

1-(γ -Méthoxy- β -diéthylaminocarbamyloxy-propyl)-5-phényl-5-éthyl-malonylurée (LIII). Même procédé que pour XLVII; 5 g de phénobarbital sodique et 4,4 g de LX donnent 5,1 g de substance (71%). Huile épaisse incolore.

Les composés LIV–LVIII ont été préparés selon le même procédé.

LIV a pu être distillé. Eb. 220°/0,05 Torr. Rendement 40%. Les substances du tableau 7 LIII–LVIII sont toutes des laques adhésives et incolores.

SUMMARY

Some new carbamates and N-substituted barbituric acids with carbamated side chain have been prepared. Several of these substances show interesting pharmacological properties.

SAPOS S.A. Genève, Laboratoire de Recherches

15. Synthèse de la Ileu⁸-oxytocine et de la Val⁸-oxytocine, deux analogues de l'oxytocine modifiés dans la chaîne latérale

par P.-A. Jaquenoud et R. A. Boissonnas

(2 XII 60)

Plus de vingt analogues synthétiques de l'oxytocine portant des modifications dans la partie cyclique de la molécule ont déjà été décrits jusqu'à ce jour¹⁻¹²) et certaines relations ont pu être établies entre leur structure chimique et leurs activités biologiques¹³).

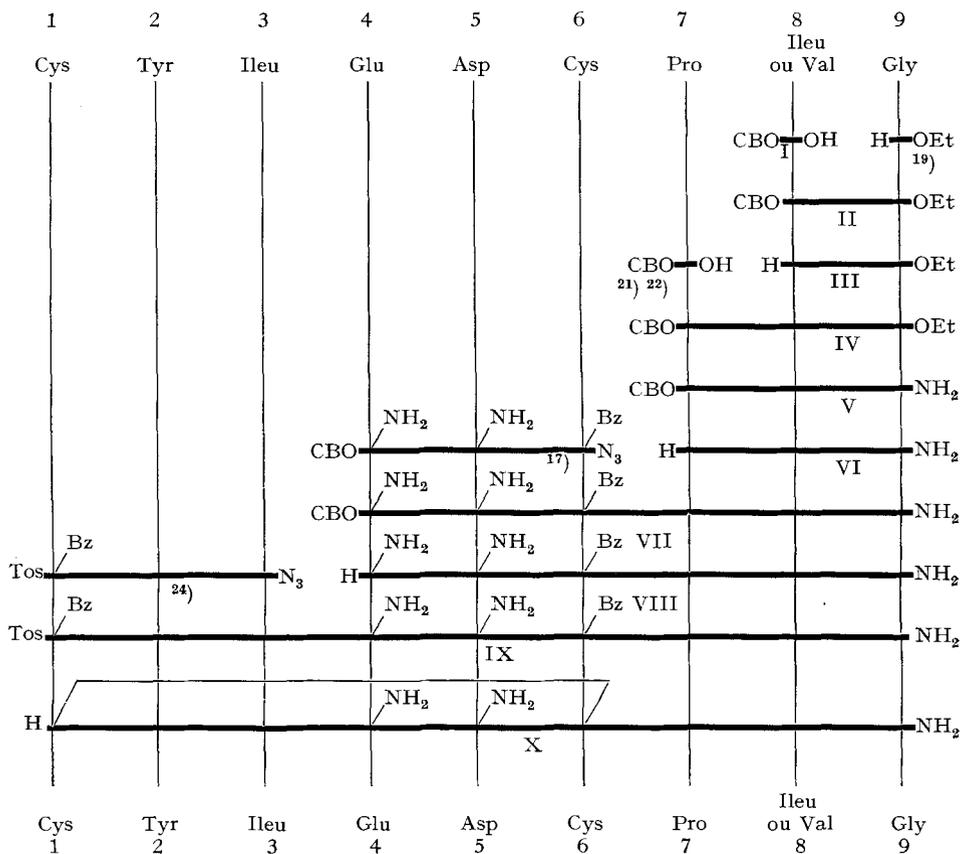
Par contre nos connaissances ne sont encore que très fragmentaires quant aux conséquences de modifications dans la chaîne latérale de l'oxytocine. L'étude des

- 1) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, *Helv.* **39**, 1421 (1956).
- 2) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, J.-P. WALLER, H. KONZETT & B. BERDE, *Nature* **178**, 260 (1956).
- 3) J. RUDINGER, J. HONZL & M. ZAORAL, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* **27**, 770 (1956).
- 4) B. BERDE, W. DOEPFNER & H. KONZETT, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* **12**, 209 (1957).
- 5) P. G. KATSOYANNIS, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 109 (1957); ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, R. A. BOISSONNAS, H. KONZETT & B. BERDE, *Naturwissenschaften* **44**, 632 (1957); CH. RESSLER & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 4511, (1957); W. B. LUTZ, CH. RESSLER, D. E. NETTLETON & V. DU VIGNEAUD, *ibid.* **81**, 167 (1959).
- 6) P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **42**, 788 (1959).
- 7) M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 1258, 6072 (1959).
- 8) H. KONZETT & B. BERDE, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* **14**, 333 (1959).
- 9) R. A. BOISSONNAS & ST. GUTTMANN, *Helv.* **43**, 190 (1960).
- 10) ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **43**, 200 (1960).
- 11) H. C. BEYERMAN, J. S. BONTEKOE & A. C. KOCH, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **79**, 1034, 1039, 1044, 1050 (1960); H. L. LAW & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 4579 (1960).
- 12) R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **44**, 213 (1961).
- 13) Pour une revue sur l'influence de ces modifications sur les propriétés biologiques, voir les articles de H. KONZETT et de R. A. BOISSONNAS dans «Symposium on polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels» (Londres, 23–24 mars 1959), Pergamon Press, Londres (1960).

