

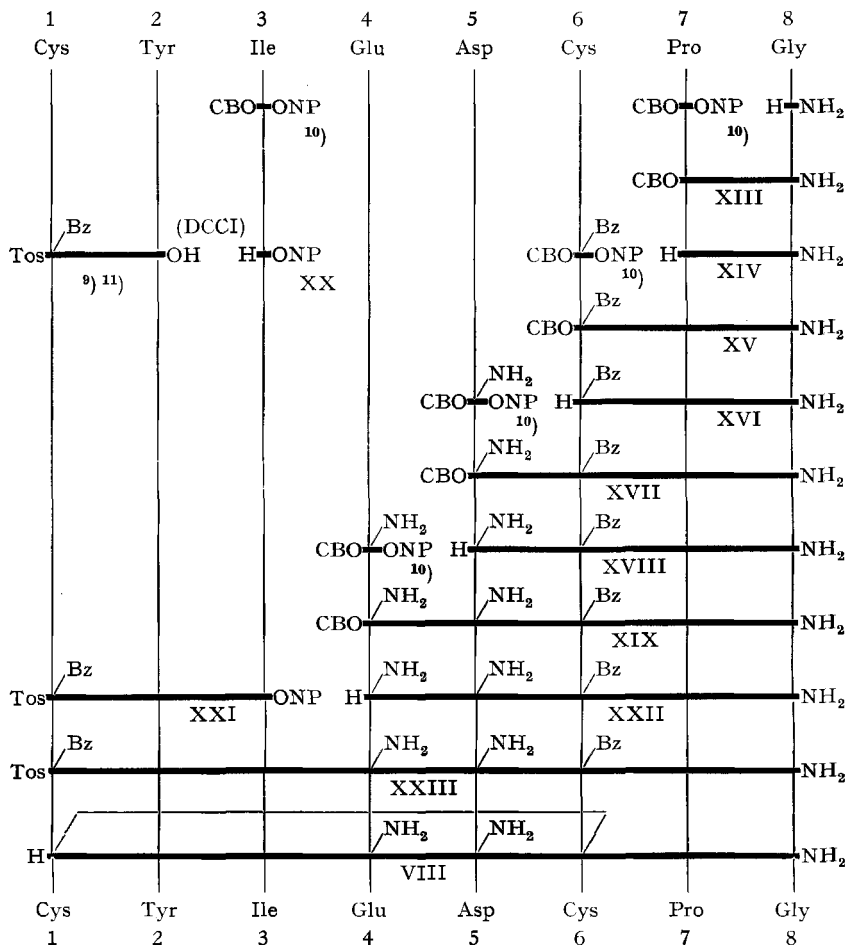
Formule chimique et désignation	Activités oxytociques en unités internationales par mg			Activités vasopressives en unités internationales par mg	
	Contraction de l'utérus isolé de Rat	Baisse de la pression sanguine du Coq	Augmentation de la pression interne de la glande mammaire du Lapin	Augmentation de la pression sanguine du Rat	Inhibition de la diurèse du Rat
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Oxytocine (I)	450 (± 30)	450 (± 30)	450 (± 30)	5 (± 1)	5 (± 1)
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Ile-Gly-NH ₂ Ile ⁸ -oxytocine (II) ^{2) 3)}	289 (± 21)	498 (± 37)	328 (± 21)	6,3 (± 0,8)	1,1 (± 0,1)
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Val-Gly-NH ₂ Val ⁸ -oxytocine (III) ²⁾	200 (± 15)	280 (± 17)	310 (± 20)	9 (± 1)	0,8 (± 0,1)
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Lys-Gly-NH ₂ Lys ⁸ -oxytocine = lysine-vasotocine (IV) ^{1) 4) 5)}	78 (± 10)	210 (± 3)	180 (± 25)	130 (± 13)	24 (± 3)
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂ Arg ⁸ -oxytocine = arginine-vasotocine (V) ⁶⁾	~ 75	~ 150	~ 100	~ 125	—
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-NH ₂ Dé-(Pro ⁷ -Leu ⁸ -Gly ⁹)-oxytocine (VI) ⁷⁾	~ 3,3	< 0,03	~ 1,1	< 0,01	—
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Leu-Gly-NH ₂ Dé-Pro ⁷ -oxytocine (VII)	3,8 (± 0,9)	Anti (1000:1)	1,6 (± 0,2)	~ 0,01	~ 0,01
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Gly-NH ₂ Dé-Leu ⁸ -oxytocine (VIII)	4,5 (± 1)	Anti (1000:1)	~ 3	Anti (1000:1)	0,07 (± 0,008)
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Leu-NH ₂ Dé-Gly ⁹ -oxytocine (IX)	4,2 (± 0,7)	Anti (10000:1)	~ 3	Anti (10000:1)	~ 0,02

a été supprimée (VI) ne possède pas plus d'un centième des activités oxytociques de l'hormone naturelle (tableau). Il était donc intéressant d'examiner l'influence de modifications d'un degré intermédiaire.

