

## 285. Synthèse d'homologues de la lysine-vasopressine et de l'oxytocine contenant une séquence His-Sér ou Sér-His en position N-terminale

par **St. Guttmann** et **R. A. Boissonas**

(4 X 62)

Il y a quelques années, SCHALLY, SAFFRAN & ZIMMERMANN<sup>1)</sup> ont rapporté qu'ils avaient isolé à partir d'hypophyses de porc un peptide qui, à des doses de quelques nanogrammes, stimulait *in vitro* la sécrétion d'ACTH par l'adénohypophyse de rat<sup>2)</sup>. Après hydrolyse acide, ce peptide avait fourni des quantités équimoléculaires des acides aminés présents dans la lysine-vasopressine ainsi que de sérine et d'histidine. Faute de quantités suffisantes de produit pur, ces auteurs n'avaient pas pu déterminer la constitution de ce peptide, mais ils avaient cependant montré qu'il se distinguait nettement de la lysine-vasopressine par son comportement chromatographique dans certains systèmes, où il possédait des Rf inférieurs à ceux de cette hormone (tableau 1).

Tableau 1. Influence de la présence de Sér et His sur les Rf

Peptide	Rf dans le mélange <i>m</i> -crésol/eau (sat.) (WHATMAN 3; ascendant)	Rf dans le mélange acétone-eau (3:2) (WHATMAN 3; ascendant)
Peptide de SCHALLY et coll. <sup>1)</sup> stimulant <i>in vitro</i> la sécrétion d'ACTH	0,46 –0,64 <sup>b)</sup>	0,35 –0,46 <sup>b)</sup>
Lysine-vasopressine	0,85 <sup>b)</sup> 0,90 <sup>a)</sup>	0,69 <sup>a)</sup> 0,80 <sup>a)</sup>
His <sup>2</sup> -Sér <sup>3</sup> -lysine-vasopressine <sup>3)</sup>	0,40 –0,65 <sup>a)</sup>	0,20 –0,45 <sup>a)</sup>
Sér <sup>2</sup> -His <sup>3</sup> -lysine-vasopressine <sup>3)</sup>	0,40 –0,65 <sup>a)</sup>	0,20 –0,45 <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> valeurs chromatographiques obtenues par les auteurs.  
<sup>b)</sup> valeurs chromatographiques indiquées par SCHALLY et coll.<sup>1)</sup>

Nous avons pour notre part synthétisé<sup>3)</sup> la His<sup>2</sup>-Sér<sup>3</sup>-lysine-vasopressine et la Sér<sup>2</sup>-His<sup>3</sup>-lysine-vasopressine et pu ainsi constater que la présence de sérine et d'histidine (à la place de tyrosine et de phénylalanine) dans la molécule de lysine-vasopressine diminuait nettement les Rf de celle-ci dans les mêmes types de solvants (Tableau 1). Il était cependant apparu que ces modifications de la structure de la lysine-vasopressine supprimaient presque complètement la forte action stimulante de cette hormone sur la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> A. V. SCHALLY, M. SAFFRAN & BRIGITTE ZIMMERMANN, *Biochem. J.* **70**, 97 (1958).

<sup>2)</sup> M. SAFFRAN & A. V. SCHALLY, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **33**, 408 (1955); *Endocrinology* **56**, 523 (1955); *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **92**, 636 (1956).

<sup>3)</sup> ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONAS, *Helv.* **43**, 200 (1960).

<sup>4)</sup> Ces essais biologiques ont été effectués par le Prof. R. GUILLEMIN et rapportés par l'un de nous (R. A. B.) à la Réunion annuelle de la Société suisse d'Endocrinologie du 25.6.60 à Berne. Cf. aussi W. H. SAWYER, *Pharmacol. Rev.* **13**, 225 (1961).

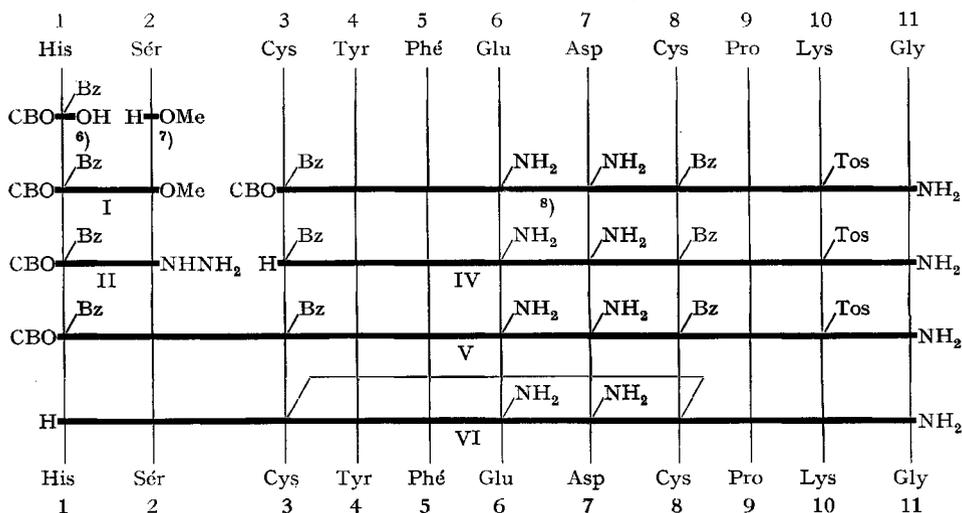
D'autre part, le peptide de SCHALLY et coll. étant, comme la lysine-vasopressine, probablement d'origine hypothalamique, il était tentant de supposer que les acides aminés communs à ces deux peptides se présentaient dans des séquences semblables.

Ces diverses considérations nous incitèrent à préparer des homologues de la lysine-vasopressine contenant un reste sérine et un reste histidine supplémentaires.

Dans le présent travail, nous rapportons en détail la synthèse de la (His-Sér-Cys)<sup>1</sup>-lysine-vasopressine (=  $\alpha$ -N-(L-histidyl-L-séryl)-lysine-vasopressine) et celle de son isomère, la (Sér-His-Cys)<sup>1</sup>-lysine-vasopressine (=  $\alpha$ -N-(L-séryl-L-histidyl)-lysine-vasopressine)<sup>5</sup>). Nous rapportons également la préparation des homologues correspondants de l'oxytocine, la (His-Sér-Cys)<sup>1</sup>-oxytocine (= N-(L-histidyl-L-séryl)-oxytocine) et la (Sér-His-Cys)<sup>1</sup>-oxytocine (= N-(L-séryl-L-histidyl)-oxytocine), que nous avons utilisés comme substances de comparaison<sup>5</sup>).