propriétés de l'Arg⁸-oxytocine (arginine-vasotocine)¹⁴⁾ et de la Lys⁸-oxytocine (lysine-vasotocine)¹⁵⁾ nous a seulement montré que l'introduction d'une fonction basique en position 8 de la molécule de l'oxytocine diminue les propriétés oxytociques et augmente les propriétés vasopressives et antidiurétiques¹³⁾. Nous savons d'autre part que la suppression totale de la chaîne latérale fait complètement disparaître l'activité biologique¹⁶⁾.

Nous nous sommes donc proposé d'étudier l'influence de faibles modifications de structure dans la chaîne latérale en remplaçant la leucine en position 8 par d'autres acides aminés aliphatiques. Dans le présent travail, nous décrivons la synthèse de l'Ileu⁸-oxytocine et de la Val⁸-oxytocine.

SCHÉMA DE SYNTHÈSE



Abréviations: CBO = carbobenzoxy; Bz = benzyl; Tos = tosyl = p-toluène-sulfonyl.

¹⁴⁾ P. G. KATSOYANNIS & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **233**, 1352 (1958). Des propriétés biologiques complémentaires peuvent être tirées du travail de H. B. VAN DYKE, «Vasopressins», présenté au 21^e Congrès intern. de physiologie à Buenos-Aires en août 1959.

¹⁵⁾ R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, *Helv.* **43**, 182 (1960).

¹⁶⁾ CH. RESSLER, *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.* **92**, 725 (1956); B. ISELIN & M. FEURER (1956), cités par R. SCHWYZER, *Chimia* **72**, 53 (1958).

Les méthodes de synthèses que nous avons utilisées (voir schéma ci-contre) sont basées sur le procédé 3 + (3 + 3) que nous avons employé précédemment^{1) 6) 9) 10) 17) 18)}.

La CBO-L-isoleucine (Ia) et le glycinate d'éthyle¹⁹⁾ sont condensés par la dicyclohexyl-carbodiimide²⁰⁾ en N-CBO-L-isoleucyl-glycinate d'éthyle (IIa). Après éloignement du groupe CBO par une solution de gaz bromhydrique dans l'acide acétique glacial, le L-isoleucyl-glycinate d'éthyle (IIIa) obtenu est condensé avec la N-CBO-L-proline^{21) 22)} par la méthode à l'anhydride mixte²³⁾. L'ester tripeptidique IVa obtenu est amidifié en N-CBO-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (Va). La scission du groupe CBO par le gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre conduit au L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VIa), qui est condensé avec le N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-azide¹⁷⁾ en N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VIIa).

Après scission du groupe CBO par le gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, l'hexapeptide libre VIIIa obtenu est condensé avec le N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyl-L-isoleucyl-azide²⁴⁾ en N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (IXa). En utilisant la N-CBO-L-valine²²⁾ à la place de la N-CBO-L-isoleucine, on parvient par la même suite de réactions au N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyl-L-valyl-glycinamide (IXb).

La pureté de tous les peptides protégés intermédiaires a été contrôlée par chromatographie sur papier et par électrophorèse à haute tension sur papier, après scission éventuelle du groupe CBO du peptide protégé à examiner, par le gaz bromhydrique dans l'acide acétique glacial. Tous les produits ainsi obtenus se sont montrés homogènes après révélation par une série de réactifs différents²⁵⁾.

Les groupes protecteurs (N-tosyl et S-benzyl) des deux nonapeptides protégés (IXa et IXb) ont été enlevés par traitement au sodium dans l'ammoniac liquide²⁶⁾. Après oxydation à l'air en solution aqueuse diluée, les nonapeptides cycliques obtenus ont été soumis à un contre-courant pour les débarasser de quelques impuretés peptidiques mineures²⁷⁾.

¹⁷⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, *Helv.* **38**, 1491 (1955).

¹⁸⁾ R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, *Helv.* **43**, 182 (1960).

¹⁹⁾ R. HILLMANN, *Z. Naturforschung* **7**, 682 (1946).

²⁰⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

²¹⁾ A. BERGER, O. KURTZ & E. KATSCHALSKI, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5552 (1954).

²²⁾ W. GRASSMANN & E. WÜNSCH, *Chem. Ber.* **97**, 462 (1958).

²³⁾ 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, 5553 (1951); **74**, 676 (1952).

²⁴⁾ J. HONZL & J. RUDINGER, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* **20**, 1190 (1955); P. G. KATSOYANNIS & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **233**, 1352 (1958).

²⁵⁾ Voir la partie expérimentale.

²⁶⁾ V. DU VIGNEAUD, CH. RESSLER, J. M. SWAN, C. W. ROBERTS & P. G. KATSOYANNIS, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 3115 (1954).