Dans le présent travail, nous rapportons la synthèse de trois analogues de l'oxytocine dans lesquels un des acides aminés de la chaîne peptidique latérale a été omis, soit la Dé-Pro⁷-oxytocine (VII), la Dé-Leu⁸-oxytocine (VIII) et la Dé-Gly⁹-oxytocine (IX).

Les méthodes de synthèse que nous avons employées sont indiquées dans les schémas 1, 2 et 3. Après purification par contre-courant, les trois peptides se sont

2. Schéma de synthèse de la Dé-Leu⁸-oxytocine



Abréviations: CBO- = carbobenzoxy-; Bz- = benzyl-; Tos- = tosyl- = *p*-toluènesulfonyl-; -NP = -*p*-nitrophényle; DCCI = condensation par la méthode au dicyclohexyl-carbodiimide.

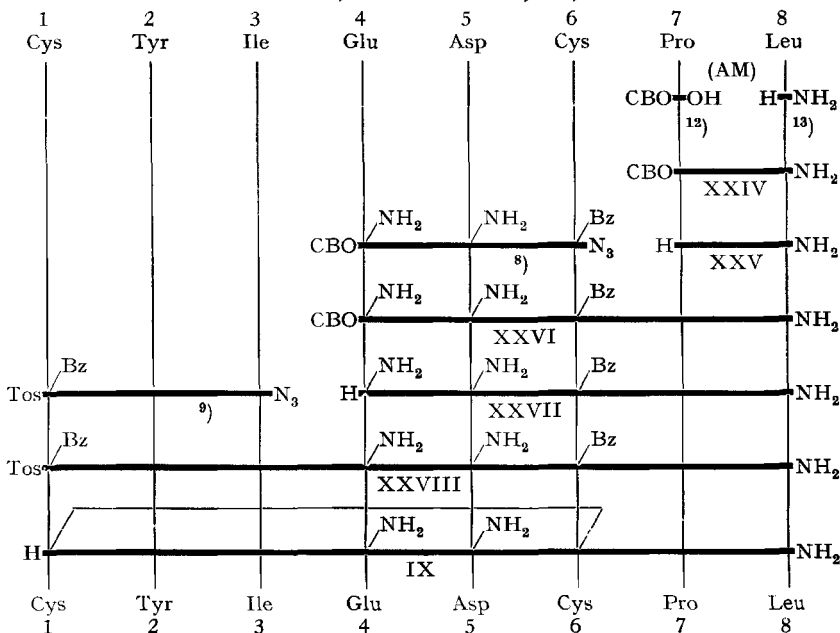
¹⁰⁾ M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 81, 5688 (1959).

¹¹⁾ V. DU VIGNEAUD, M. F. BARTLETT & A. JÖHL, J. Amer. chem. Soc. 79, 5572 (1957).

montrés homogènes à la chromatographie sur papier et à l'électrophorèse sur papier à haut voltage.

Les activités biologiques de ces trois peptides ont été déterminées par les Drs B. BERDE et E. STÜRMER de notre Département de recherches médico-biologiques (Dir.: Dr A. CERLETTI) et sont indiquées dans le tableau. Il ressort de ces valeurs que la suppression de n'importe lequel des trois acides aminés de la chaîne peptidique latérale de l'oxytocine abaisse chaque fois les activités oxytociques sur l'utérus isolé de Rat et sur la glande mammaire du Lapin à environ 1/150 des activités originales, tandis que l'activité sur la pression sanguine du Coq est non seulement complètement supprimée mais fait place à un léger effet inhibiteur vis-à-vis de l'oxytocine.

3. Schéma de synthèse de la Dé-Gly⁹-oxytocine



Abréviations: CBO- = carbobenzoxy-; Bz- = benzyl-; Tos- = tosyl- = *p*-toluènesulfonyl-; AM = condensation par la méthode à l'anhydride mixte.

En comparant les propriétés biologiques de ces trois nouveaux peptides avec celles des autres analogues rassemblés dans le tableau, nous voyons que la suppression d'un seul des trois acides aminés de la chaîne peptidique latérale de l'oxytocine a pratiquement le même effet que la suppression simultanée de ces trois acides aminés (cf. VI), et beaucoup plus d'influence que le remplacement de la leucine en position 8 par un acide aminé basique plus volumineux (cf. IV ou V).

Il semble donc que la longueur de la chaîne peptidique latérale joue un rôle plus important dans le mécanisme d'action de l'oxytocine que la nature des substituants en position 8.

¹²⁾ A. BERGER, O. KURTZ & E. KATSCHALSKI, J. Amer. chem. Soc. 76, 5552 (1954); W. GRASSMANN & E. WÜNSCH, Chem. Ber. 91, 462 (1958).