Les méthodes de synthèse que nous avons employées sont indiquées dans les schémas 1 à 5. La (His-Sér-Cys)<sup>1</sup>-lysine-vasopressine a été préparée par deux mé-

Schéma 1. Synthèse de la (His-Sér-Cys)<sup>1</sup>-lysine-vasopressine (Méthode A)



Abréviations: CBO- = carbobenzoxy-; Bz- = benzyl-

thodes différentes. Selon la première, l'endécapeptide désiré a été obtenu par condensation d'un dipeptide avec un nonapeptide, selon la seconde, qui exclut toute présence accidentelle de lysine-vasopressine, il a été formé par la liaison d'un pentapeptide avec un hexapeptide. Les deux méthodes ont donné des produits identiques, physiquement, chimiquement et biologiquement. Les trois autres homologues ont été préparés par condensation d'un dipeptide avec un nonapeptide. Toutes ces condensations ont été effectuées par la méthode à l'azide.

<sup>5</sup>) Ces synthèses ont été brièvement rapportées dans une communication préliminaire à l'occasion de l'assemblée de la Société suisse de Chimie du 23.9.61 à Bienne; cf. *Chimia* 15, 575 (1961).

<sup>6</sup>) D. THEODOROPOULOS & G. FÖLSCH, *Acta chem. scand.* 12, 1955 (1958).

<sup>7</sup>) ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 41, 1852 (1958).

<sup>8</sup>) R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, *Helv.* 43, 182 (1960).

Schéma 2. Synthèse de la (His-Sér-Cys)<sup>1</sup>-lysine-vasopressine (Méthode B)

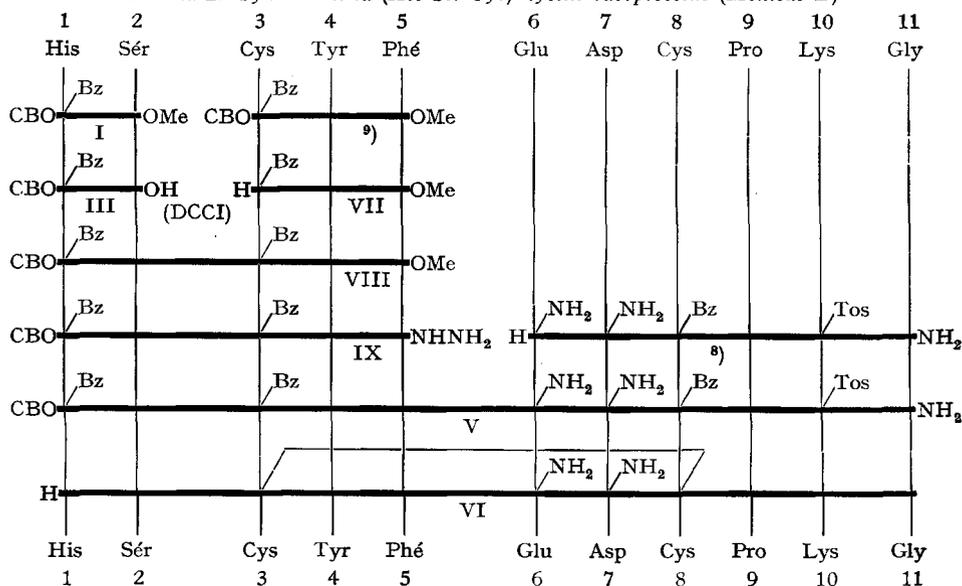
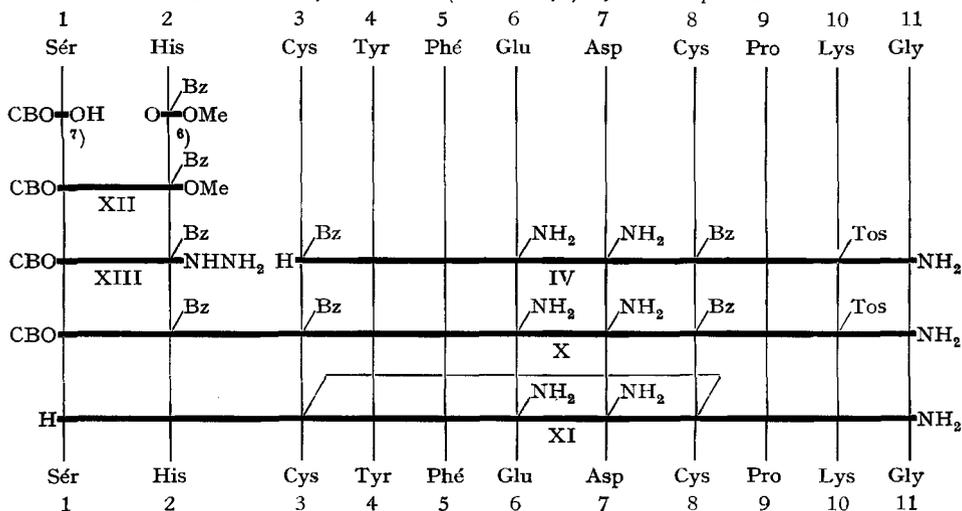


Schéma 3. Synthèse de la (Sér-His-Cys)<sup>1</sup>-lysine-vasopressine

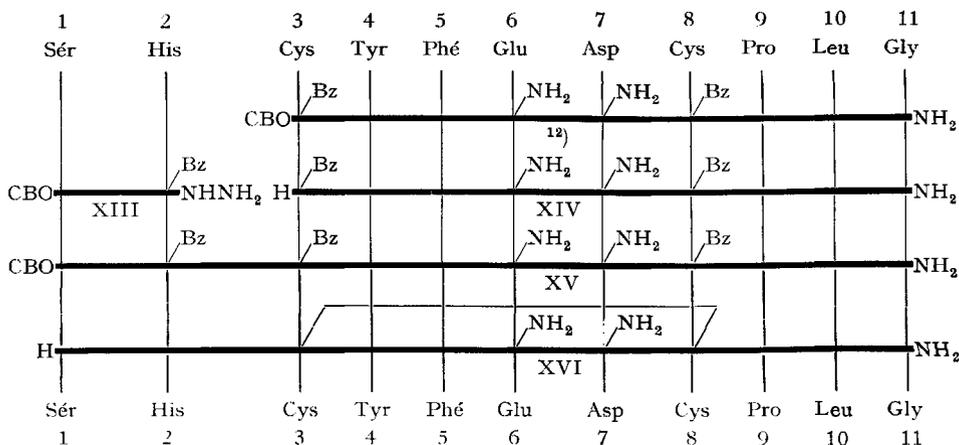
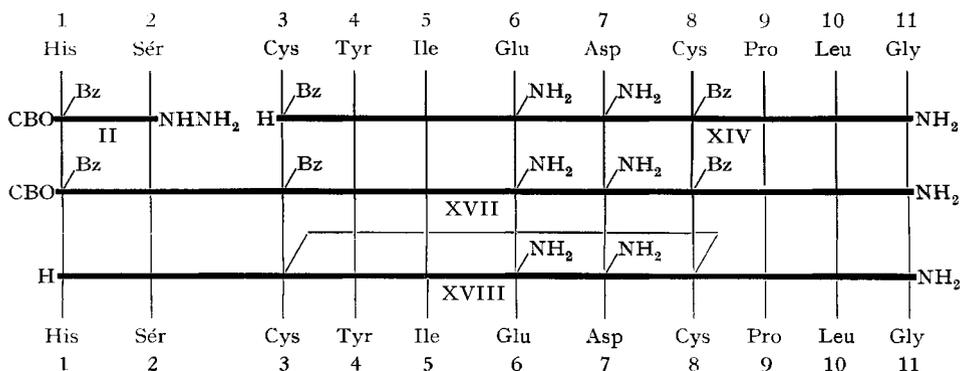


Les activités biologiques des quatre homologues ont été déterminées par les D<sup>rs</sup> BERDE, DOEPFNER & STÜRMER<sup>10)</sup> de notre Département de recherches médico-biologiques (Dir.: D<sup>r</sup> A. CERLETTI) et les plus importantes d'entre elles ont été confirmées par le Prof. R. GUILLEMIN<sup>11)</sup>.