²⁷⁾ Dans le cas des analogues de l'oxytocine, comme celui de l'oxytocine elle-même, la cyclisation oxydative donne toujours naissance, à côté du monomère cyclique désiré, à de petites quantités de dimère et de polymères (cf. N. H. RYDON et coll., *J. chem. Soc.* **1956**, 3157).

Activités biologiques

Formule chimique et désignation	Coefficient de répartition entre sec-butanol et acide acétique 0,017 N	Activités oxytociques en unités internationales par mg ²⁸⁾				Activités vasopressives en unités internationales par mg ²⁸⁾	
		Contraction de l'utérus de Chat <i>in situ</i>	Contraction de l'utérus isolé de Rat	Baisse de la pression sanguine du Coq	Augmentation de la pression interne de la glande mammaire du Lapin	Augmentation de la pression sanguine du Rat	Inhibition de la diurèse du Rat
H-CyS-Tyr-Ileu-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Ileu-Gly-NH ₂ Ileu ⁸ -oxytocine (X a)	0,32	563 (±74)	289 (±21)	498 (±37)	328 (±21)	6 (±1)	1,1 (±0,1)
H-CyS-Tyr-Ileu-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Val-Gly-NH ₂ Val ⁸ -oxytocine (X b)	0,22	380 (±40)	200 (±15)	280 (±17)	310 (±20)	9 (±1)	0,8 (±0,1)
H-CyS-Tyr-Ileu-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Oxytocine ¹⁷⁾ 26)	0,41	450 (±30)	450 (±30)	450 (±30)	450 (±30)	5 (±1)	5 (±1)
H-CyS-Tyr-Val-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Val ³ -oxytocine ^{1) 2) 3) 4) 29)}	0,37	226 (±17)	59 (±8)	57 (±4)	207 (±14)	0,2	0,8
H-CyS-Tyr-Leu-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Leu ³ -oxytocine ^{1) 3) 4) 29)}	0,43	~100	45 ± 7	42 ± 1	101 ± 13	~5	~5

L'Ileu⁸-oxytocine (Xa) et la Val⁸-oxytocine (Xb) ainsi purifiées se sont montrées complètement homogènes, après révélation au moyen d'une série de réactifs²⁵⁾, à la chromatographie sur papier et à l'électrophorèse sur papier sous haut voltage dans différentes conditions.

Les activités biologiques de ces deux nouveaux analogues ont été déterminées par le Dr B. BERDE et le Prof. H. KONZETT de notre département pharmacologique (Dir.: Dr A. CERLETTI²⁸⁾). Elles sont indiquées dans le tableau ci-contre.

Il ressort de ces valeurs que, par rapport à l'oxytocine, l'Ileu⁸-oxytocine est nettement plus active sur la contraction de l'utérus de Chat *in situ*, aussi active sur la baisse de la pression sanguine du Coq et un peu moins active sur la contraction de l'utérus isolé de Rat et sur la pression interne de la glande mammaire du Lapin. Par contre la Val⁸-oxytocine est légèrement moins active que l'oxytocine dans ces quatre types d'essais.

Il est intéressant de comparer ces valeurs à celles qui avaient été obtenues pour la Val³-oxytocine^{1) 2) 3) 4) 28) 29)} et la Leu³-oxytocine^{1) 3) 4) 28) 29)}. Alors que le remplacement de la leucine en position 8 par l'isoleucine ou la valine n'affecte que relativement peu les propriétés biologiques, au contraire le remplacement de l'isoleucine en position 3 par la valine ou par la leucine diminue plus nettement ces activités, cette diminution étant toutefois beaucoup plus marquée pour certains types d'activité que pour d'autres.

La synthèse de l'Ileu⁸-oxytocine constitue le premier exemple d'obtention d'un analogue synthétique de l'oxytocine possédant, dans un test pharmacologique très proche des conditions d'action physiologique normales, une activité oxytocique supérieure à celle de l'hormone naturelle.

Partie expérimentale³⁰⁾

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 CRAIG³¹⁾.

Les chromatographies sur papier ont été faites par la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040 b lavé». Rf_M dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:20); Rf_P dans le mélange n-butanol/acide acétique/eau (70:10:20); Rf_A dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/eau (35:35:30). 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^o sans traitement préalable.

Les électrophorèses sur papier ont été effectuées dans l'appareil à électrophorèse sous haute tension de WIELAND & PFLEIDERER³²⁾: au pH 1,9 (E_{1,9}) dans le mélange acide formique/acide

²⁸⁾ B. BERDE & H. KONZETT, *Medicina experimentalis* 2, 317 (1960); B. BERDE & H. KONZETT, à publier. Les déterminations des activités biologiques ont été effectuées selon les méthodes précédemment utilisées^{4) 8)}. Les activités sont exprimées par rapport au «Troisième standard international pour la détermination des activités oxytociques, vasopressiques et antidiurétiques».

²⁹⁾ B. BERDE, A. CERLETTI & H. KONZETT, «Symposium sur l'oxytocine», 17–19 août 1959, Montevideo.

³⁰⁾ Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr W. SCHÖNIGER).

³¹⁾ L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, *Analyt. Chemistry* 22, 1462 (1950).

³²⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 67, 257 (1955).