¹³⁾ E. L. SMITH & N. BALFOUR SLONIM, J. biol. Chemistry 176, 835 (1948).

Partie expérimentale¹⁴⁾

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 CRAIG¹⁵⁾.

Les chromatographies sur papier ont été faites par la méthode ascendante (20–30 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 & PFLEIDERER¹⁶⁾: au pH 1,9 (E_{1,9}) dans le mélange acide formique/acide acétique/eau (10:10:75); 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 précédemment¹⁷⁾.

a) Synthèse de la Dé-Pro⁷-oxytocine

N-CBO-L-Glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-glycinamide (X). On dissout 2,7 g (10 mmoles) de L-leucyl-glycinamide, HBr⁸⁾ dans 30 ml de diméthylformamide, refroidit à 0° et ajoute sous agitation 1,4 ml (10 mmoles) de triéthylamine. A cette solution on ajoute immédiatement 5,5 g (9 mmoles) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinylazide⁸⁾, 30 ml de diméthylformamide et agite à température ordinaire. Après 24 h d'agitation et de lente concentration au vide, on sépare de la solution les cristaux de chlorhydrate de triéthylamine et ajoute 200 ml d'acétone au filtrat. Le pentapeptide précipite lentement. On laisse reposer une nuit à 0° , filtre, rince à l'acétone et sèche sous vide. On redissout le produit obtenu (4,7 g) dans 60 ml de diméthylformamide à 60° , ajoute 200 ml d'acétone sous forte agitation et laisse reposer une nuit à 0° . Le lendemain on filtre, rince avec de l'acétone et sèche au vide. On obtient 3,6 g (53%) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-glycinamide de F. (instantané) 246–248°. $[\alpha]_D^{25} = -36^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$; diméthylformamide); $-42^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$; acide acétique à 95%). Rf_M^a = 0,52; Rf_P^a = 0,35; Rf_A^a = 0,60; E_{5,8}^a = 0,6 His; E_{1,9}^a = 0,6 Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{35}H_{48}O_9N_8S$ (756,9)	Calc. C 55,5 Tr. ,, 54,3	H 6,4 ,, 6,3	O 19,0 ,, 19,0	N 14,8 ,, 14,8	S 4,2% ,, 4,5%
----------------------------------	-----------------------------	-----------------	-------------------	-------------------	-------------------

L-Glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-glycinamide (XI). On dissout 2,65 g (3,5 mmoles) du dérivé pentapeptidique X dans 50 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre; la dissolution totale nécessite environ 30 min. Après avoir laissé reposer 90 min à température ordinaire, on évapore sous vide à 35° , triture le résidu à l'éther anhydre pour éliminer le bromure de benzyle formé, décante, répète plusieurs fois ce traitement et filtre le bromhydrate de pentapeptide pulvérulent ainsi obtenu. On dissout ce produit dans 80 ml de méthanol, fait passer cette solution sur une colonne garnie d'Amberlite IRA 410 (base libre, lavée au méthanol), contrôle la disparition des ions Br⁻, rince la colonne avec du méthanol frais et évapore à sec sous vide à 35° les solutions méthanoliques réunies. On triture le résidu dans l'acétate d'éthyle, filtre et sèche. On obtient 1,8 g d'un produit qui n'est pas tout à fait homogène à la chromatographie. Pour purifier ce pentapeptide on le dissout dans 50 ml de *sec.*-butanol saturé d'eau, lave deux fois cette solution avec 40 ml d'eau saturée de *sec.*-butanol et évapore la phase butanolique sous vide à 35° . Après avoir répété l'évaporation à sec avec un mélange

¹⁴⁾ Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr. W. SCHÖE NIGER).

¹⁵⁾ L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, *Analyt. Chemistry* 22, 1462 (1950).

¹⁶⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 67, 257 (1955).

¹⁷⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 43, 200 (1960).

toluène-éthanol absolu (1:1) afin d'éliminer toute l'humidité, on obtient 1,02 g (47%) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-glycinamide amorphe de F. 184° déc. $Rf_A^0 = 0,55$; $E_{8,8}^0 = 0,6$ His; $E_{1,9}^0 = 0,6$ Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{27}H_{49}O_7N_3S$	Calc. C 52,1	H 6,8	O 18,0	N 18,0	S 5,1%
(622,7)	Tr. ,, 52,3	,, 6,9	,, 17,8	,, 17,7	,, 5,0%

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-glycinamide (XII). On dissout 0,575 g (0,87 mmole) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucylazide⁹⁾ et 0,550 g (0,87 mmole) de pentapeptide XI dans 10 ml de diméthylformamide. Après 50 h d'agitation à 20° et lente concentration sous vide, on ajoute 80 ml d'acétate d'éthyle, filtre et rince le précipité à l'acétate d'éthyle et à l'éther. On suspend pendant quelques minutes l'octapeptide brut obtenu dans 10 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud et répète une seconde fois cette purification. Après séchage au vide on obtient 0,608 g (56%) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-leucyl-glycinamide de F. (instantané) 259-260° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -21^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-47,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique à 95%).