<sup>9)</sup> R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, *Helv.* 39, 1421 (1956).

<sup>10)</sup> Cf. W. DOEPFNER, E. STÜRMER & B. BERDE, *Endocrinology* (sous presse).

<sup>11)</sup> Nous remercions vivement le Prof. R. GUILLEMIN (Baylor University, Houston, et Collège de France, Paris) de nous avoir aimablement communiqué ces résultats.

Schéma 4. Synthèse de la (Sér-His-Cys)<sup>1</sup>-oxytocineSchéma 5. Synthèse de la (His-Sér-Cys)<sup>1</sup>-oxytocine

Le nombre d'unités CRF<sup>13)</sup> possédées par 1 mg d'une substance est égal, par définition<sup>10)</sup>, à l'inverse de la quantité (en mg) de cette substance devant être injectée par voie intraveineuse chez un Rat de 200 g en narcose pentobarbital-morphine<sup>14)</sup> pour doubler le taux de corticostérone plasmatique. L'augmentation de la pression sanguine est mesurée sur le Rat traité à la dibenzylamine et anesthésié à l'uréthane<sup>15)</sup>, et elle est exprimée en *unités vasopressives* internationales par rapport au 3e standard international. L'*index de spécificité* est défini<sup>6)</sup> comme étant le rapport des unités CRF sur les unités vasopressives.

On voit (tableau 2) que la (His-Sér-Cys<sup>1</sup>)-lysine-vasopressine possède  $1/10$  de l'activité CRF de la lysine-vasopressine et seulement  $1/20$  de l'activité vasopressive

<sup>12)</sup> R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, *Helv.* **33**, 1491 (1955).  
<sup>13)</sup> CRF = Corticotropin Releasing Factor.

<sup>14)</sup> R. GUILLEMIN et coll., *Endocrinology* **63**, 349 (1958); *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **101**, 107 (1959); *J. Lab. clin. Med.* **53**, 830 (1959).

<sup>15)</sup> J. DEKANSKI, *Brit. J. Pharmacol.* **7**, 567 (1962).

Tableau 2. *Activités biologiques*

Formule chimique et désignation	Stimulation <i>in vivo</i> de la sécrétion d'ACTH chez le Rat. Unités CRF par mg. A	Augmentation de la pression sanguine du Rat. Unités int. par mg. B	Index de spécificité = A/B
H- <i>His-Sér-CyS-Tyr-Phé-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(NH<sub>2</sub>)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH<sub>2</sub></i> (His-Sér-Cys) <sup>1</sup> -lysine-vasopressine (VI)	720	11,0 (± 1,3)	66
H- <i>Sér-His-CyS-Tyr-Phé-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(NH<sub>2</sub>)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH<sub>2</sub></i> (Sér-His-Cys) <sup>1</sup> -lysine-vasopressine (XI)	125	2,0 (± 0,3)	63
H- <i>CyS-Tyr-Phé-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(NH<sub>2</sub>)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH<sub>2</sub></i> lysine-vasopressine	7500	270 (± 20)	28
H- <i>His-Sér-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(NH<sub>2</sub>)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub></i> (His-Sér-Cys) <sup>1</sup> -oxytocine (XVIII)	16	0,27 (± 0,03)	58
H- <i>Sér-His-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(NH<sub>2</sub>)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub></i> (Sér-His-Cys) <sup>1</sup> -oxytocine (XVI)	<15	0,04 (± 0,02)	—
H- <i>CyS-Tyr-Ile-Glu(NH<sub>2</sub>)-Asp(NH<sub>2</sub>)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub></i> oxytocine	180	5 (± 1)	36

de celle-ci. La spécificité de cet homologue est donc le double de celle de l'hormone naturelle<sup>16</sup>).

Le second homologue, la (Sér-His-Cys)<sup>1</sup>-lysine-vasopressine, quoique ne possédant que le cinquième des activités du premier, est cependant tout aussi spécifique que celui-ci. Il est intéressant de constater que, dans la famille de l'oxytocine aussi, l'allongement de la chaîne par une séquence His-Sér augmente la spécificité.

Nous croyons cependant que l'activité CRF et la spécificité de la (His-Sér-Cys)<sup>1</sup>-lysine-vasopressine, quelque remarquables qu'elles soient, ne sont toutefois pas assez élevées pour que l'on puisse considérer cet homologue comme étant éventuellement l'agent naturel apparenté à la vasopressine<sup>17</sup>), qui déclencherait la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse.

### Partie expérimentale<sup>18</sup>)

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  $60^\circ$  pour les analyses). Les évaporations sous vide ont été conduites dans l'évaporateur rotatif de CRAIG<sup>19</sup>).

Les chromatographies sur papier ont été effectuées selon la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040 lavé». Rf<sub>M</sub> dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:20); Rf<sub>A</sub> dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/eau (35:35:30); Rf<sub>P</sub> dans le mélange *n*-butanol/acide acétique/eau (70:10:20); Rf<sup>0</sup> sans scission préalable; Rf<sup>a</sup> après scission du groupe CBO— par séjour de 40 min à  $20^\circ$  dans une solution de HBr 4N dans l'acide acétique glacé; Rf<sup>t</sup> après scission du groupe CBO— par séjour de 60 min dans une solution saturée de HBr dans l'acide trifluoroacétique à  $0^\circ$ ; Rf<sup>h</sup> après scission par hydrogénation catalytique.

Les électrophorèses sur papier ont été effectuées dans l'appareil à électrophorèse sous haute tension de WIELAND & PFLEIDERER<sup>20</sup>): au pH 1,9 (E<sub>1,9</sub>) dans le mélange acide formique/acide acétique/eau (10:10:75); au pH 5,8 (E<sub>5,8</sub>) dans le mélange pyridine/acide acétique/eau (9:1:90). E<sub>1,9</sub> = 0,8 His indique qu'à pH 1,9 la substance migre 0,8 fois la distance que migre l'histidine. Les exposants o, a, h, et t ont la même signification que pour les chromatogrammes. Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et phérogrammes ont été décrits précédemment<sup>21</sup>).