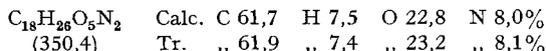
acétique/eau (15:10:75); au pH 5,8 ($E_{5,8}$) dans le mélange pyridine/acide acétique/eau (9:1:90). $E_{1,9} = 0,8$ His indique qu'à pH 1,9 la substance migre 0,8 fois la distance que migre l'histidine. Les exposants a et o ont la même signification que pour les chromatogrammes.

Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et des phérogrammes ont été décrits précédemment¹⁰⁾¹⁸⁾.

a) Synthèse de la Ileu^a-oxytocine

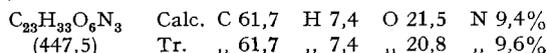
N-CBO-L-Isoleucine (Ia). On dissout 7,9 g (60 mmoles) de L-isoleucine dans 30 ml de NaOH 2N et ajoute 7,0 g (66 mmoles) de Na_2CO_3 en solution dans 100 ml d'eau. A cette solution, on ajoute à 20° en 30 min sous forte agitation 12 ml (70 mmoles) de chloroformiate de benzyle à 90%³³⁾. On maintient le pH à 8 pendant les 3 h de la réaction par d'éventuelles adjonctions de Na_2CO_3 1M, puis extrait l'excès de chloroformiate de benzyle avec 40 ml d'éther. On acidifie la phase aqueuse par HCl 6N jusqu'à pH 1, extrait l'huile formée par 3 fois 60 ml d'éther, sèche les fractions étherées sur Na_2SO_4 , évapore l'éther sous vide et reprend plusieurs fois l'huile résiduelle par le toluène anhydre en évaporant au vide chaque fois, afin d'éliminer toute humidité. On obtient 14,1 g (89%) de N-CBO-L-isoleucine sous forme d'une huile incolore.

N-CBO-L-Isoleucyl-glycinate d'éthyle (IIa). On dissout dans 100 ml d'acétonitrile 14,0 g (52 mmoles) de N-CBO-L-isoleucine (Ia), 5,9 g (57 mmoles) de glycinate d'éthyle (base libre fraîchement distillée¹⁹⁾, refroidit à 0°, ajoute 14,5 g (70 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide²⁰⁾ et agite pendant une nuit à 20°. Dès le début de la réaction, il se forme un abondant précipité que l'on filtre le lendemain. On traite séparément le précipité et le filtrat. a) Le précipité est suspendu à reflux dans 250 ml d'acétate d'éthyle bouillant, afin de dissoudre le N-CBO-L-isoleucyl-glycinate d'éthyle. On filtre à chaud de la dicyclohexylurée insoluble. Ce filtrat cristallise à 0° en longues aiguilles que l'on filtre. Il s'agit d'une première fraction de N-CBO-L-isoleucyl-glycinate d'éthyle pratiquement pur de F. 158°. b) Le filtrat est évaporé sous vide. On dissout le résidu solide dans 400 ml d'acétate d'éthyle et lave par 3 fois 80 ml de HCl 1N, 4 fois 80 ml de NH_4OH 1N, et 2 fois 80 ml de NaCl 15%. Après séchage sur Na_2SO_4 , on concentre sous vide jusqu'à apparition de cristaux, ajoute lentement de l'éther de pétrole et laisse une nuit à 0°. On filtre et sèche au vide cette deuxième fraction de N-CBO-L-isoleucyl-glycinate d'éthyle de F. 152°. Les deux fractions de dipeptide réunies (13,6 g) sont recristallisées dans 70 ml de méthanol bouillant. Après repos à 0°, on filtre et sèche les cristaux formés. On obtient 11,3 g (62%) de N-CBO-L-isoleucyl-glycinate d'éthyle de F. 159°. $[\alpha]_D^{22} = -24,6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,4$; méthanol). $Rf_M^a = 0,83$; $Rf_A^a = 0,75$; $E_{1,9}^a = 1,2$ Glu; $E_{5,8}^a = 1,3$ His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).



N-CBO-L-Prolyl-L-isoleucyl-glycinate d'éthyle (IVa). On dissout 7,0 g (20 mmoles) de N-CBO-L-isoleucyl-glycinate d'éthyle (IIa) dans 30 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après avoir laissé reposer 1 h, on évapore au vide, triture plusieurs fois le résidu à l'éther anhydre et décante. Le bromhydrate de L-isoleucyl-glycinate d'éthyle huileux ainsi obtenu est dissout dans 50 ml de chloroforme à 0°.

D'autre part, on dissout 5,0 g (20 mmoles) de N-CBO-L-proline cristallisée²¹⁾²²⁾ dans 30 ml de chloroforme anhydre avec 2,8 ml (20 mmoles) de triéthylamine anhydre, refroidit à -5° et ajoute en quelques min sous agitation 1,9 ml (20 mmoles) de chloroformiate d'éthyle. Après 5 min on ajoute la solution chloroformique de bromhydrate de L-isoleucyl-glycinate d'éthyle et 3,0 ml (21 mmoles) de triéthylamine. On agite le tout 3 h, lave la solution par 3 fois 30 ml d'HCl 1N, 4 fois 30 ml d' NH_4OH 1N et 3 fois 30 ml d'eau et sèche sur Na_2SO_4 . On évapore le chloroforme sous vide et triture la masse cristalline obtenue avec de l'éther de pétrole, filtre et sèche. On obtient 7,7 g (86%) de N-CBO-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinate d'éthyle de F. 151°. $[\alpha]_D^{22} = -80,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; méthanol). $Rf_M^a = 0,70$; $Rf_A^a = 0,75$; $E_{5,8}^a = 1,1$ His; $E_{1,9}^a = 1,1$ Try = 0,9 Glu (révélation par isatine, ninhydrine et chlore; homogène).



