

## 187. Synthèse de l'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-oxytocine, de la Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine et de l'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine

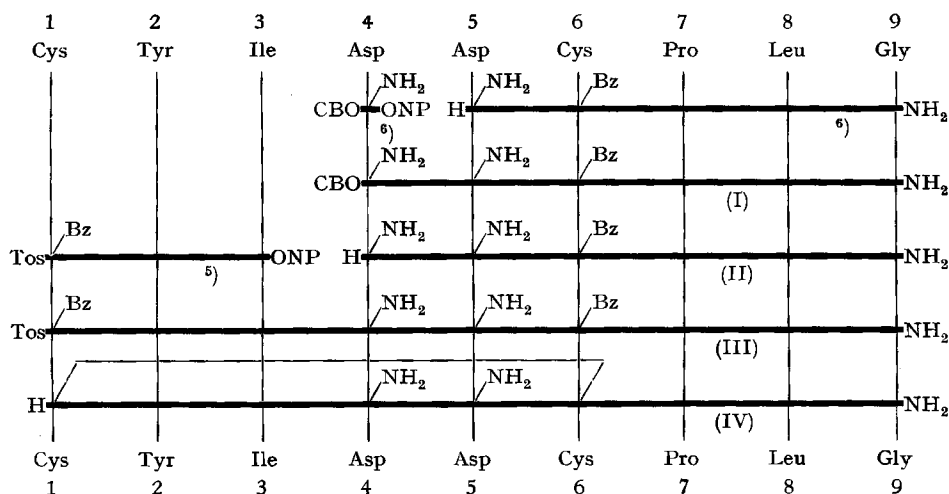
par P.-A. Jaquenoud et R. A. Boissonnas

(5 VI 62)

La plupart des analogues de l'oxytocine synthétisés jusqu'ici diffèrent de cette hormone par des modifications introduites en position 2, 3 ou 8<sup>1)</sup>. Par contre l'influence de faibles modifications en positions 4 ou 5, c'est-à-dire au milieu de la chaîne peptidique, n'a encore été que très peu étudiée<sup>2)</sup>. Ces deux positions sont occupées dans l'hormone naturelle par des acides aminés homologues, la glutamine et l'asparagine (voir tableau).

Il y a quelques années, nous avons rapporté dans un premier travail sur les analogues de l'oxytocine, la préparation de la Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine<sup>3)</sup> 4). Ce remplacement de l'asparagine par la glutamine, c'est-à-dire l'introduction d'un reste -CH<sub>2</sub>- supplé-

1) Schéma de synthèse de l'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-oxytocine



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

1) Pour une revue de la littérature sur ce sujet, cf. R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, B. BERDE & H. KONZETT, *Experientia* 17, 377 (1961).

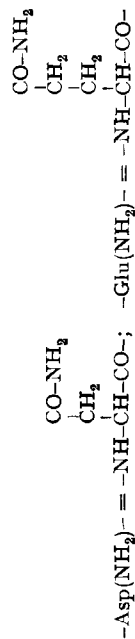
2) L'isoglutamine<sup>4</sup>-oxytocine (CH. RESSLER & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 4511 (1957)) et l'isoasparagine<sup>5</sup>-oxytocine (W. B. LUTZ, CH. RESSLER, D. E. NETTLETON & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* 81, 167 (1959)) possèdent des structures très différentes de celle de l'oxytocine par suite de l'agrandissement du cycle disulfure. Elles sont toutes deux dénuées d'activité oxytocique.

3) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, *Helv.* 39, 1421 (1956).

4) B. BERDE, W. DOEFFNER & H. KONZETT, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* 12, 209 (1957).

Tableau des activités biologiques

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	Augmentat. 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 <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> Oxytocine	450 (± 30)	450 (± 30)	450 (± 30)	5 (± 1)	5 (± 1)
H-CyS-Tyr-Ile-Asp(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> Asp(NH <sub>2</sub> ) <sup>4</sup> -oxytocine (IV)	108 (± 29)	202 (± 12)	300 (± 128)	0,13 (± 0,03)	0,044 (± 0,005)
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH <sub>2</sub> )-Glu(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> Glu(NH <sub>2</sub> ) <sup>5</sup> -oxytocine (X) <sup>9</sup>	1 (± 0,2)	0,8 (± 0,03)	7,3 (± 1,1)	0,01	—
H-CyS-Tyr-Ile-Asp(NH <sub>2</sub> )-Glu(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> Asp(NH <sub>2</sub> ) <sup>4</sup> -Glu(NH <sub>2</sub> ) <sup>5</sup> -oxytocine (XIV)	0,4 (± 0,08)	0,3 (± 0,01)	—	0,01	—



mentaire dans la chaîne latérale en position 5, avait très fortement abaissé les activités biologiques.