*N-CBO-Im-Benzyl-L-histidyl-L-sérinate de méthyle (I)*. On suspend 11,4 g (30 mmoles) de N-CBO-Im-benzyl-L-histidine<sup>6</sup>) et 5,0 g (33 mmoles) de chlorhydrate de sérinate de méthyle<sup>7</sup>) dans 150 ml d'acétonitrile contenant 4,2 ml (30 mmoles) de triéthylamine, agite 15 min à  $20^\circ$  puis filtre. On dissout le résidu insoluble dans 150 ml de diméthylformamide en chauffant à  $100^\circ$  et l'ajoute au filtrat clair précédemment obtenu. Immédiatement après, on ajoute encore 7,40 g (36 mmoles) de dicyclohexyl-carbodimide, agite 20 h à  $20^\circ$ , filtre et évapore le filtrat à sec. Après trituration du résidu sous éther de pétrole, puis sous H<sub>2</sub>O et NH<sub>4</sub>OH 1N, on l'essore et le sèche sous vide poussé. Le produit ainsi obtenu est dissous dans 200 ml d'un mélange acétate d'éthyle/méthanol (3:1) à ébullition. Après avoir gardé la solution ainsi obtenue 3 h à  $0^\circ$ , on sépare par filtration les cristaux formés. Après lavage par l'acétate d'éthyle et séchage, on obtient 10,4 g (72%) de N-CBO-Im-benzyl-L-histidyl-L-sérinate de méthyle de F 173°.

<sup>16</sup>) Des essais effectués sur l'homme avec cet homologue par le Dr G. W. CLAYTON (Baylor University, Houston) en collaboration avec le Prof. GUILLEMIN<sup>7</sup>) n'ont pas montré une spécificité plus élevée.

<sup>17</sup>) R. GUILLEMIN, W. R. HEARN, W. R. CHEEK & D. E. HOUSHOLDER, *Endocrinology* 60, 488 (1957); R. GUILLEMIN & A. V. SCHALLY, *ibid.* 65, 555 (1959); A. V. SCHALLY, R. N. ANDERSEN, H. S. LIPSCOMB, J. M. LONG & R. GUILLEMIN, *Nature* 188, 1192 (1960).

<sup>18</sup>) Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr W. SCHÖENIGER).

<sup>19</sup>) L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, *Analyt. Chemistry* 22, 1462 (1950).

<sup>20</sup>) TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 67, 257 (1955).

<sup>21</sup>) ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 43, 200 (1960).

$[\alpha]_D^{21} = +7,0^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,1$ ; méthanol);  $+4,0^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,0$ ; diméthylformamide);  $+7,5^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,0$ ; acide acétique 95%).

$Rf_M^t = 0,7$ ;  $Rf_A^t = 0,6$ ;  $Rf_P^t = 0,5$ ;  $E_{1,9}^t = 0,8$  His;  $E_{5,8}^t = 1,1$  His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène). Les  $Rf^h$  et  $E^h$  sont identiques aux  $Rf^t$  et  $E^t$ . – Par hydrogénation catalytique en solution méthanolique, il ne se produit pas de débenzylation du noyau imidazolique comme c'est le cas pour le N-CBO-L-séryl-Im-benzyl-L-histidinate de méthyle (XII).

$C_{25}H_{23}O_6N_4$ (480,5)	Calc. C 62,5 Tr. „ 62,6	H 5,9 „ 5,9	O 20,0 „ 20,1	N 11,7% „ 11,7%
---------------------------------	----------------------------	----------------	------------------	--------------------

*N-CBO-Im-Benzyl-L-histidyl-L-séryl-hydrasidate (II)*. On dissout 2,88 g (6,0 mmoles) de N-CBO-Im-benzyl-L-histidyl-L-sérinate de méthyle (I) dans 35 ml de méthanol bouillant et on y ajoute sans refroidir 1,6 ml d'hydrate d'hydrazine. On maintient la solution ainsi obtenue 24 h à 20°. Il se produit rapidement une prise en masse cristalline. On filtre, lave avec méthanol, méthanol-éther, puis éther, et sèche au vide poussé sur  $P_2O_5$ . On obtient ainsi 2,47 g (85%) de N-CBO-Im-benzyl-L-histidyl-L-séryl-hydrasidate de F 155°.  $[\alpha]_D^{25} = -1,2^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,0$ ; méthanol);  $0,0^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,0$ ; diméthylformamide);  $0,0^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,0$ ; acide acétique 95%).

$Rf_M^t = 0,6$ ;  $Rf_A^t = 0,7$ ;  $Rf_P^t = 0,4$ ;  $E_{1,9}^t = 0,9$  His;  $E_{5,8}^t = 1,1$  His (révélation par ninhydrine, chlore et FoLIN; homogène). Les  $Rf^h$  et  $E^h$  sont identiques aux  $Rf^t$  et  $E^t$ .

$C_{24}H_{28}O_6N_6$ (480,5)	Calc. C 60,0 Tr. „ 59,9	H 5,9 „ 6,0	O 16,6 „ 16,5	N 17,5% „ 17,4%
---------------------------------	----------------------------	----------------	------------------	--------------------

*N-CBO-Im-Benzyl-L-histidyl-L-sérine (III)*. On dissout 9,6 g (20 mmoles) d'ester dipeptidique I dans 100 ml de méthanol/acétone (2:1), ajoute 40 ml de NaOH 1N, maintient la solution ainsi obtenue 1 h à 20°, amène le pH à 6 à l'aide d'HCl 4N, évapore à sec, triture le résidu dans l'acide acétique 0,1N et filtre. On redissout le résidu dans 200 ml d'eau bouillante et laisse cristalliser à 0°. Après filtration et séchage, on obtient 8,41 g (90%) de N-CBO-Im-benzyl-L-histidyl-L-sérine de F 182°.  $[\alpha]_D^{21} = +12,0^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,0$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^t = 0,5$ ;  $Rf_A^t = 0,4$ ;  $E_{1,9}^t = 0,7$  His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{24}H_{26}O_6N_4$ (466,5)	Calc. C 61,8 Tr. „ 61,2	H 5,6 „ 6,2	O 20,6 „ 20,6	N 12,0% „ 11,8%
---------------------------------	----------------------------	----------------	------------------	--------------------

*S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide, HBr (IV)*. On dissout 2,14 g (1,4 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide<sup>8)</sup> dans 20 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, maintient 1 h à 20°, concentre à 10 ml sous pression réduite et précipite par adjonction de 30 ml d'éther. Après filtration, on recristallise le produit dans 20 ml d'un mélange de méthanol/éthanol/éther (1:1:1). On obtient ainsi 2,06 g (95%) de S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F 180° (déc.).  $[\alpha]_D^{22} = -28,0^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,0$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^t = 1,0$ ;  $Rf_A^t = 0,8$ ;  $Rf_P^t = 0,6$ ;  $E_{1,9}^t = 0,6$  Try (révélation par ninhydrine, chlore et FoLIN; homogène).