³³⁾ Organic Syntheses 23, 13 (1942).

N-CBO-L-Prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (Va). On dissout en chauffant légèrement 6,0 g (13,4 mmoles) de *N-CBO-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinate d'éthyle (IVa)* dans 150 ml d'éthanol à 95% et sature la solution refroidie à 0° par un courant de gaz ammoniac et laisse reposer 70 h à 20°. On vérifie alors par chromatographie que tout le tripeptide ester soit amidifié, et évapore à sec sous vide à 40°. On suspend la masse cristalline ainsi obtenue à reflux dans 50 ml d'acétate d'éthyle, laisse reposer une nuit à 0°, filtre et sèche. On obtient 5,1 g (91%) de *N-CBO-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide* de F. 178°. $[\alpha]_D^{22} = -69,4 \pm 1^\circ$ ($c = 1,9$; méthanol). $Rf_M^A = 0,50$; $Rf_A^A = 0,58$; $E_{5,8}^A = 1,2$ His; $E_{1,9}^A = 1,1$ Try = 0,9 Glu (révélation par isatine, ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{21}H_{30}O_5N_4$	Calc.	C 60,3	H 7,2	O 19,1	N 13,4%
(418,5)	Tr.	„ 60,5	„ 7,6	„ 18,8	„ 13,5%

L-Prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VIa). On dissout 4,0 g (9,5 mmoles) de *N-CBO-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (Va)* dans 15 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à 20° et évapore sous vide à 35°. On dissout le résidu dans 15 ml d'eau, extrait le bromure de benzyle par 2 fois 15 ml d'éther et dilue la phase aqueuse par 80 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution sur une colonne d'Amberlite IRA-410 (base libre, lavée au méthanol) jusqu'à disparition des ions Br^- , on évapore le filtrat sous vide à 35° et triture le résidu avec de l'acétate d'éthyle. Après filtration et séchage, on obtient 2,42 g (89%) de *L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide* de F. 118° (instantané). $[\alpha]_D^{22} = -63 \pm 1^\circ$ ($c = 2$; acide acétique glacial). $Rf_M^O = 0,50$; $Rf_A^O = 0,58$; $E_{5,8}^O = 1,2$ His; $E_{1,9}^O = 1,1$ Try = 0,9 Glu (révélation par isatine, ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{13}H_{24}O_3N_4$	Calc.	C 54,9	H 8,5	O 16,9	N 19,7%
(284,4)	Tr.	„ 54,6	„ 8,6	„ 17,1	„ 19,9%

N-CBO-L-Glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VIIa). On dissout 1,7 g (6,0 mmoles) de *L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VIa)* et 3,4 g (5,5 mmoles) de *N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VIIa)* dans 45 ml de diméthylformamide. Après 40 h à 20° d'agitation et concentration à la moitié du volume sous vide à 50°, on ajoute 50 ml d'acétone à la solution encore chaude, laisse refroidir, filtre, lave à l'éther et sèche. Le produit ainsi obtenu est remis en solution dans 35 ml de diméthylformamide préalablement chauffé à 70°. On concentre cette solution à la moitié de son volume sous vide à 50°, ajoute 20 ml d'acétone, laisse refroidir, filtre et lave par l'acétone et l'éther. Après séchage au vide, on obtient 2,5 g (54%) de *N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide* de F. 232° (déc.). $[\alpha]_D^{23} = -70 \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%), $-44 \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_A^A = 0,54$; $E_{1,9}^A = 0,6$ Try; $E_{5,8}^A = 0,7$ His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{40}H_{55}O_{10}N_9S + H_2O$	Calc.	C 55,2	H 6,5	O 20,2	N 14,4	S 3,7%
(854,0 + 18,0)	Tr.	„ 55,1	„ 6,4	„ 19,9	„ 14,0	„ 3,8%

L-Glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VIIIa). On dissout à 20° 2,0 g (2,3 mmoles) de *N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VIIa)* dans 20 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après 90 min, on évapore à sec sous vide à 35°, triture le résidu avec de l'éther anhydre, filtre le produit pulvérisé obtenu et dissout immédiatement celui-ci dans 50 ml de méthanol. On fait passer cette solution sur une colonne d'Amberlite IRA-410 (base libre, lavée au méthanol) et vérifie la disparition des ions Br^- . Après avoir rincé l'Amberlite avec du méthanol frais, on évapore les solutions réunies sous vide à 35°, triture le résidu dans l'acétate d'éthyle, filtre, rince à l'éther et sèche au vide. On obtient 1,4 g (85%) de *L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide* de F. (instantané) 160°. $[\alpha]_D^{21} = -68 \pm 1^\circ$ ($c = 2$; acide acétique anhydre). $Rf_A^O = 0,5$; $E_{5,8}^O = 0,7$ His; $E_{1,9}^O = 0,6$ Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{32}H_{40}O_8N_9S + H_2O$	Calc.	C 52,1	H 7,0	O 19,5	N 17,1	S 4,3%
(719,9 + 18,0)	Tr.	„ 51,6	„ 7,3	„ 20,0	„ 15,6	„ 4,3%

