵-hypertensine-II-Asp- β -amide CIBA, le décapeptide XXXI a montré, sur une base molaire, une activité de 110% sur la pression sanguine du Rat et de 120% sur l'ileum isolé du Cobaye.

Attaques enzymatiques

Produits utilisés: Chymotrypsine cristallisée; trypsine 2 $\times$ cristallisée; carboxypeptidase (toutes les trois de Nutritional Biochemicals Co., Cleveland). – Solution tampon de pH 8,5: On mélange de l'acide acétique 1N et du NH_4OH 1N de façon à obtenir exactement un pH de 8,5.

I) Hexapeptide H-L-Val-L-His-L-Pro-D-Phe-L-His-L-Leu-OH. On dissout 18,0 mg (20 μ moles) d'ester hexapeptidique XIII dans l'acide acétique aqueux à 75%, hydrogène pendant 6 h en présence de 10 mg de catalyseur d'hydrogénation selon KUHN⁴⁵), sépare le catalyseur par filtration, évapore le filtrat à sec et sèche le résidu sur KOH au vide poussé. On obtient ainsi 16,0 mg de produit homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse (révélation par ninhydrine et chlore) que l'on utilise directement pour les attaques ci-dessous.

a) Attaque à la chymotrypsine: On dissout 1,5 mg d'hexapeptide obtenu ci-dessus dans 0,15 ml de tampon de pH 8,5, ajoute 0,18 mg de chymotrypsine, ajuste le pH à 8,5 et maintient la solu-

tion obtenue à 23°. On prélève des aliquotes après 30 min, 1 h, 4 h et 24 h. Immédiatement après le prélèvement, les aliquotes sont versées dans un volume égal d'acide acétique glacial, puis soumises à l'électrophorèse sur papier au pH 1,9. Même après 24 h, l'hexapeptide ne subit aucun changement ($E_{1,9}^0 = 1,3$ Glu = 1,1 Val).

b) *Attaque à la carboxypeptidase*: On dissout 1,5 mg d'hexapeptide obtenu ci-dessus dans 0,15 ml de tampon de pH 8,5, ajoute 0,1 mg de carboxypeptidase dissoute dans 5 μ l de NH_4OH 1N, ajuste le pH à 8,5, maintient la solution obtenue à 23° et prélève des aliquotes après 30 min, 1 h, 3 h et 24 h. Après 1 h déjà, la totalité de la leucine est libérée et l'unique peptide résiduel, migrant un peu plus vite ($E_{1,9}^0 = 1,2$ Val) que l'hexapeptide de départ, reste sans changement, même après une digestion de 24 h. Après élution et hydrolyse acide totale de ce peptide, on obtient Val, His, Pro et Phe.

III) *Hexapeptide H-L-Val-L-His-L-Pro-L-Phe-L-His-L-Leu-OH*. Cet hexapeptide est obtenu après hydrogénolyse des groupes protecteurs de l'ester hexapeptidique XXVIII dans les conditions décrites ci-dessus pour son isomère D. Le produit obtenu est également homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse (révélation par ninhydrine et chlore).

a) *Attaque à la chymotrypsine*: On dissout 3,0 mg de produit et 0,3 mg de chymotrypsine dans 0,3 ml de tampon de pH 8,5. L'attaque est complète après 90 min déjà. On obtient deux nouveaux peptides, l'un migrant plus vite ($E_{1,9}^0 = 0,9$ His) que l'hexapeptide de départ et l'autre moins vite ($E_{1,9}^0 = 1,0$ Val). Il ne reste aucun autre peptide résiduel et les deux fragments obtenus ne subissent pas de changement, même après prolongation de l'attaque pendant 24 h. Par hydrolyse totale, le premier fournit Leu et His et le second donne Val, His, Pro et Phe.

b) *Attaque à la carboxypeptidase*: Dans les conditions décrites ci-dessus, il y a, après 90 min déjà, libération d'histidine et de la totalité de la leucine et de la phénylalanine. L'unique peptide résiduel reste sans changement, même après 24 h d'attaque. Il migre légèrement plus vite ($E_{1,9}^0 = 1,2$ Val) que l'hexapeptide de départ et fournit après hydrolyse totale Val, His et Pro.

III) *Val⁵-D-Phe⁸-Angiotensine-I (XXV)*. – a) *Attaque à la chymotrypsine*: On dissout 3,0 mg de décapeptide XXV dans 0,3 ml de NH_4OH 0,01N, ajoute 0,3 mg de chymotrypsine, ajuste le pH à 8,5 à l'aide d'acide acétique 0,1N, agite à 23° et prélève des aliquotes après 30 min, 2 h et 24 h. Après 2 h déjà, la scission est totale. On obtient deux nouveaux peptides sans aucun autre peptide résiduel. Le premier, migrant plus vite ($E_{1,9}^0 = 1,1$ Val) que le décapeptide XXV ($E_{1,9}^0 = 1,0$ Val), fournit après élution et hydrolyse totale Val, His, Pro, Phe et Leu. Le second migre moins vite ($E_{1,9}^0 = 1,0$ Glu) et donne par hydrolyse Asp, Arg, Val et Tyr.

b) *Attaque à la carboxypeptidase*: On dissout 2,5 mg de décapeptide XXV et 0,15 mg de carboxypeptidase dans 0,25 ml de NH_4OH 1N, ajuste le pH à 8,5 à l'aide d'acide acétique 1N, agite à 23° et prélève des aliquotes après 30 min, 2 h et 24 h. Après 2 h déjà, la totalité de la leucine est libérée et l'unique peptide résiduel, ayant la même mobilité électrophorétique que le décapeptide XXV, ne subit pas de changement, même après 24 h de digestion. Par hydrolyse totale, il fournit Asp, Arg, Val, Tyr, His, Pro et Phe.