L'hydrolyse acide de l'octapeptide (HCl 6N; 16 h à 110°), donne: la S-benzyl-cystéine, la tyrosine, l'isoleucine, l'acide glutamique, l'acide aspartique, la leucine et la glycine, dans la proportion (2:1:1:1:1:1:1).

$C_{59}H_{79}O_{18}N_{11}S_3$	Calc. C 56,8	H 6,4	O 16,7	N 12,4	S 7,7%
(1246,5)	Tr. ,, 56,6	,, 6,5	,, 17,0	,, 12,2	,, 7,7%

Dé-Pro⁷-oxytocine (VII). On dissout 137 mg (0,11 mmole) du dérivé octapeptidique XII 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 à 8,8, fait passer un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate et acidifie à pH 4,5. On équilibre cette solution avec du *sec.*-butanol de manière à obtenir 100 ml de chaque phase et introduit dans les premiers tubes d'un appareil automatique de contre-courant. Après 368 transferts dans le système *sec.*-butanol/eau/acide acétique (1000:1200:1), on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes¹⁸⁾. On obtient un sommet principal $K = 0,39$ et un sommet secondaire $K = 0,19$. Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré sous vide. Le produit obtenu, qui représente 47% de l'azote peptidique mis dans l'appareil, c'est-à-dire 47 mg de peptide, est homogène à la chromatographie ($Rf_M^0 = 0,6$; $Rf_A^0 = 0,7$; $Rf_P^0 = 0,5$) et à l'électrophorèse ($E_{1,9}^0 = 0,7$ Try; $E_{8,8}^0 = 1,6$ Try) après révélation par ninhydrine et chlore. — *Activités biologiques*: voir tableau.

b) Synthèse de la Dé-Leu⁸-oxytocine

N-CBO-L-Prolyl-glycinamide (XIII). On dissout 1,67 g (15 mmoles) de glycinamide, HCl dans 30 ml de méthanol à 90% et fait passer cette solution sur de l'Amberlite IRA-410 (base libre, lavée au méthanol) jusqu'à disparition des ions Cl^- , rince l'Amberlite avec 60 ml de méthanol à 90% et évapore sous vide à 30°. Après avoir dissous le résidu dans 15 ml d'un mélange méthanol-tétrahydrofurane (1:1), on ajoute 5,18 g (14 mmoles) de N-CBO-L-prolinate de *p*-nitrophényle¹⁰⁾ et laisse reposer la solution à température ordinaire. Après une nuit, on évapore à sec, triture le résidu dans l'éther jusqu'à ce qu'il devienne pulvérulent, filtre, rince à l'éther et sèche. On dissout dans 35 ml de méthanol le dipeptide brut ainsi obtenu, agite cette solution 15 min avec 15 ml de Dowex 50W, filtre, rince avec 70 ml de méthanol et évapore l'ensemble des solutions méthanoliques sous vide à 35°. Le résidu est trituré dans l'éther, essoré, rincé à l'éther et séché sous vide. On obtient 2,30 g (54%) de N-CBO-L-prolyl-glycinamide de F. 120°, très soluble dans l'eau. $[\alpha]_D^{25} = -30,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1\%$; diméthylformamide). Chromatographie en couche mince sur Kieselgel G, dans le système MeOH- CH_2Cl (1:9) (révélation par chlore et iode; homogène). $E_{8,8}^0 = 1,5$ His; $E_{1,9}^0 = 1,3$ Glu = 0,8 His (révélation par ninhydrine, isatine et chlore; homogène).

$C_{15}H_{19}O_4N_3$	Calc. C 59,0	H 6,3	O 21,0	N 13,8%
(305,3)	Tr. ,, 58,9	,, 6,7	,, 20,9	,, 13,9%

¹⁸⁾ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycinamide (XV). On dissout 1,53 g (5,0 mmoles) de N-CBO-L-prolyl-glycinamide (XIII) dans 25 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre et laisse reposer 90 min à 20°. Après 15 min déjà, le L-prolyl-glycinamide, HBr cristallise dans la solution. On essore le précipité cristallin, lave plusieurs fois à l'éther anhydre et sèche sous vide en présence d'hydroxyde de sodium. On dissout immédiatement les 1,25 g (5,0 mmoles) de L-prolyl-glycinamide, HBr ainsi obtenus dans 5 ml de diméthylformamide et 0,7 ml (5,0 mmoles) de triéthylamine, ajoute 2,33 g (5,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de *p*-nitrophényle¹⁰) et laisse reposer 1 nuit à température ordinaire. Après avoir ajouté 100 ml d'acétate d'éthyle, on lave avec 2 fois 20 ml d'HCl 1N et 3 fois 20 ml d'eau, sèche sur Na₂SO₄, évapore sous vide et reprend le résidu cristallin dans l'éther. On sépare par filtration le tripeptide brut ainsi obtenu, dissout celui-ci dans 80 ml de méthanol bouillant, ajoute 180 ml d'eau, laisse reposer quelques heures à 0°, filtre, lave à l'eau et sèche au vide poussé. On obtient 1,2 g (48%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycinamide de F. 100–103°. $[\alpha]_D^{25} = -46,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; méthanol). $Rf_M^a = 0,65$; $E_{5,8}^a = 0,9$ His; $E_{1,9}^a = 1,0$ Try = 0,8 Glu (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{25}H_{30}O_6N_4S$	Calc.	C 60,2	H 6,1	O 16,0	N 11,2	S 6,4%
(498,6)	Tr.	„ 60,1	„ 6,2	„ 16,3	„ 11,5	„ 6,7%