$C_{67}H_{85}O_{14}N_{13}S_3$ , HBr + 4H <sub>2</sub> O (1545,6)	Calc. C 52,1 Tr. „ 52,4	H 6,1 „ 6,1	O 18,6 „ 18,3	N 11,8 „ 11,5	S 6,2 „ 6,0	Br 5,2% „ 5,9%
---	----------------------------	----------------	------------------	------------------	----------------	-------------------

*N-CBO-Im-Benzyl-L-histidyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (V)*. – A. Par 2+9. On dissout 384 mg (0,8 mmole) d'hydrazide dipeptidique II dans un mélange de 0,8 ml d'HCl 4N et de 4 ml de diméthylformamide, refroidit à  $-5^\circ$ , ajoute 0,2 ml d'une solution aqueuse de  $NaNO_2$  4N, agite, puis, après 5 min, ajoute 0,45 ml (3,2 mmoles) de triéthylamine et 4 ml d'acétate d'éthyle, sèche rapidement sur  $Na_2SO_4$  et évapore l'acétate d'éthyle à 10° sous pression réduite. Au résidu, on ajoute 1,00 g (0,65 mmole) de bromhydrate d'amide nonapeptidique IV dissous dans 3 ml de diméthylformamide contenant en outre 0,10 ml (0,7 mmole) de triéthylamine. Après 24 h, on évapore la solution à sec au vide, triture le résidu dans l'eau, filtre et sèche. On purifie le produit brut ainsi obtenu en le suspendant dans 5 ml de méthanol bouillant et le filtrant à chaud, et on répète encore deux fois cette opération. Après séchage, on obtient 778 mg (65%) de N-CBO-Im-benzyl-L-histidyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-

S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl- $\epsilon$ -N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F 206°.  $[\alpha]_D^{21} = -33,5 \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,0$ ; diméthylformamide).  $E_{1,9}^A = 0,8$  Try (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène).  $C_{91}H_{109}O_{19}N_{17}S_3$  Calc. C 59,4 H 6,0 O 16,5 N 12,9 S 5,2%  
(1841,1) Tr. ,, 59,2 ,, 6,3 ,, 16,1 ,, 12,8 ,, 5,0%

B. Par 5 + 6. On dissout 2,85 g (2,9 mmoles) d'hydrazide pentapeptidique VIII dans un mélange de diméthylformamide/isopropanol/HCl 4N (5:5:1), refroidit à  $-5^\circ$  et ajoute sous agitation 0,6 ml de  $NaNO_2$  5N, puis, après 5 min, 15 ml de  $NaHCO_3$  10% et 75 ml d'eau. On filtre, lave le précipité par l'eau à  $0^\circ$  et essore par centrifugation. On dissout l'azide pentapeptidique ainsi obtenu dans 30 ml de diméthylformamide, ajoute 2,45 g (2,8 mmoles) de L-glutaminy-L-asparaginy-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl- $\epsilon$ -N-tosyl-L-lysyl-glycinamide<sup>8)</sup> et concentre la solution sous pression réduite à  $20^\circ$ . Après 12 h on ajoute 200 ml d'éther, filtre et purifie le précipité comme ci-dessus. On obtient ainsi 2,61 g (50%) d'endécapeptide possédant exactement les mêmes propriétés physiques que celui obtenu par la méthode A).

(His-Sér-Cys)<sup>1</sup>-Lys<sup>8</sup>-Vasopressine (VI). On dissout 740 mg (0,4 mmole) de l'amide endécapeptidique V dans 750 ml d'ammoniac redistillé sur sodium, et ajoute lentement sous forte agitation du sodium jusqu'à l'apparition d'une teinte bleue. On détruit l'excès de sodium en ajoutant 250 mg de  $NH_4Cl$ , évapore la solution ammoniacale à sec et reprend le résidu dans 550 ml d'acide acétique 0,01N. On ajuste le pH de la solution ainsi obtenue à 8,6, y fait passer un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate, ramène le pH à 4,5, évapore à sec sous pression réduite et introduit le résidu dans un appareil de distribution en contre-courant. Après 480 transferts dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoracétique (120:160:1), on détermine la courbe de répartition<sup>22)</sup>. On réunit le contenu des tubes centraux du sommet principal ( $K = 0,20$ ), concentre sous vide et fait passer sur une colonne d'échangeur d'ion IRA-45 (cycle acétate) pour remplacer l'acide trifluoracétique par l'acide acétique. Le produit ainsi obtenu, qui représente les 51% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil, est homogène à l'électrophorèse et à la chromatographie sur papier après révélation par ninhydrine, chlore, bleu de bromophénol et FOLIN.  $Rf_M^0 = 0,2$ ;  $Rf_A^0 = 0,4$ ;  $Rf_B^0 = 0,15$ ;  $E_{1,9}^0 = 1,0$  Glu;  $E_{5,8}^0 = 0,8$  His. — Après hydrolyse acide totale (HCl 6N, 14 h,  $110^\circ$ ), on retrouve les acides aminés composants dans le rapport attendu.

Activités biologiques exprimées en unités internationales par mg: utérus isolé de Rat, 0,14 ( $\pm 0,04$ ); baisse de la pression sanguine du Coq, environ 0,3; pression interne de la glande mammaire du Lapin, environ 0,7; pression sanguine du Rat, 11,0 ( $\pm 1,3$ ); inhibition de la diurèse du Rat, 6,1 ( $\pm 0,8$ ). Activité CRF en unités CRF par mg<sup>10)</sup>: 720.

S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle, HBr (VII). On dissout 6,70 g (10 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylaninate de méthyle<sup>9)</sup> dans 50 ml d'une solution 3,7N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à  $20^\circ$ , concentre à moitié du volume, ajoute 200 ml d'éther, filtre, lave le précipité à l'éther, puis le redissout à l'ébullition dans 100 ml d'acétate d'éthyle contenant 5 ml de méthanol. Après cristallisation à  $0^\circ$ , filtration, lavage à l'éther et séchage, on obtient 5,54 g (90%) de bromhydrate de S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle de F 203°.  $[\alpha]_D^{22} = +3,0 \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,0$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^0 = 1,0$ ;  $Rf_A^0 = 1,0$ ;  $Rf_B^0 = 1,0$ ;  $E_{1,9}^0 = 0,5$  His;  $E_{1,9}^0 = 0,8$  Try (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène).

$C_{29}H_{33}O_3N_3S$ , HBr Calc. C 56,5 H 5,6 O 13,0 N 6,8 S 5,2 Br 13,0%  
(616,6) Tr. ,, 56,1 ,, 5,6 ,, 13,7 ,, 6,4 ,, 5,6 ,, 12,9%

Pour la préparation de la base libre, on répartit 5,0 g de bromhydrate d'ester tripeptidique dans un mélange de 100 ml d'acétate d'éthyle et 10 ml de  $K_2CO_3$  50%, sépare les phases, sèche la solution organique sur  $Na_2SO_4$ , concentre à 10 ml et ajoute 50 ml d'éther de pétrole, ce qui provoque la cristallisation du produit. Après filtration et séchage, on obtient 4,31 g (100%) d'ester tripeptidique, que l'on utilise aussitôt pour la suite de la synthèse.