Nous décrivons dans le présent travail la synthèse de l'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-oxytocine. Ce remplacement de la glutamine par l'asparagine provoque la suppression d'un reste -CH<sub>2</sub>- de la chaîne latérale en position 4, c'est-à-dire une modification inverse de celle que nous avons réalisée précédemment.

Nous rapportons également la synthèse d'un analogue de l'oxytocine dans lequel nous avons permuté la glutamine et l'asparagine: l'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine. En outre nous saisissons cette occasion pour décrire une nouvelle synthèse de la Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine.

Les méthodes de synthèse que nous avons utilisées sont indiquées dans les schémas 1, 2 et 3. Dans chaque cas, nous avons condensé le N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle<sup>5)</sup>, avec un hexapeptide (4-9) correspondant, obtenu par la méthode récurrente<sup>6)</sup>.

Après purification par contre-courant, les produits finals se sont montrés homogènes à la chromatographie sur papier et à l'électrophorèse sur papier à haut voltage. Leurs activités biologiques ont été déterminées par le Dr B. BERDE et le Dr 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 le remplacement de la glutamine en position 4 de l'oxytocine par l'asparagine n'affecte que modérément les propriétés oxytociques, alors qu'il diminue considérablement les activités vasopressive et antidiurétique. Il en résulte que l'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-oxytocine est un oxytocique encore plus sélectif que l'oxytocine.

Par contre, le remplacement de l'asparagine par la glutamine et, dans une plus forte mesure encore, la permutation de la glutamine et de l'asparagine diminuent très fortement toutes les activités biologiques.

Nous pensons que deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats.

Selon la première, la position 4, voisine de la position 3 qui est elle-même le siège de variations dans les hormones posthypophysaires naturelles, tolérerait plus facilement des modifications de structure que la position 5, qui est voisine de la position 6 d'où part l'embranchement du cycle disulfure et qui est de ce fait fortement encombrée.

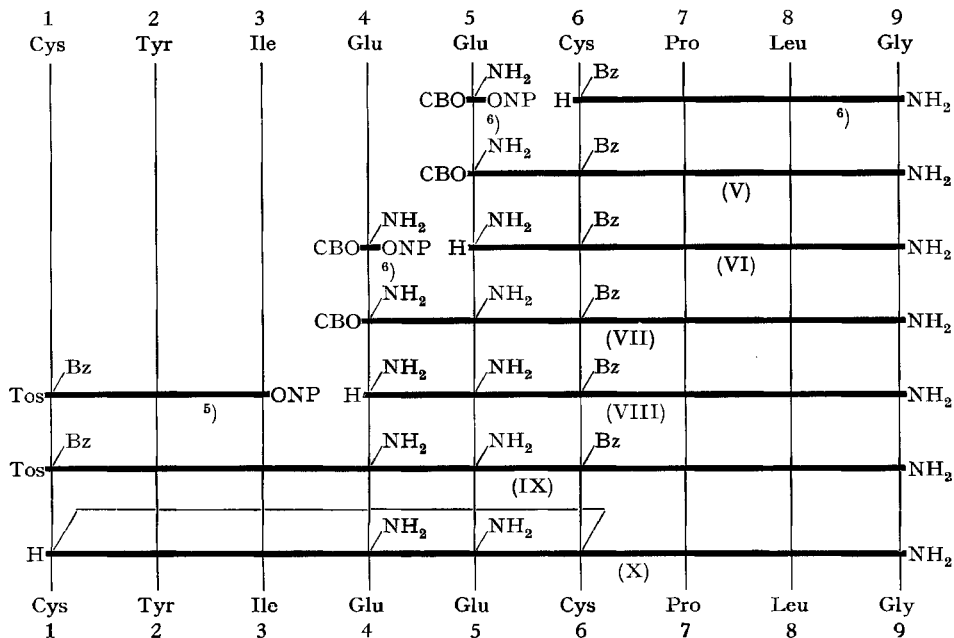
Selon la seconde hypothèse, qui n'est d'ailleurs pas incompatible avec la première, l'activité de la molécule d'oxytocine ne serait pas très affectée par un léger raccourcissement d'une chaîne latérale, mais serait par contre considérablement diminuée par l'allongement de certaines de celles-ci, allongement qui perturberait la mise en place de l'hormone sur le récepteur. Un phénomène semblable permettrait aussi d'expliquer pourquoi la Phé<sup>2</sup>-oxytocine<sup>7)</sup> ou la Désamino-oxytocine<sup>8)</sup> sont encore fortement

<sup>5)</sup> P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **45**, 1462 (1962).