N-CBO-L-AsparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycinamide (XVII). On dissout 1,00 g (2,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycinamide (XV) dans 20 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à 20°, évapore sous vide à 35° et triture le résidu avec un excès d'éther anhydre. On filtre, rince plusieurs fois sur le filtre à l'éther anhydre et redissout immédiatement le bromhydrate pulvérulent ainsi obtenu dans 30 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution sur de l'Amberlite IRA-410 (base libre, lavée au méthanol) jusqu'à disparition des ions Br⁻, on lave la résine avec du méthanol et évapore sous vide à 35°. On dissout le résidu dans 4 ml de diméthylformamide et ajoute à température ordinaire 0,735 g (1,9 mmole) de N-CBO-L-asparaginate de *p*-nitrophényle¹⁰). Après 1 h déjà la solution se prend en masse. On laisse encore reposer une nuit, suspend le tétrapeptide formé dans 30 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave sur le filtre avec 30 ml d'acétate d'éthyle et 50 ml d'éthanol, et sèche sous vide. On obtient 1,08 g (93%) de N-CBO-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycinamide de F. 240°. $[\alpha]_D^{25} = -44,7^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,8$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,54$; $Rf_A^a = 0,48$; $E_{5,8}^a = 0,7$ His; $E_{1,9}^a = 0,9$ Try = 0,7 Glu (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{20}H_{36}O_7N_6S$	Calc.	C 56,8	H 5,9	O 18,3	N 13,7	S 5,2%
(612,7)	Tr.	„ 56,5	„ 6,5	„ 18,5	„ 13,6	„ 5,5%

N-CBO-L-Glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycinamide (XIX). On dissout 0,980 g (1,6 mmole) du tétrapeptide XVII dans 20 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à 20°, évapore sous vide à 35° et triture le résidu dans l'éther anhydre. On essore le bromhydrate ainsi obtenu, rince plusieurs fois avec de l'éther anhydre et redissout immédiatement dans 30 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution sur de l'Amberlite IRA-410 (base libre, lavée au méthanol) jusqu'à disparition des ions Br⁻, on rince l'Amberlite au méthanol. Après évaporation sous vide à 35° de l'ensemble des solutions méthanoliques, on dissout le résidu dans 4 ml de diméthylformamide, ajoute 0,640 g (1,6 mmole) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginate de *p*-nitrophényle¹⁰) et laisse reposer la solution à température ordinaire. Après une nuit, on ajoute à la solution partiellement solidifiée 25 ml d'acétate d'éthyle, triture, filtre, lave sur le filtre avec 25 ml d'acétate d'éthyle puis 40 ml d'éthanol, et sèche sous vide. On obtient 0,806 g (68%) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycinamide de F. 228°. $[\alpha]_D^{25} = -38,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$; diméthylformamide). $Rf_A^a = 0,45$; $Rf_M^a = 0,29$; $E_{1,9}^a = 0,8$ Try; $E_{5,8}^a = 0,8$ His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{34}H_{44}O_9N_8S$	Calc.	C 55,1	H 6,0	O 19,4	N 15,1	S 4,3%
(740,9)	Tr.	„ 54,9	„ 6,2	„ 19,3	„ 15,1	„ 4,4%

L-Isoleucinate de p-nitrophényle, HBr (XX). On dissout 7,73 g (20 mmoles) de N-CBO-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle¹⁰) dans 140 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 30 min à température ordinaire, évapore sous vide à 35° et triture le résidu avec plusieurs portions d'éther anhydre que l'on décante chaque fois. On redissout le bromhydrate obtenu dans 30 ml d'éthanol absolu, cristallise par adjonction de 300 ml d'éther

anhydre, filtre, rince à l'éther anhydre et sèche sous vide en présence d'hydroxyde de potassium. On obtient 5,65 g (85%) de L-isoleucinate de *p*-nitrophényle, HBr, de F. 194°. $[\alpha]_D^{25} = +16,9^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; éthanol); $+31,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; eau); $[\alpha]_D^{25} = 26,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1$; méthanol); $+4,6^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,6$; acide acétique à 95%). Chromatographie en couche mince sur Kieselgel G dans le système MeOH-CHCl₃ (1:9) (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