N-CBO-Im-Benzyl-L-histidyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle (VIII). On dissout 3,74 g (8 mmoles) de dipeptide III et 4,28 g (8 mmoles) d'ester tripeptidique VII (base libre) dans 20 ml de pyridine, ajoute 40 ml d'acétonitrile, refroidit à  $-5^\circ$ ,

<sup>22)</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).

ajoute 2,06 g (10 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite 12 h à 20°. On filtre, lave le précipité par 20 ml de pyridine et évapore le filtrat à sec. On dissout le résidu dans 50 ml d'acétonitrile à l'ébullition, laisse cristalliser à 0°, filtre, lave à l'éther et sèche. On obtient 5,37 g (69%) de N-CBO-Im-benzyl-L-histidyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninate de méthyle de F 216° (ramollissement à 170°).  $[\alpha]_D^{22} = -26,0 \pm 0,5$  ( $c = 1,0$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^a = 0,9$ ;  $Rf_A^a = 0,9$ ;  $Rf_B^a = 0,8$ ;  $E_{1,9}^a = 1,1$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,9$  His (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène).

$C_{53}H_{57}O_{10}N_7S$	Calc. C 64,7	H 5,8	O 16,3	N 10,0	S 3,3%
(984,2)	Tr. „ 64,3	„ 6,1	„ 16,0	„ 10,0	„ 3,4%

N-CBO-Im-Benzyl-L-histidyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalananyl-hydrazide (IX). On dissout 3,93 g (4,0 mmoles) d'ester pentapeptidique VIII dans 20 ml de diméthylformamide, ajoute 2 ml d'hydrate d'hydrazine, maintient 12 h à 20°, évapore à sec au vide, triture le résidu dans le méthanol, filtre, lave au méthanol puis à l'éther, et sèche. On obtient 3,70 g (94%) de N-CBO-Im-benzyl-L-histidyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalananyl-hydrazide de F 220°.  $[\alpha]_D^{22} = -25,0 \pm 0,5$  ( $c = 1,0$ ; diméthylformamide);  $-16,0 \pm 0,5$  ( $c = 1,0$ ; acide acétique 95%).  $Rf_M^a = 0,9$ ;  $Rf_A^a = 0,8$ ;  $Rf_B^a = 0,8$ ;  $E_{1,9}^a = 1,1$  Glu;  $E_{5,8}^a = 0,9$  His (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène).

$C_{52}H_{57}O_9N_9S$	Calc. C 63,5	H 5,8	O 14,6	N 12,8	S 3,3%
(984,2)	Tr. „ 63,3	„ 5,8	„ 14,6	„ 12,9	„ 3,5%

N-CBO-L-Séryl-Im-benzyl-L-histidyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalananyl-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (X). On dissout 384 mg (0,8 mmole) d'hydrazide dipeptidique XIII dans un mélange de 0,8 ml d'HCl 4N et de 4 ml de diméthylformamide, refroidit à  $-5^\circ$ , ajoute 0,2 ml d'une solution aqueuse de  $NaNO_2$  4N, agite, ajoute après 5 min 0,45 ml (3,2 mmoles) de triéthylamine et 4 ml d'acétate d'éthyle, sèche rapidement sur  $Na_2SO_4$  et évapore l'acétate d'éthyle sous pression réduite à  $10^\circ$ . Au résidu, on ajoute une solution de 1,00 g (0,65 mmole) de bromhydrate d'amide nonapeptidique IV dans 3 ml de diméthylformamide et 0,10 ml (0,7 mmole) de triéthylamine et maintient la solution ainsi obtenue à  $20^\circ$ . Après 24 h on évapore à sec, triture le résidu dans l'eau, filtre et lave le précipité par l'eau. Après séchage, on suspend le produit dans 5 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud et répète encore deux fois cette opération. Après séchage, on obtient 638 mg (53%) de N-CBO-L-séryl-Im-benzyl-L-histidyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalananyl-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F 220°.  $[\alpha]_D^{22} = -40 \pm 1$  ( $c = 1,0$ ; diméthylformamide). Le produit non scindé est homogène à la chromatographie sur couche mince de silicagel G dans les systèmes  $CH_3OH/CHCl_3$  (1:1) et  $CH_3OH$  (révélation par vapeurs d'iode et FOLIN).  $E_{1,9}^a = 0,8$  Try (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène).

$C_{91}H_{100}O_{19}N_{17}S + 2H_2O$	Calc. C 58,2	H 6,1	O 17,9	N 12,7	S 5,1%
(1877,1)	Tr. „ 58,1	„ 6,3	„ 17,8	„ 12,1	„ 5,2%

(Sér-His-Cys)<sup>1</sup>-Lys<sup>8</sup>-Vasopressine (XI). On dissout 430 mg (0,234 mmole) de l'amide endécapeptidique X dans 300 ml d'ammoniac redistillé sur sodium, ajoute lentement du sodium jusqu'à l'apparition d'une teinte bleue persistante, puis 150 mg de  $NH_4Cl$  et évapore à sec. On redissout le résidu dans 300 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,6 et fait passer un courant d'air dans la solution jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. On ramène le pH à 4,5, évapore la solution à sec au vide et introduit le résidu dans un appareil de distribution en contre-courant. Après 491 transferts dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoracétique (120:160:1) on détermine la courbe de répartition<sup>22</sup>). On obtient un sommet principal ( $K = 0,20$ ) et un sommet secondaire ( $K = 0,33$ ). On réunit le contenu des tubes centraux du sommet principal et concentre sous vide. Le produit ainsi obtenu, qui représente 61% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil, est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse sur papier après révélation par ninhydrine, chlore, bleu de bromophénol et FOLIN.  $Rf_M^a = 0,2$ ;  $Rf_A^a = 0,3$ ;  $Rf_B^a = 0,05$ ;  $E_{1,9}^a = 1,0$  Glu;  $E_{5,8}^a = 0,8$  His. – Après hydrolyse acide totale (HCl 6N, 12 h à  $110^\circ$ ), on obtient les acides aminés composants dans les rapports attendus.

Activités biologiques exprimées en unités internationales par mg: utérus isolé du Rat, environ 0,08; baisse de la pression sanguine du Coq, environ 0,3; pression interne de la glande mammaire du Lapin, environ 0,6; pression sanguine du Rat, 2,0 ( $\pm 0,3$ ). Activité CRF par mg<sup>10</sup>): 125.