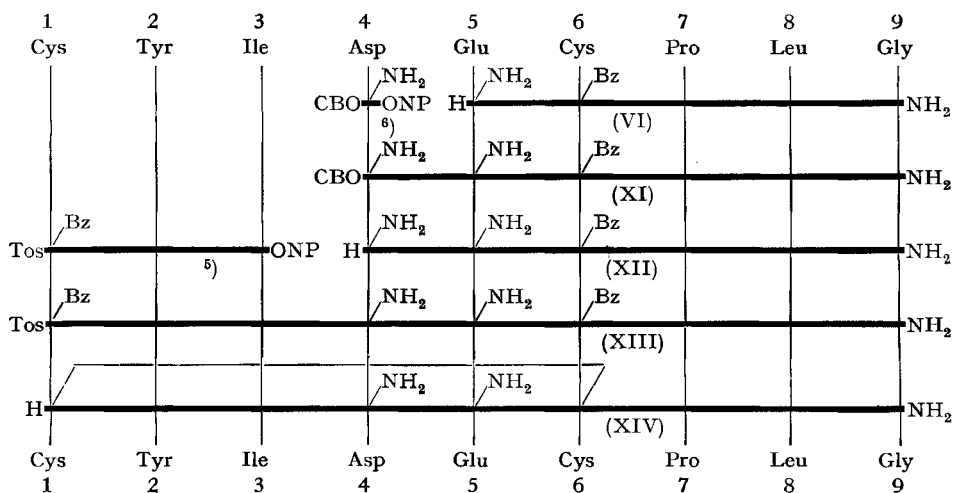
<sup>6)</sup> M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 5688 (1959).

<sup>7)</sup> P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **42**, 788 (1959); H. KONZETT & B. BERDE, *Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy* **14**, 333 (1959); M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 1258, 6072 (1959).

<sup>8)</sup> V. DU VIGNEAUD, G. WINESTOCK, V. V. S. MURTI, D. B. HOPE, R. D. KIMBROUGH, *J. biol. Chemistry* **235**, PC 64 (1960).

2) Schéma de synthèse de la Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine

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

3) Schéma de synthèse de l'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine

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

<sup>9)</sup> C. RESSLER & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 76, 3107 (1954); M. ZAORAL & J. RUDINGER, Coll. czechoslov. chem. Commun. 20, 1183 (1955); H. C. BEYERMAN, J. S. BONTKOE & A. C. KOCH, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 78, 935 (1959).

actives, alors que la (O-Me-Tyr)<sup>2</sup>-oxytocine<sup>10</sup>) ou la (N-acétyl-Cys)<sup>1</sup>-oxytocine<sup>11</sup>) sont pratiquement dénuées d'activité.

### Partie expérimentale<sup>12)</sup> 13)

a) *Synthèse de l'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-oxytocine*. – N-CBO-L-Asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (I). On dissout 2,36 g (4,0 mmoles) de L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide<sup>6)</sup> et 1,55 g (4,0 mmoles) de N-CBO-L-asparaginate de *p*-nitrophényle<sup>6)</sup> dans 6 ml de diméthylformamide. Après quelques minutes déjà l'hexapeptide formé précipite. On laisse réagir une nuit à température ordinaire, suspend la masse obtenue dans 50 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave sur le filtre avec une seconde portion de 50 ml d'acétate d'éthyle puis avec 2 fois 50 ml d'éthanol. Après séchage sous vide, on obtient: 2,84 g (85%) de N-CBO-L-asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide de F. 208°.  $[\alpha]_D^{21} = -51,5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).  $Rf_A^a = 0,6$ ;  $Rf_M^a = 0,5$ ;  $E_{1,9}^a = 0,7$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,6$  His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