C ₁₂ H ₁₇ O ₄ N ₂ Br	Calc. C 43,3	H 5,1	O 19,2	N 8,4	Br 24,0%
(333,2)	Tr. „ 43,4	„ 5,4	„ 19,4	„ 8,3	„ 24,3%

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle (XXI). On dissout 5,29 g (10 mmoles) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosine⁹⁾ 11) dans 100 ml d'acétonitrile avec 3,33 g (10 mmoles) de L-isoleucinate de *p*-nitrophényle, HBr (XX) et 1,4 ml (10 mmoles) de triéthylamine, refroidit à 0° et ajoute 2,10 g (10 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide¹⁹⁾. On agite 1 h à 0°, 4 h à température ordinaire, filtre de la dicyclohexylurée formée en cours de réaction et rince avec de l'acétate d'éthyle. On évapore le filtrat sous vide à 35°, dissout le résidu dans 200 ml d'acétate d'éthyle, lave par 3 fois 40 ml de NaHCO₃ 5%, 3 fois 40 ml d'HCl 2N et 3 fois 40 ml d'eau, sèche sur Na₂SO₄, filtre, concentre sous vide et cristallise par adjonction d'éther de pétrole. On recristallise le tripeptide obtenu dans 55 ml d'éthanol absolu bouillant, sépare les cristaux formés après 1 nuit de repos à 0°, rince avec de l'éthanol glacé et sèche au vide poussé. On obtient 5,90 g (78%) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle, de F. 169°. $[\alpha]_D^{25} = -35,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; méthanol); $-4,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide). Chromatographie en couche mince sur Kieselgel G dans le système MeOH-CHCl₃ (1:9) (révélation par chlore; homogène). Spectre UV.: max. à 269 mμ, log ε = 4,11 (méthanol).

C ₃₈ H ₄₂ O ₉ N ₄ S ₂	Calc. C 59,8	H 5,5	O 18,9	N 7,3	S 8,4%
(762,9)	Tr. „ 60,0	„ 5,8	„ 18,9	„ 7,0	„ 8,5%

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycinamide (XXIII). On dissout 0,740 g (1,0 mmole) de N-CBO-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycinamide (XIX) dans 20 ml d'une solution 2,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 2 h à 20° et évapore sous vide à 35°. On triture le résidu obtenu avec de l'éther anhydre pour éliminer le bromure de benzyle, essore le bromhydrate, le rince plusieurs fois avec de l'éther anhydre et redissout dans 40 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution sur de l'Amberlite IRA-410 (base libre, lavée au méthanol) jusqu'à disparition des ions Br⁻, on évapore à sec sous vide à 35°, dissout le résidu dans 3 ml de diméthylformamide, ajoute et dissout 0,760 g (1,0 mmole) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle (XXI) et laisse reposer à température ordinaire. Après une nuit on ajoute à la solution qui est prise en masse 20 ml d'acétate d'éthyle, triture, filtre et lave sur le filtre avec 20 ml d'acétate d'éthyle en plusieurs portions. On suspend l'octapeptide brut ainsi obtenu dans 10 ml de méthanol bouillant, filtre, répète deux fois cette purification, et sèche au vide poussé. On obtient 0,690 g (56%) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycinamide de F. 248°. $[\alpha]_D^{25} = -23,1^\circ (\pm 1^\circ)$ ($c = 1$; diméthylformamide).

L'hydrolyse acide de l'octapeptide (HCl 6N; 16 h à 110°) donne la S-benzyl-cystéine, la tyrosine, l'isoleucine, l'acide glutamique, l'acide aspartique la proline et la glycine dans la proportion (2:1:1:1:1:1:1).

C ₅₈ H ₇₅ O ₁₃ N ₁₁ S ₃	Calc. C 56,6	H 6,1	O 16,9	N 12,5	S 7,8%
(1230,6)	Tr. „ 56,2	„ 6,7	„ 17,2	„ 12,7	„ 7,6%

Dé-Leu⁸-oxytocine (VIII). On dissout 138 mg (0,112 mmole) du dérivé octapeptidique XXIII dans 100 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium, et ajoute lentement du sodium jusqu'à apparition d'une teinte bleue dans la solution. Après avoir ajouté 40 mg de NH₄Cl, on évapore à sec sous vide, dissout le résidu dans 100 ml d'acide acétique 0,01 N, ajuste le pH à 8,8 et oxyde en faisant passer un courant d'air dans la solution sous agitation jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. Après avoir acidifié cette solution au pH 4,5 avec de l'acide acétique 2N, on l'équilibre avec du *sec.*-butanol de manière à obtenir 100 ml de chaque phase que l'on introduit dans les quatre premiers tubes d'un appareil automatique de contre-courant. Après 475 transferts dans le système *sec.*-butanol/H₂O/acide acétique (1000:1200:1) on détermine la courbe de répartition