*N-CBO-L-Séryl-Im-benzyl-L-histidinate de méthyle (XII)*. On dissout 4,98 g (15 mmoles) de dichlorhydrate d'Im-benzyl-L-histidinate de méthyle<sup>6</sup>) dans 15 ml d'une solution 2,7N d'ammoniac dans le chloroforme, agite 5 min à 0°, filtre, évapore la solution sous pression réduite et sèche le résidu huileux jusqu'à poids constant. Les 3,70 g (14 mmoles) d'Im-benzyl-L-histidinate de méthyle ainsi obtenus sont dissous dans un mélange de 25 ml d'acétonitrile et 10 ml de pyridine et additionnés de 3,36 g (14 mmoles) de N-CBO-L-sérine<sup>7</sup>). La solution tout d'abord limpide se prend ensuite en une masse cristalline. On refroidit le mélange à -5°, ajoute 4,12 g (20 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite à 20°. Après 20 h on filtre, lave le précipité par 15 ml de pyridine, évapore le filtrat à sec, triture le résidu sous l'éther, filtre et sèche. Le résidu est redissous dans un mélange de 75 ml d'acétate d'éthyle et 15 ml de méthanol à l'ébullition. A 0° le produit cristallise en fines aiguilles. On filtre, lave les cristaux par l'acétate d'éthyle puis sèche. On obtient 5,1 g (76%) de N-CBO-L-séryl-Im-benzyl-L-histidinate de méthyle de F 167°.  $[\alpha]_D^{25} = 0,0^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2,0$ ; méthanol);  $+8,0^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,1$ ; diméthylformamide);  $-15,0^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,0$ ; acide acétique 95%).  $Rf_M^1 = 0,6$ ;  $Rf_A^1 = 0,6$ ;  $Rf_P^1 = 0,4$ ;  $E_{5,8}^1 = 1,3$  His;  $E_{1,9}^1 = 0,9$  His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène). - Si on effectue la scission du groupe CBO par hydrogénation catalytique en solution méthanolique, il se produit une lente débenzylation et on obtient une seconde tache, révélable en jaune par le réactif de PAULY.

$C_{25}H_{28}O_6N_4$	Calc.	C 62,5	H 5,9	O 20,0	N 11,7%
(480,5)	Tr.	62,6	5,9	20,1	11,7%

*N-CBO-L-Séryl-Im-benzyl-L-histidyl-hydrasidide (XIII)*. On dissout 3,84 g (8,0 mmoles) d'ester dipeptidique XII, dans 30 ml de méthanol bouillant, ajoute 2,0 ml d'hydrate d'hydrazine et maintient la solution ainsi obtenue à 20°. Après une heure, la cristallisation commence et la solution se transforme rapidement en une masse cristalline. On filtre, lave les cristaux avec méthanol, méthanol/éther (1:1) et éther. Après séchage, on obtient 3,64 g (95%) de N-CBO-L-séryl-Im-benzyl-L-histidyl-hydrasidide de F 199°.  $[\alpha]_D^{25} = +5,3^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,0$ ; diméthylformamide);  $-18,8^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,0$ ; acide acétique 95%).  $Rf_M^1 = 0,6$ ;  $Rf_A^1 = 0,5$ ;  $Rf_P^1 = 0,3$ ;  $E_{5,8}^1 = 0,9$  His;  $E_{5,8}^1 = 1,1$  His (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène). - Par hydrogénation catalytique en solution méthanolique, il se produit une lente débenzylation du noyau imidazolique.

$C_{24}H_{28}O_5N_6$	Calc.	C 60,0	H 5,9	O 16,6	N 17,5%
(480,5)	Tr.	59,9	6,0	16,5	17,4%

*S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide, HBr (XIV)*. On dissout 4,90 g (3,7 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide<sup>12</sup>) dans 60 ml d'une solution 3,6N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique, maintient 1 h à 20°, concentre au vide et précipite par adjonction de 60 ml d'éther. On filtre, lave abondamment le précipité à l'éther et sèche. Les 5,25 g de produit brut obtenus sont dissous dans 25 ml de méthanol bouillant, additionnés de 25 ml d'eau et maintenus à 0°. Après 6 h, on sépare par filtration les cristaux formés, lave par 10 ml de méthanol/eau (1:1) et sèche. On obtient ainsi 3,31 g (67%) de bromhydrate de S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F 220°.  $[\alpha]_D^{25} = -33,0^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 0,5$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^1 = 1,0$ ;  $Rf_A^1 = 0,8$ ;  $Rf_P^1 = 0,6$ ;  $E_{1,9}^1 = 0,6$  (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène).

$C_{57}H_{80}O_{12}N_{12}S_2$	Calc.	C 51,5	H 6,6	O 18,1	N 12,6	S 4,8	Br 6,0%
(1324,4)	Tr.	51,5	6,8	18,0	12,4	4,7	6,1%

*N-CBO-L-Séryl-Im-benzyl-L-histidyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XV)*. A une solution de N-CBO-L-séryl-Im-benzyl-L-histidylazide, préparée (selon la méthode décrite sous V) à partir de 480 mg (1,0 mmole) d'hydrazide dipeptidique XIII, on ajoute 1,06 g (0,8 mmole) de bromhydrate d'amide nonapeptidique XIV et 0,12 ml (0,8 mmole) de triéthylamine et maintient la solution ainsi obtenue 24 h à 20°. On évapore le diméthylformamide sous pression réduite, triture le résidu dans l'eau, puis filtre et sèche. On suspend l'endécapeptide brut ainsi obtenu dans 5 ml de méthanol bouillant, filtre et répète encore une fois cette opération. Après séchage, on obtient 690 mg (50%) de N-CBO-L-séryl-Im-benzyl-L-histidyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-

L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F 238°. – L'endécapeptide non scindé est homogène à la chromatographie sur couche mince de silicagel G dans les systèmes CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (1:1) et MeOH (révélation par vapeurs d'iode et FOLIN).  $[\alpha]_D^{25} = -35 \pm 1^\circ$  ( $c = 1,0$ ; diméthylformamide).  $E_{1,9}^0 = 0,8$  Try (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène).

$C_{81}H_{104}O_{17}N_{16}S_2 + 5H_2O$ (1727,9)	Calc. C 56,3 H 6,6 O 20,4 N 13,0 S 3,7% Tr. „ 56,5 „ 6,6 „ 20,6 „ 13,0 „ 3,8%
--	--

(Sér-His-Cys)<sup>1</sup>-Oxytocine (XVI). On dissout 400 mg (0,244 mmole) de l'amide endécapeptidique XV dans 300 ml d'ammoniac redistillé sur sodium et ajoute du sodium jusqu'à l'apparition d'une couleur bleue, puis 150 mg de NH<sub>4</sub>Cl, et évapore à sec. On redissout le résidu dans 300 ml d'acide acétique 0,02 N (dissolution assez difficile), ajuste le pH à 8,6 et fait barboter un courant d'air dans la solution jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. On ramène le pH à 4,5, évapore la solution à sec, introduit le résidu dans un appareil de distribution en contre-courant, effectue 466 transferts dans le système *sec*-butanol/eau/acide acétique (100:120:1) et détermine la courbe de répartition par colorimétrie<sup>22)</sup>. On obtient un sommet principal ( $K = 0,17$ ) et un sommet secondaire mineur ( $K = 0,02$ ). On réunit le contenu des tubes centraux du sommet principal et concentre sous vide. Le produit obtenu, qui représente 41% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil, est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse sur papier, après révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN.  $Rf_M^0 = 0,4$ ;  $Rf_A^0 = 0,6$ ;  $Rf_P^0 = 0,2$ ;  $E_{1,9}^0 = 0,9$  Try;  $E_{5,8}^0 = 0,6$  His. – L'hydrolyse acide totale (HCl 6 N, 12 h, 110°) fournit les acides aminés composants dans les rapports attendus.