C <sub>39</sub> H <sub>63</sub> O <sub>10</sub> N <sub>9</sub> S	Calc. C 55,8	H 6,4	O 19,0	N 15,0	S 3,8%
(840,0)	Tr. „ 55,1	„ 6,7	„ 18,9	„ 15,1	„ 4,0%

*N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (II)*. On dissout 1,68 g (2,0 mmoles) de N-CBO-L-asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (I) dans 50 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après avoir laissé reposer 100 min à température ordinaire, on évapore sous vide à 35°, triture le résidu avec de l'éther anhydre, essore le bromhydrate de l'hexapeptide ainsi obtenu, dissout celui-ci dans 30 ml de méthanol, fait passer la solution sur de l'Amberlite IRA-410 (base libre, lavée au méthanol) jusqu'à disparition des ions Br<sup>-</sup>, rince au méthanol et évapore l'ensemble des solutions méthanoliques sous vide à 35°. On dissout le résidu ainsi que 1,53 g (2,0 mmoles) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle<sup>5)</sup> dans 6 ml de diméthylformamide et laisse réagir une nuit à température ordinaire. La solution se prend en masse. On suspend le nonapeptide formé dans 50 ml d'acétate d'éthyle, filtre, rince à l'acétate d'éthyle et sèche. On suspend ce nonapeptide brut dans 20 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud et répète une seconde fois cette purification. Après séchage au vide, on obtient 1,80 g (68%) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide de F. 242°.  $[\alpha]_D^{22} = -34^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).

C <sub>63</sub> H <sub>84</sub> O <sub>14</sub> N <sub>12</sub> S <sub>3</sub>	Calc. C 56,9	H 6,4	O 16,9	N 12,6	S 7,2%
(1329,7)	Tr. „ 56,6	„ 6,7	„ 17,0	„ 12,3	„ 7,1%

*Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-oxytocine (IV)*. On dissout 133 mg (0,10 mmole) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-asparaginyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (III) dans 100 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et ajoute lentement du sodium jusqu'à apparition d'une teinte bleue. Après avoir ajouté 30 mg de NH<sub>4</sub>Cl, 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 au pH 4,5 cette solution 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 premiers tubes d'un appareil automatique de contre-courant. Après 500 transferts dans le système *sec.*-butanol/eau/acide acétique (1000:1200:1), on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes<sup>14)</sup>. On obtient un sommet principal  $K = 0,48$  et un sommet secondaire  $K = 0,22$ . Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré sous vide. Le produit

<sup>10)</sup> H. D. LAW & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 82, 4579 (1960); K. JOST, J. RUDINGER & F. ŠORM, Coll. Czech. chem. Comm. 26, 2496 (1961).

<sup>11)</sup> R. A. BOISSONNAS, J. F. PECHÈRE & ST. GUTTMANN, résultats non publiés, cités dans <sup>1)</sup>.

<sup>12)</sup> Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr W. SCHÖNIGER).

<sup>13)</sup> Pour les méthodes et les abréviations utilisées, cf. <sup>5)</sup>.

<sup>14)</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).

obtenu, qui représente 41% de l'azote peptidique de départ, c'est-à-dire 41,3 mg d'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-oxytocine, est homogène à la chromatographie (Rf<sub>M</sub><sup>0</sup> = 0,6; Rf<sub>A</sub><sup>0</sup> = 0,5; Rf<sub>P</sub><sup>0</sup> = 0,4) et à l'électrophorèse (E<sub>1,9</sub><sup>0</sup> = 0,6 Try; E<sub>5,8</sub><sup>0</sup> = 0,5 Try) après révélation par ninhydrine et chlore.

*Activités biologiques de IV*: Voir tableau.

b) *Synthèse de la Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine*. - N-CBO-L-Glutaminyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (V). On dissout 2,80 g (7,0 mmoles) de N-CBO-L-glutamate de *p*-nitrophényle<sup>6</sup>) et 3,34 g (7,0 mmoles) de S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide<sup>6</sup>)<sup>9</sup>) dans 10 ml de diméthylformamide. Après avoir laissé réagir pendant 24 h à température ordinaire, on ajoute 70 ml d'acétate d'éthyle, triture la masse gélatineuse obtenue avec de l'éther, et filtre. Après séchage au vide poussé, on obtient 4,20 g (81%) de N-CBO-L-glutaminyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 158-159°.  $[\alpha]_D^{25} = -55^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide). Rf<sub>A</sub><sup>0</sup> = 0,6; Rf<sub>M</sub><sup>0</sup> = 0,7; E<sub>1,9</sub><sup>0</sup> = 0,7 Try; E<sub>5,8</sub><sup>0</sup> = 0,7 His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