¹⁹⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

sur des aliquotes¹⁸). On obtient un sommet principal de $K = 0,18$. Le contenu des tubes centraux de ce sommet est réuni et concentré sous vide à 30°. Le produit obtenu, qui représente 50% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil, est homogène à la chromatographie ($Rf_A = 0,5$; $Rf_M = 0,6$; $Rf_P = 0,3$) et à l'électrophorèse ($E_{5,8} = 2,0$ Try; $E_{1,9} = 0,7$ Try) après révélation par ninhydrine et chlore. – *Activités biologiques*: voir tableau.

c) Synthèse de la Dé-Gly⁹-oxytocine

N-CBO-L-Prolyl-L-leucinamide (XXIV). On dissout 11,2 g (45 mmoles) de *N-CBO-L-proline* cristallisée¹²) et 10,7 ml (45 mmoles) de tributylamine anhydre dans 80 ml de tétrahydrofurane anhydre, refroidit à -5° et ajoute sous agitation 4,3 ml (45 mmoles) de chloroformiate d'éthyle. Après 5 min, on ajoute une solution de 8,0 g (48 mmoles) de *L-leucinamide*, HCl¹³) et de 11 ml (46 mmoles) de tributylamine dans 75 ml de mélange tétrahydrofurane eau (2:1). On agite le tout 3 h à 20°, évapore le solvant sous vide, redissout le résidu solide en chauffant légèrement dans 600 ml de chlorure de méthylène, lave par 3 fois 80 ml d'HCl 1N, 2 fois 80 ml de NH₄OH 1N et 4 fois 80 ml d'eau. Dès la fin des lavages acides le dipeptide commence à cristalliser dans l'interphase, et il faut filtrer à plusieurs reprises des cristaux formés. Les lavages terminés, on évapore le chlorure de méthylène sous vide à 40° et répète plusieurs fois cette évaporation avec de l'éthanol anhydre pour éliminer l'eau. On suspend le résidu obtenu après évaporation du chlorure de méthylène ainsi que les cristaux isolés pendant les lavages dans 100 ml d'acétate d'éthyle, chauffe à reflux pendant 5 min, laisse refroidir et filtre. On répète une seconde fois cette purification, rince à l'acétate d'éthyle et sèche au vide. On obtient ainsi 12,6 g (77%) de *N-CBO-L-prolyl-L-leucinamide* de F. 190–191°. $[\alpha]_D^{25} = -37^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,8$; méthanol). $Rf_A^M = 0,55$; $Rf_A^A = 0,60$; $E_{1,9}^A = 1,0$ Glu; $E_{5,8}^A = 1,4$ His (révélation par isatine, ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{19}H_{27}O_4N_3$	Calc.	C 63,2	H 7,5	O 17,7	N 11,6%
(361,4)	Tr.	,, 62,8	,, 7,5	,, 17,5	,, 11,7%

N-CBO-L-Glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucinamide (XXVI). On dissout 7,2 g (20 mmoles) de *N-CBO-L-prolyl-L-leucinamide* (XXIV) dans 60 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 avec de l'éther anhydre, décante, répète plusieurs fois ce lavage à l'éther jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent, filtre et sèche au vide. On dissout ce bromhydrate de *L-prolyl-L-leucinamide* dans 60 ml de diméthylformamide, refroidit à 0°, ajoute sous agitation 2,4 ml (20 mmoles) de triéthylamine et mélange immédiatement avec 10,0 g (16,3 mmoles) de *N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinylazide*⁶) dissous dans 30 ml de diméthylformamide. On agite pendant 30 h, en concentrant lentement sous vide. On filtre la solution des cristaux de chlorhydrate de triéthylamine et évapore le diméthylformamide au vide à 60°. On triture le résidu avec 100 ml d'HCl 0,5N, filtre, lave plusieurs fois à l'eau, puis à l'acétone, et sèche sous vide. On dissout le pentapeptide brut obtenu ci-dessus dans 100 ml de diméthylformamide à chaud, ajoute immédiatement 200 ml d'acétone en agitant fortement et laisse reposer une nuit à 0°. On filtre, rince le précipité avec diméthylformamide-acétone (1:2), acétone et éther. Après séchage au vide, on obtient 6,6 g (51%) de *N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucinamide* de F. (instantané) 240–242°. $[\alpha]_D^{25} = -67^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$; acide acétique à 95%). $Rf_A^A = 0,56$; $Rf_M^A = 0,44$; $Rf_P^A = 0,40$; $E_{5,8}^A = 0,8$ His; $E_{1,9}^A = 0,8$ Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{38}H_{52}O_9N_8S$	Calc.	C 57,3	H 6,6	O 18,1	N 14,0	S 4,0%
(796,9)	Tr.	,, 56,6	,, 7,2	,, 18,4	,, 14,2	,, 4,3%