c) *Attaque à la trypsine*: A une solution de 2,5 mg de décapeptide XXV dans 0,3 ml de NH_4OH 0,1N on ajoute 0,2 mg de trypsine puis ramène le pH avec précaution à 8,5. On agite à 23° et prélève des aliquotes après 1 h, 2 h, 4 h et 24 h. L'attaque qui ne devient totale qu'après 4 h provoque la scission complète en deux fragments, sans aucun autre peptide résiduel, fragments demeurant sans changement même après 24 h de digestion. Le premier, migrant plus vite ($E_{1,9}^0 = 0,8$ His) que le décapeptide XXV, donne après hydrolyse totale Asp et Arg. Le second migre moins vite ($E_{1,9}^0 = 1,0$ Glu) et fournit après hydrolyse Val, Tyr, His, Pro, Phe et Leu.

IV) *Val⁵-Angiotensine-I (XXXI)*. Les attaques par les trois enzymes, la chymotrypsine, la carboxypeptidase et la trypsine, ont été effectuées exactement dans les mêmes conditions que pour la Val⁵-D-Phe⁸-angiotensine-I (XXV) ci-dessus.

a) *Attaque à la chymotrypsine*: Après 2 h il y a déjà une scission complète du décapeptide XXXI en trois fragments. Une prolongation d'attaque pendant 24 h ne provoque pas de changement. Le premier fragment, migrant le plus vite ($E_{1,9}^0 = 0,9$ His), donne après hydrolyse totale His et Leu. Le second, ayant la même mobilité électrophorétique que le décapeptide XXXI, fournit après hydrolyse Val, His, Pro et Phe. Le troisième fragment migre moins vite ($E_{1,9}^0 = 1,0$ Glu) et donne par hydrolyse Asp, Arg, Val et Tyr.

b) *Attaque à la carboxypeptidase*: Cet enzyme libère après 2 h déjà His et la totalité de Leu et Phe. L'unique peptide résiduel, demeurant inchangé même après 24 h de digestion, migre moins vite ($E_{1,9}^0 = 1,0$ Leu) que le décapeptide XXXI. Après hydrolyse acide totale, il fournit Asp, Arg, Tyr, Val, His et Pro; il contient également la leucine dont la tache coïncide avec celle de l'heptapeptide au pH 1,9.

c) *Attaque à la trypsine*: Il se produit après 24 h une scission complète du décapeptide en deux fragments. Le premier migrant plus vite ($E_{1,9}^0 = 0,8$ His) que le décapeptide XXXI, fournit après hydrolyse Asp et Arg. Le seconde migre moins vite ($E_{1,9}^0 = 1,0$ Asp) et donne par hydrolyse totale Val, His, Pro, Phe, Tyr et Leu.

SUMMARY

Val⁵-angiotensin-I and one of its optical isomers, Val⁵-D-Phe⁸-angiotensin-I, were synthesized by a new way excluding any possibility of racemisation. The optical purity of the intermediary and final peptides was furthermore ascertained by enzymatic degradation. Val⁵-angiotensin-I exhibited the full biological activity expected. Val⁵-D-Phe⁸-angiotensin-I was found to be practically inactive. It failed also to antagonize Val⁵- or Ileu⁵-angiotensin-I or to inhibit «converting enzyme».

Laboratoires de Chimie Pharmaceutique SANDOZ, Bâle

86. Die Wechselwirkung von Polymyxin B mit zweiwertigen Kationen in wässriger Lösung

von H. Brintzinger

(2. III. 61)

Von NEWTON¹⁾ ist festgestellt worden, dass die Zugabe gewisser Metallionen wie Mg²⁺ zum Nährmedium die bakteriostatische Wirkung von Polymyxinen *in vitro* aufzuheben vermag.

Dieser Befund kann, worauf auch NEWTON hinweist, zunächst auf zwei Arten verstanden werden: Entweder hebt eine Komplexbildung zwischen Polymyxin und zugegebenem Metallion die bakteriostatische Wirkung des ersteren auf, oder aber es wird eine – durch das positiv geladene Polymyxin bewirkte – kompetitive Verdrängung des Metallions aus bestimmten Haftstellen des Organismus durch die Erhöhung der Metallionenkonzentration wieder rückgängig gemacht. Wir stellten uns die Aufgabe, – zunächst in wässriger Lösung – die Reaktion von Polymyxin B²⁾ mit zweiwertigen Kationen auf der einen, und mit solchen Ligandsystemen auf der anderen Seite zu studieren, deren biologische Bedeutung mit ihrer Tendenz zur Bildung von Mg²⁺-Komplexen verknüpft ist.

Polymyxin B ist ein cyclisches Decapeptid, dem – Abbauuntersuchungen verschiedener Autoren^{3a)} sowie einer Reihe synthetischer Arbeiten von K. VÖGLER & Mitarb.^{3b)} zufolge – eine der in Fig. 1 dargestellten Strukturen zuzuschreiben ist. Es besitzt 5 freie Aminogruppen von α, γ -Diaminobuttersäure-Bausteinen und ist deshalb und wegen der Möglichkeit zur Acidokomplexbildung an den Amid-Gruppierungen ein potentieller Chelat-Komplexbildner.

¹⁾ B. A. NEWTON, Nature 172, 160 (1953).