C <sub>36</sub> H <sub>49</sub> O <sub>8</sub> N <sub>7</sub> S (739,9)	Calc. C 58,4 Tr. „ 58,2	H 6,7 „ 6,5	O 17,3 „ 17,5	N 13,2 „ 13,2	S 4,3% „ 4,0%
--	----------------------------	----------------	------------------	------------------	------------------

N-CBO-L-Glutaminyl-L-glutaminyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (VII). On dissout 3,7 g (5,0 mmoles) de N-CBO-L-glutaminyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (V) dans 80 ml d'une solution 2,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. On isole le bromhydrate de pentapeptide et le transforme en base libre correspondante comme décrit sous a) (III). Après dissolution du L-glutaminyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (VI) ainsi obtenu dans 8 ml de diméthylformamide, on ajoute 2,0 g (5,0 mmoles) de N-CBO-L-glutamate de *p*-nitrophényle<sup>6</sup>) et laisse réagir à température ordinaire pendant une nuit. La solution se prend en masse. On suspend l'hexapeptide formé dans 80 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave sur le filtre avec 120 ml d'acétate d'éthyle et 120 ml d'éthanol. Après séchage au vide, on obtient 2,9 g (75%) de N-CBO-L-glutaminyl-L-glutaminyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 248°.  $[\alpha]_D^{25} = -52,5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide). Rf<sub>M</sub><sup>0</sup> = 0,5; Rf<sub>A</sub><sup>0</sup> = 0,6; E<sub>1,9</sub><sup>0</sup> = 0,7 Try; E<sub>5,8</sub><sup>0</sup> = 0,6 His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

C <sub>41</sub> H <sub>57</sub> O <sub>10</sub> N <sub>9</sub> S (868,0)	Calc. C 56,7 Tr. „ 56,0	H 6,6 „ 7,0	O 18,4 „ 18,4	N 14,5 „ 14,3	S 3,7% „ 3,7%
---	----------------------------	----------------	------------------	------------------	------------------

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (IX). On dissout 1,30 g (1,5 mmole) de N-CBO-L-glutaminyl-L-glutaminyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (VII) dans 40 ml d'une solution 2,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, isole le bromhydrate d'hexapeptide et le transforme en base libre correspondante comme décrit sous a) (III). Après dissolution du L-glutaminyll-L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (VIII) ainsi obtenu, dans 5 ml de diméthylformamide, on ajoute 1,15 g (1,5 mmole) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle<sup>6</sup>) et laisse réagir à température ordinaire pendant 1 nuit. On suspend la masse obtenue dans 50 ml d'acétate d'éthyle, filtre et lave sur le filtre avec 50 ml d'acétate d'éthyle. On suspend ce nonapeptide brut dans 15 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud et répète cette purification. Après séchage au vide, on obtient 1,22 g (60%) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 243°.  $[\alpha]_D^{25} = -34,5^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).

C <sub>65</sub> H <sub>88</sub> O <sub>14</sub> N <sub>18</sub> S <sub>3</sub> (1357,7)	Calc. C 57,5 Tr. „ 57,0	H 6,5 „ 6,8	O 16,5 „ 16,5	N 12,4 „ 12,5	S 7,1% „ 7,1%
--	----------------------------	----------------	------------------	------------------	------------------

Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine (X). On dissout 133 mg (0,099 mmole) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (IX) dans 100 ml d'ammoniac redistillé sur sodium. On traite au sodium, oxyde à l'air et purifie par contre-courant comme pour l'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-oxytocine (IV) ci-dessus. Après 495 transferts, on obtient un sommet principal  $K = 0,53$  et un sommet secondaire  $K = 0,19$ . Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré au vide. Le produit obtenu qui représente 35% de l'azote peptidique de départ, c'est-à-dire 34,7 mg de Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine, est homogène à la chromatographie (Rf<sub>M</sub><sup>0</sup> = 0,6; Rf<sub>A</sub><sup>0</sup> = 0,5; Rf<sub>P</sub><sup>0</sup> = 0,4) et à l'électrophorèse (E<sub>1,9</sub><sup>0</sup> = 0,6 Try; E<sub>5,8</sub><sup>0</sup> = 0,5 Try) après révélation par ninhydrine et chlore.