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (IXa). On dissout dans 20 ml de diméthylformamide 1,37 g (1,9 mmoles) de L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VIIIa) et 1,20 g (1,8 mmoles) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-azide²⁴). Après deux jours d'agitation à 20° et lente concentration au vide à la moitié du volume, on ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave le précipité à l'acétate d'éthyle et sèche au vide. On suspend le produit obtenu dans 30 ml de méthanol bouillant, filtre et répète une seconde fois cette purification. Après séchage au vide, on obtient 1,44 g (59%) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide de F. 268–270° (déc.). $[\alpha]_D^{21} = -28 \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$; diméthylformamide).

$C_{64}H_{86}O_{14}N_{12}S_3$	Calc.	C 57,2	H 6,5	O 16,7	N 12,5	S 7,2%
(1343,6)	Tr.	,, 56,5	,, 6,6	,, 17,2	,, 12,7	,, 7,6%

Ileu⁸-Oxytocine (Xa). On dissout 268 mg (0,2 mmoles) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (IXa) dans 200 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium, et sous agitation on ajoute lentement du sodium jusqu'à apparition d'une teinte bleue. Après adjonction de 80 mg de NH₄Cl on évapore à sec sous vide, dissout le résidu dans 200 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH de la solution à 8,8 et fait passer un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. On acidifie au pH 4,5 cette solution que l'on concentre sous vide à la moitié de son volume, équilibre avec du sec.-butanol et introduit dans les quatre premiers tubes d'un appareil de contre-courant. Après 237 transferts dans le système sec.-butanol – acide acétique 0,017N, on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes³⁴). On obtient un sommet principal $K = 0,32$ et un sommet secondaire $K = 0,15$. Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré sous vide. Le produit obtenu qui représente environ la moitié de l'azote peptidique ainsi que 80% de l'activité mis dans l'appareil, est homogène à la chromatographie ($Rf_M^O = 0,6$; $Rf_A^O = 0,5$; $Rf_P^O = 0,4$) et à l'électrophorèse ($E_{1,9}^O = 0,6$ Try; $E_{5,8}^O = 0,5$ Try) après révélation par ninhydrine et chlore.

Activités biologiques²⁸ de l'Ileu⁸-oxytocine exprimées en unités internationales par mg: Utérus de Chat *in situ* 563 (± 74); utérus de Rat isolé 289 (± 21); baisse de la pression sanguine du Coq 498 (± 37); pression interne de la glande mammaire du Lapin 328 (± 21); pression sanguine du Rat 6 (± 1); inhibition de la diurèse du Rat 1,1 ($\pm 0,1$).

b) Synthèse de la Val⁸-oxytocine

N-CBO-L-Valyl-glycinate d'éthyle (IIb). On dissout dans 50 ml de chlorure de méthylène 5,0 g (20 mmoles) de N-CBO-L-valine²²), 2,2 g (21 mmoles) de glycinate d'éthyle fraîchement distillé¹⁹), refroidit à 0° et ajoute 5,0 g (24 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide²⁰). Après avoir agité 1 nuit à 20°, on filtre de la dicyclohexylurée formée et rince avec du chlorure de méthylène. On lave le filtrat par 3 fois 20 ml d'HCl 1N, 3 fois 20 ml d'NH₄OH 1N et 3 fois 20 ml d'eau, on sèche rapidement sur Na₂SO₄ et évapore à sec sous vide. On dissout le résidu dans 40 ml de méthanol bouillant. Par refroidissement et repos une nuit à 0° il se forme des cristaux que l'on filtre et sèche au vide. On obtient 4,2 g (63%) de N-CBO-L-valyl-glycinate d'éthyle de F. 167°. $[\alpha]_D^{22} = -31,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol). $Rf_M^a = 0,7$; $E_{1,9}^a = 1,2$ Glu; $E_{5,8}^a = 1,4$ His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{17}H_{24}O_5N_2$	Calc.	C 60,8	H 7,1	O 23,8	N 8,3%
(336,4)	Tr.	,, 61,4	,, 7,2	,, 23,0	,, 8,6%

N-CBO-L-Prolyl-L-valyl-glycinate d'éthyle (IVb). On dissout 3,7 g (11 mmoles) de N-CBO-L-valyl-glycinate d'éthyle (IIIb) dans 20 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après avoir laissé reposer 1 h, on évapore au vide à 35°, triture plusieurs fois le résidu à l'éther anhydre et décante. Le bromhydrate de L-valyl-glycinate d'éthyle huileux ainsi obtenu est dissout dans 20 ml de chloroforme à 0°.

³⁴) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).