Activités biologiques exprimées en unités internationales par mg: Utérus isolé du Rat, 3,0 ( $\pm 0,4$ ); baisse de la pression sanguine du Coq, 2,5 ( $\pm 0,1$ ); pression interne de la glande mammaire du Lapin, 2,5 ( $\pm 0,4$ ); pression sanguine du Rat, 0,04 ( $\pm 0,02$ ). Activité CRF en unités CRF<sup>16)</sup> par mg: moins de 15.

N-CBO-Im-Benzyl-L-histidyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XVII). A une solution de N-CBO-Im-benzyl-L-histidyl-L-sérylazide, préparée (selon la méthode décrite sous V) à partir de 480 mg (1,0 mmole) d'hydrazide dipeptidique II, on ajoute 1,06 g (0,8 mmole) de bromhydrate d'amide nonapeptidique XIV et 0,12 ml (0,8 mmole) de triéthylamine, et maintient la solution ainsi obtenue 24 h à 20°. On évapore le diméthylformamide sous pression réduite, triture le résidu dans l'eau, puis filtre et sèche. On suspend le peptide brut ainsi obtenu dans 8 ml de méthanol bouillant, filtre et répète encore deux fois cette opération. Après séchage, on obtient 915 mg (69%) de N-CBO-Im-benzyl-L-histidyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-L-glycinamide de F 229°. – L'endécapeptide non scindé est homogène à la chromatographie sur couche mince de silicagel G dans les systèmes CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (1:1) et CH<sub>3</sub>OH (révélation par vapeurs d'iode et FOLIN).  $[\alpha]_D^{21} = -30 \pm 0,5^\circ$  ( $c = 0,9$ ; diméthylformamide).  $E_{1,9}^0 = 0,8$  Try (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN; homogène).

$C_{81}H_{104}O_{17}N_{16}S_2 + 2H_2O$ (1673,9)	Calc. C 58,1 H 6,5 O 18,2 N 13,4 S 3,9% Tr. „ 57,2 „ 6,5 „ 18,3 „ 13,3 „ 4,0%
--	--

(His-Sér-Cys)<sup>1</sup>-Oxytocine (XVIII). On dissout 400 mg (0,244 mmole) de l'amide endécapeptidique XVII dans 300 ml d'ammoniac redistillé sur sodium et ajoute lentement du sodium jusqu'à coloration bleue persistante, puis 150 mg de NH<sub>4</sub>Cl, et évapore à sec. On redissout le résidu dans 300 ml d'acide acétique 0,02 N, ajuste le pH à 8,6, fait barboter un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate, ramène le pH à 4,5 et évapore la solution à sec au vide. On introduit le produit dans un appareil de distribution en contre-courant et, après 466 transferts dans le système *sec*-butanol/eau/acide acétique (100:120:1), on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes<sup>22)</sup>. On obtient un sommet principal ( $K = 0,17$ ) et un sommet secondaire ( $K = 0,02$ ). Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré au vide. Le produit ainsi obtenu, qui représente 48% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil, est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse sur papier après révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN.  $Rf_M^0 = 0,4$ ;  $Rf_A^0 = 0,6$ ;  $Rf_P^0 = 0,2$ ;  $E_{5,8}^0 = 0,5$  His;  $E_{1,9}^0 = 0,8$  Try. – L'hydrolyse acide totale (HCl 6 N, 12 h à 110°) fournit les acides aminés dans les rapports attendus.

Activités biologiques exprimées en unités internationales par mg: utérus isolé du Rat, 15,6 ( $\pm 1,2$ ); baisse de la pression sanguine du Coq, 15,5 ( $\pm 0,8$ ); pression interne de la glande mammaire du Lapin, 12,6 ( $\pm 0,6$ ); pression sanguine du Rat, 0,27 ( $\pm 0,03$ ). Activité CRF en unités CRF par mg<sup>10</sup>): 16.

## SUMMARY

(His-Ser-Cys)<sup>1</sup>-lysine-vasopressin, (Ser-His-Cys)<sup>1</sup>-lysine-vasopressin, (His-Ser-Cys)<sup>1</sup>-oxytocin and (Ser-His-Cys)<sup>1</sup>-oxytocin have been synthesized by condensing dipeptide azides with nonapeptides. The first peptide was also prepared by reacting a pentapeptide azide with an hexapeptide. It exhibits a noteworthy ACTH-releasing activity *in vivo* and a better specificity than lysine-vasopressin.

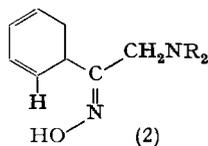
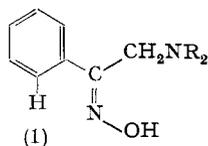
Laboratoires de chimie pharmaceutique, SANDOZ SA., Bâle

## 286. Herstellung und Konfigurationsbestimmung von *syn* und *anti* $\alpha$ -Aminoketoxim-Derivaten

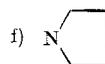
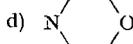
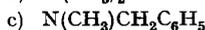
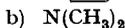
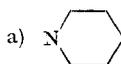
von H. P. Fischer und C. A. Grob

(5. X. 62)

Für eine Untersuchung der Fragmentierung von  $\alpha$ -Aminoketoxim-Derivaten<sup>1)</sup> wurde eine Anzahl von  $\alpha$ -Aminoacetophenoximen bekannter Konfiguration der *syn*- und *anti*-Reihe<sup>2) 3)</sup> (1) bzw. (2) benötigt.



NR<sub>2</sub> =



Die Durchsicht der Literatur ergab, dass in der Regel nur eine der beiden geometrisch isomeren Formen durch Umsetzung von  $\alpha$ -Aminoketonen mit Hydroxylamin erhältlich ist. Im Falle von  $\alpha$ -Piperidino-acetophenon entstehen jedoch zwei durch Kristallisation trennbare Isomere (1a) und (2a), deren Konfiguration aber nicht bestimmt wurde<sup>4)</sup>. In der vorliegenden Arbeit werden Methoden zur Kon-

<sup>1)</sup> Vgl. nachfolgende Mitteilung, Helv. 45, 2539 (1962).

<sup>2)</sup> Der üblichen Konvention<sup>3)</sup> folgend, wird dasjenige Isomere als die *syn*- bzw. *anti*-Form bezeichnet, in welchem die Hydroxylgruppe *cis*- bzw. *trans*-ständig zum jeweils erstgenannten Substituenten angeordnet ist. Verbindung (1) ist somit ein *syn*- $\alpha$ -Amino-acetophenon-oxim bzw. *syn*-Aminomethyl-phenyl-ketoxim.

<sup>3)</sup> Vgl. L. G. DONARUMA & W. Z. HELDT, Org. Reactions 11, 1 (1960).

<sup>4)</sup> N. H. CROMWELL & H. HOEKSEMA, J. Amer. chem. Soc. 66, 870 (1944).