*Activités biologiques de X*: Voir tableau.

c) *Synthèse de l'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine*. N-CBO-L-Asparaginyll-L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (XI). On dissout 1,36 g (2,25 mmoles) de L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (VI) dont la préparation est décrite ci-dessus sous b) (VII), et 0,87 g (2,25 mmoles) de N-CBO-L-asparaginate de *p*-nitrophényle<sup>6)</sup> dans 4 ml de diméthylformamide. On laisse réagir une nuit à température ordinaire, suspend la masse obtenue dans 40 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave sur le filtre avec 120 ml d'acétate d'éthyle et 120 ml d'éthanol. Après séchage au vide poussé, on obtient 1,60 g (83%) de N-CBO-L-asparaginyll-L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide de F. 199–200°.  $[\alpha]_D^{25} = -51,5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^0 = 0,5$ ;  $Rf_A^0 = 0,6$ ;  $E_{1,9}^0 = 0,7$  Try;  $E_{5,8}^0 = 0,6$  His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{40}H_{55}O_{10}N_9S$ (854,0)	Calc. C 56,3 Tr. „ 55,7	H 6,5 „ 6,8	O 18,7 „ 19,1	N 14,7 „ 14,7	S 3,8% „ 3,8%
-------------------------------------	----------------------------	----------------	------------------	------------------	------------------

*N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyll-L-isoleucyll-L-asparaginyll-L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (XIII)*. On dissout 1,28 g (1,5 mmole) de N-CBO-L-asparaginyll-L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (XI) dans 40 ml d'une solution 2,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. On isole le bromhydrate de l'hexapeptide et le transforme en base libre correspondante comme décrit ci-dessus sous a) (III). Après dissolution du L-asparaginyll-L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (XII) ainsi obtenu dans 5 ml de diméthylformamide, on ajoute 1,15 g (1,5 mmole) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyll-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle<sup>6)</sup> et laisse réagir 1 nuit à température ordinaire. On suspend la masse obtenue dans 50 ml d'acétate d'éthyle, filtre et lave sur le filtre avec 50 ml d'acétate d'éthyle. On purifie ce nonapeptide brut en le suspendant dans 15 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud et répète la purification. Après séchage au vide poussé, on obtient 1,41 g (70%) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyll-L-isoleucyll-L-asparaginyll-L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide de F. 274–275°.  $[\alpha]_D^{25} = -34,5^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).

$C_{64}H_{88}O_{14}N_{12}S_3$ (1343,7)	Calc. C 57,2 Tr. „ 57,3	H 6,4 „ 6,4	O 16,7 „ 16,9	N 12,5 „ 12,6	S 7,2% „ 7,1%
---	----------------------------	----------------	------------------	------------------	------------------

*Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine (XIV)*. On dissout 133 mg (0,098 mmole) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyll-L-tyrosyll-L-isoleucyll-L-asparaginyll-L-glutaminyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide (XIII) dans 100 ml d'ammoniac redistillé sur sodium. On traite au sodium, oxyde à l'air et purifie par contre-courant comme pour l'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-oxytocine (IV) ci-dessus. Après 304 transferts, on obtient un sommet principal  $K = 0,48$  et un sommet secondaire  $K = 0,20$ . Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré au vide. Le produit obtenu qui représente 30% de l'azote peptidique de départ, c'est-à-dire 30,3 mg d'Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-oxytocine, est homogène à la chromatographie ( $Rf_M^0 = 0,6$ ;  $Rf_A^0 = 0,5$ ;  $Rf_P^0 = 0,4$ ) et à l'électrophorèse ( $E_{1,9}^0 = 0,6$  Try;  $E_{5,8}^0 = 0,5$  Try) après révélation par ninhydrine et chlore.

*Activités biologiques de XIV*: Voir tableau.

#### SUMMARY

Three analogues of oxytocin in which the side chains of the amino acids in position 4 and 5 have been shortened or lengthened, *i.e.* Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-Oxytocin, Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-Oxytocin and Asp(NH<sub>2</sub>)<sup>4</sup>-Glu(NH<sub>2</sub>)<sup>5</sup>-Oxytocin, have been synthesized according to the scheme (3 + 6). Only the first of these analogues, which contains one  $-CH_2-$  group less than oxytocin, still exhibits important oxytocic activities.

Laboratoires de chimie pharmaceutique  
SANDOZ SA., Bâle