D'autre part on dissout 2,7 g (11 mmoles) de N-CBO-L-proline cristallisée ²¹⁾²²⁾ dans 15 ml de chloroforme anhydre avec 1,5 ml (11 mmoles) de triéthylamine anhydre, refroidit à -5° et ajoute sous agitation 1,1 ml (11 mmoles) de chloroformiate d'éthyle. Après 5 min on ajoute la solution chloroformique de bromhydrate de L-valyl-glycinate d'éthyle et 1,6 ml (11,4 mmoles) de triéthylamine. On agite le tout 3 h à 20° , ajoute 40 ml de chloroforme, lave par 3 fois 20 ml d'HCl 1N, 4 fois 20 ml NH_4OH 1N et 3 fois 20 ml d'eau et sèche sur Na_2SO_4 . On évapore au vide, triture le résidu avec de l'éther de pétrole, filtre et sèche au vide. On dissout la masse cristalline obtenue dans 4 volumes d'éthanol 95% bouillant; par refroidissement et repos d'une nuit à 0° , il se forme des cristaux que l'on filtre et sèche au vide. On obtient 2,9 g (61%) de N-CBO-L-prolyl-L-valyl-glycinate d'éthyle de F. 155° . $[\alpha]_D^{20} = -78,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$; méthanol). $\text{Rf}_A^a = 0,70$; $\text{Rf}_M^a = 0,63$; $\text{E}_{5,8}^a = 1,2$ His; $\text{E}_{1,9}^a = 1,0$ Glu = 1,2 Try (révélation par isatine, ninhydrine et chlore; homogène).

$\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_6\text{N}_3$	Calc.	C 60,9	H 7,2	O 22,2	N 9,7%
(433,5)	Tr.	,, 61,4	,, 7,7	,, 21,3	,, 10,1%

N-CBO-L-Prolyl-L-valyl-glycinamide (Vb). On dissout en chauffant légèrement 6,0 g (13,9 mmoles) de N-CBO-L-prolyl-L-valyl-glycinate d'éthyle (IVb) dans 170 ml d'éthanol absolu, sature la solution refroidie à 0° par un courant de gaz ammoniac et laisse reposer 70 h à 20° . On contrôle par chromatographie que l'amidification est complète, filtre la solution et évapore à sec sous vide à 35° . On suspend la masse cristalline ainsi obtenue à reflux dans 50 ml d'acétate d'éthyle, laisse reposer une nuit à 0° , filtre et sèche au vide. On obtient 5,2 g (92%) de N-CBO-L-prolyl-L-valyl-glycinamide de F. 188° . $[\alpha]_D^{21} = -61,4^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$; méthanol). $\text{Rf}_A^a = 0,56$; $\text{Rf}_M^a = 0,43$; $\text{E}_{1,9}^a = 0,9$ Glu = 1,2 Try; $\text{E}_{5,8}^a = 1,3$ His (révélation par isatine, ninhydrine et chlore; homogène).

$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{N}_4$	Calc.	C 59,4	H 7,0	O 19,8	N 13,8%
(404,5)	Tr.	,, 60,2	,, 7,1	,, 20,0	,, 13,3%

L-Prolyl-L-valyl-glycinamide (VIb). On dissout 5,1 g (12,6 mmoles) de N-CBO-L-prolyl-L-valyl-glycinamide (Vb) dans 25 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à 20° et évapore sous vide à 35° . On triture le résidu plusieurs fois dans l'éther anhydre, décante et dissout immédiatement dans 30 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution sur une colonne d'Amberlite IRA-410 (base libre, lavée au méthanol) jusqu'à disparition des ions Br^- , on lave l'Amberlite avec 120 ml de méthanol frais, évapore l'ensemble du méthanol sous vide à 35° et triture le résidu avec de l'acétate d'éthyle. Après filtration et séchage, on obtient 2,9 g (86%) de L-prolyl-L-valyl-glycinamide de F. 132° (instantané). $[\alpha]_D^{20} = -46,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$; acide acétique anhydre). $\text{Rf}_A^o = 0,56$; $\text{Rf}_M^o = 0,43$; $\text{E}_{1,9}^o = 1,2$ Try = 0,9 Glu; $\text{E}_{5,8}^o = 1,3$ His (révélation par isatine, ninhydrine et chlore; homogène).

N-CBO-L-Glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-valyl-glycinamide (VIIb). On dissout 2,7 g (10,0 mmoles) de L-prolyl-L-valyl-glycinamide (VIb) et 5,5 g (9,0 mmoles) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-azide¹⁷⁾ dans 80 ml de diméthylformamide. Après 48 h d'agitation à 20° et après concentration à la moitié du volume sous vide à 50° , on ajoute 120 ml d'acétone à la solution encore chaude, laisse refroidir, filtre et lave le précipité successivement avec un mélange diméthylformamide + acétone (1:3), l'acétone et l'éther. Après séchage au vide, on obtient 5,3 g (70%) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-valyl-glycinamide de F. 223° (déc.). $[\alpha]_D^{22} = -37^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide), $-66,6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $\text{Rf}_A^a = 0,54$; $\text{E}_{1,9}^a = 0,7$ Try; $\text{E}_{5,8}^a = 0,7$ His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$\text{C}_{29}\text{H}_{53}\text{O}_{10}\text{N}_9\text{S}$	Calc.	C 55,7	H 6,4	O 19,1	N 15,0	S 3,8%
(840,0)	Tr.	,, 54,9	,, 6,3	,, 19,3	,, 15,2	,, 3,9%