L-Glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucinamide (XXVII). On dissout 6,0 g (7,5 mmoles) du dérivé pentapeptidique XXVI dans 100 ml d'une solution de gaz bromhydrique 2,5N dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 90 min à 20°, évapore au vide à 35°, triture le résidu avec de l'éther anhydre, décante et triture encore deux fois avec de l'acétate d'éthyle. On filtre et redissout le bromhydrate du pentapeptide pulvérulent ainsi obtenu dans 150 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution sur de l'Amberlite IRA-410 (base libre, lavée au méthanol) jusqu'à disparition des ions Br⁻, on rince la résine avec du méthanol et évapore sous vide à 35°. On obtient 4,5 g de pentapeptide (base libre), qui n'est pas parfaitement homogène à la chromatographie. Pour purifier ce produit, on le dissout dans 120 ml de *sec.*-butanol

saturé d'eau, lave 2 fois avec 100 ml d'eau saturée de *sec.*-butanol et contre-extrait les phases aqueuses réunies par 100 ml de *sec.*-butanol saturé d'eau. On évapore à sec sous vide à 40°, les solutions butanoliques réunies, répète plusieurs fois l'évaporation avec de l'éthanol absolu pour éliminer l'eau et achève le séchage sous vide poussé. On obtient 2,9 g (58%) de L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucinamide de F. (instantané) 125° déc. $Rf_A^a = 0,55$; $E_{1,9}^a = 0,8$ His; $E_{1,9}^a = 0,8$ Try; (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{30}H_{46}O_7N_8S + H_2O$ Calc. C 52,9 H 7,1 O 18,8 N 16,5 S 4,7%
 (662,8+18,0) Tr. ,, 52,2 ,, 7,4 ,, 18,9 ,, 15,9 ,, 4,7%

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucinamide (XXVIII). On dissout 2,72 g (4,0 mmoles) de pentapeptide XXVII et 2,67 g (4,0 mmoles) de *N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyl-L-isoleucyl-azide*⁹⁾ dans 30 ml de diméthylformamide. Après 50 heures 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 brut obtenu dans 50 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud et répète encore deux fois cette opération. Après séchage au vide, on obtient 2,88 g (56%) de *N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucinamide* de F. (instantané) 270–272°. $[\alpha]_D^{25} = -65^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$; acide acétique à 95%); $-28,6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$; diméthylformamide).

L'hydrolyse acide (HCl 6N; 16 h à 110°) donne la S-benzyl-cystéine, la tyrosine, l'isoleucine, l'acide glutamique, l'acide aspartique, la proline et la leucine, dans la proportion (2:1:1:1:1:1).

$C_{62}H_{83}O_{13}N_{11}S_3$ Calc. C 57,9 H 6,5 O 16,2 N 12,0 S 7,5%
 (1286,6) Tr. ,, 56,6 ,, 6,5 ,, 16,4 ,, 12,0 ,, 7,8%

Dé-Gly⁹-oxytocine (IX). On dissout 135 mg (0,105 mmole) du dérivé octapeptidique XXVIII dans 100 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium, et ajoute lentement du sodium jusqu'à apparition d'une teinte bleue. Après avoir ajouté 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 à 8,8 et oxyde en faisant passer un courant d'air dans la solution sous agitation, jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. Après avoir acidifié cette solution au pH 4,5 avec l'acide acétique 2N, on l'équilibre avec du *sec.*-butanol de manière à obtenir 100 ml de chaque phase que l'on introduit dans les premiers tubes d'un appareil automatique de contre-courant. Après 217 transferts dans le système *sec.*-butanol/eau/acide acétique (1000:1200:1), on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes¹⁸⁾. On obtient un sommet principal $K = 0,46$ et un sommet secondaire $K = 0,19$. Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré sous vide. Le produit obtenu, qui représente 36% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil, c'est-à-dire 36 mg de peptide, est homogène à la chromatographie ($Rf_M^0 = 0,6$; $Rf_A^0 = 0,7$; $Rf_B^0 = 0,5$) et à l'électrophorèse ($E_{1,9}^0 = 0,7$ Try; $E_{0,3}^0 = 1,6$ Try) après révélation par ninhydrine et chlore. – *Activités biologiques*: voir tableau.

SUMMARY

Three new analogues of Oxytocin in which one of the amino-acids of the peptidic side-chain has been omitted, *i. e.* De-Pro⁷-Oxytocin, De-Leu⁸-Oxytocin and De-Gly⁹-Oxytocin, have been synthesized according to the scheme (3+5). All three analogues exhibit about 1% of the uterus contracting and milk ejecting activities of Oxytocin, but no avian depressor property.

Laboratoires de chimie pharmaceutique
 SANDOZ SA., Bâle