L-Glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-valyl-glycinamide (VIIIb). On dissout à 20° 5,0 g (6,0 mmoles) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-valyl-glycinamide (VIIb) dans 60 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après 90 min, on évapore à sec sous vide à 35° , triture le résidu à l'éther anhydre, filtre le produit pulvérulent obtenu et dissout celui-ci dans 70 ml de méthanol. On fait passer cette solution sur une colonne d'Amberlite IRA-410 (base libre, lavée au méthanol) et

vérifie la disparition des ions Br^- . Après avoir lavé l'Amberlite avec 200 ml de méthanol frais, on évapore les solutions méthanoliques réunies sous vide à 35°. On purifie le résidu en le dissolvant dans 140 ml de sec-butanol saturé d'eau et en lavant cette solution 2 fois par 140 ml d'eau saturée de sec-butanol. Après avoir contretraité les phases aqueuses réunies par 40 ml de sec-butanol saturé d'eau, on évapore l'ensemble des phases butanoliques au vide poussé. On obtient 1,8 g (42%) de L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-L-valyl-glycinamide amorphe, F. 128° (déc.). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -48 \pm 1^\circ$ ($c = 1,3$; acide acétique anhydre). $\text{Rf}_{\text{A}}^{\circ} = 0,52$; $\text{E}_{1,9}^{\circ} = 0,7$ Try; $\text{E}_{5,8}^{\circ} = 0,7$ His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéiny-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-L-valyl-glycinamide (IX b). On dissout dans 25 ml de diméthylformamide 1,76 g (2,5 mmoles) de L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-L-valyl-glycinamide (VIII b) et 1,66 g (2,5 mmoles) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéiny-L-tyrosyl-L-isoleucyl-azide²⁴). Après 60 h d'agitation à 20° et lente concentration à la moitié du volume, on ajoute 150 ml d'acétate d'éthyle, filtre et lave le précipité par l'acétate d'éthyle et l'éther. On suspend le produit obtenu dans 40 ml de méthanol bouillant, filtre et répète une seconde fois cette purification. Après séchage au vide, on obtient: 1,16 g (35%) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéiny-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-L-valyl-glycinamide de F. 260° (déc.). $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -27,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide), $-64,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%).

$\text{C}_{63}\text{H}_{84}\text{O}_{14}\text{N}_{12}\text{S}_3$	Calc. C 57,0	H 6,4	O 16,8	N 12,6	S 7,2%
(1329,6)	Tr. „ 56,8	„ 6,6	„ 16,4	„ 12,6	„ 7,6%

Val⁸-Oxytocine (X b). On dissout 133 mg (0,1 mmoles) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéiny-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-L-valyl-glycinamide (IX b) dans 100 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et sous agitation on ajoute lentement du sodium jusqu'à apparition d'une teinte bleue. Après adjonction de 40 mg de NH_4Cl on évapore à sec sous vide, dissout le résidu dans 100 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH de la solution à 8,8 et fait passer un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. On acidifie au pH 4,5 cette solution que l'on équilibre avec du sec-butanol et introduit dans les 4 premiers tubes d'un appareil de contre-courant. Après 506 transferts dans le système sec-butanol-acide acétique 0,017N, on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes³⁴). On obtient un sommet principal $K = 0,22$ et un sommet secondaire $K = 0,13$. Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré sous vide. Le produit obtenu qui représente environ la moitié de l'azote peptidique ainsi que 80% de l'activité mis dans l'appareil, est homogène à la chromatographie ($\text{Rf}_{\text{M}}^{\circ} = 0,6$; $\text{Rf}_{\text{A}}^{\circ} = 0,5$; $\text{Rf}_{\text{P}}^{\circ} = 0,4$) et à l'électrophorèse ($\text{E}_{1,9}^{\circ} = 0,6$ Try; $\text{E}_{5,8}^{\circ} = 0,5$ Try), après révélation par ninhydrine et chlore.

Activités biologiques²⁸ de la Val⁸-oxytocine exprimées en unités internationales par mg: utérus de Chat *in situ* 380 (± 40); utérus de Rat isolé 200 (± 15); baisse de la pression sanguine du Coq 280 (± 17); pression interne de la glande mammaire du Lapin 310 (± 20); pression sanguine du Rat 9 (± 1); inhibition de la diurèse du Rat 0,8 ($\pm 0,1$).

SUMMARY

N-CBO-L-prolyl-L-isoleucyl-glycine ethyl ester and N-CBO-L-prolyl-L-valyl-glycine ethyl ester are synthesized by recurrent methods. Amidification of the ester group, splitting of the CBO group and condensation with N-CBO-L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-azide affords the two respective hexapeptides, which after splitting of the CBO group are condensed with N-tosyl-S-benzyl-L-cystéiny-L-tyrosyl-L-isoleucyl-azide. Cleavage of the protecting groups of the resulting two nonapeptides with sodium in liquid ammonia, oxydation with air in dilute aqueous solution and purification by counter-current distribution, affords the desired cyclic nonapeptide amides: Ileu⁸-oxytocin and Val⁸-oxytocin. When tested on the cat uterus *in situ* the former is a stronger oxytocic than oxytocin itself.

Laboratoires de chimie pharmaceutique SANDOZ, Bâle