

1,5-Dioxo-7-methyl-2-azaspiro[5,5]undecan (XV): 3,6 g XIII wurden in 50 ml Feinsprit mit 0,5 g Pd-Kohle bis zur Absorption von 2 Mol. Wasserstoff hydriert. Umkristallisation aus Aceton-Cyclohexan. Smp. 149°.

$C_{11}H_{17}O_2N$ Ber. C 67,66 H 8,78% Gef. C 67,70 H 8,83%

1,5-Dioxo-4-hydroxymethyl-7-methyl- $\Delta^{8,4;9,10}$ -2-azaspiro[5,5]-undecadien (XVI): 3,82 g XIII, 10 ml Wasser und 2 ml 35-proz. Formalinlösung wurden auf 35° erwärmt und mit 0,5 g Natriumsulfit versetzt. Nach einigen Min. war vollständige Lösung eingetreten. Nach 12 Std. wurde mit 50 ml Wasser verdünnt und mit Methylenchlorid extrahiert. Das erhaltene Öl (2,9 g) wurde an 50 g Alox (Akt. I) chromatographiert. Die Hydroxymethylverbindung XVII wurde mit Äther-Methanol 10:1 eluiert und aus Essigester kristallisiert. Smp. 130°. Ausbeute: 2,74 g.

$C_{12}H_{15}O_3N$ Ber. C 65,14 H 6,83% Gef. C 65,05 H 6,91%

1,5-Dioxo-4,7-dimethyl-2-azaspiro[5,5]undecan (XVII): 1,0 g XVI wurden in 30 ml Feinsprit mit 0,3 g Pd-Kohle hydriert. Aufnahme von 3 Mol. Wasserstoff in 15 Min. Umkristallisation aus Petroläther. Smp. 121°. Ausbeute: 0,85 g.

$C_{12}H_{19}O_2N$ Ber. C 68,86 H 9,15% Gef. C 68,49 H 8,98%

1,5-Dioxo-4-hydroxymethyl-7- $\Delta^{8,4}$ -2-azaspiro[5,5]undecan (XVIII): 5,7 g XIV wurden mit 15 ml Wasser, 3 ml 35-proz. Formalinlösung und 0,75 g Natriumsulfit wie oben umgesetzt. XIV wurde auch nach Chromatographie an Alox (Akt. I, Elution mit Äther-Methanol 10:1) nur als Öl erhalten. Ausbeute: 3,4 g.

1,5-Dioxo-4,7-dimethyl-2-azaspiro[5,5]undecan (XVII): 3,4 g öliges XVIII wurden in 40 ml Feinsprit mit 0,5 g Pd-Kohle bis zur Aufnahme von 2 Mol. Wasserstoff hydriert. Umkristallisation aus Petroläther. Smp. 121°. IR.-Spektrum identisch mit dem des durch Hydrierung von XVI gewonnenen Produktes; Misch-Smp. ohne Depression.

$C_{12}H_{19}O_2N$ Ber. C 68,86 H 9,15% Gef. C 68,53 H 9,06%

SUMMARY

A number of spirocyclic piperidindiones have been synthesized and their hypnotic properties studied.

Forschungslaboratorium der AB HÄSSLE, Göteborg, Schweden

296. Synthèse de la Sér⁴-Ile⁸-Oxytocine, une éventuelle hormone hypophysaire de certains poissons (Isotocine)

par St. Guttman

(2 XI 62)

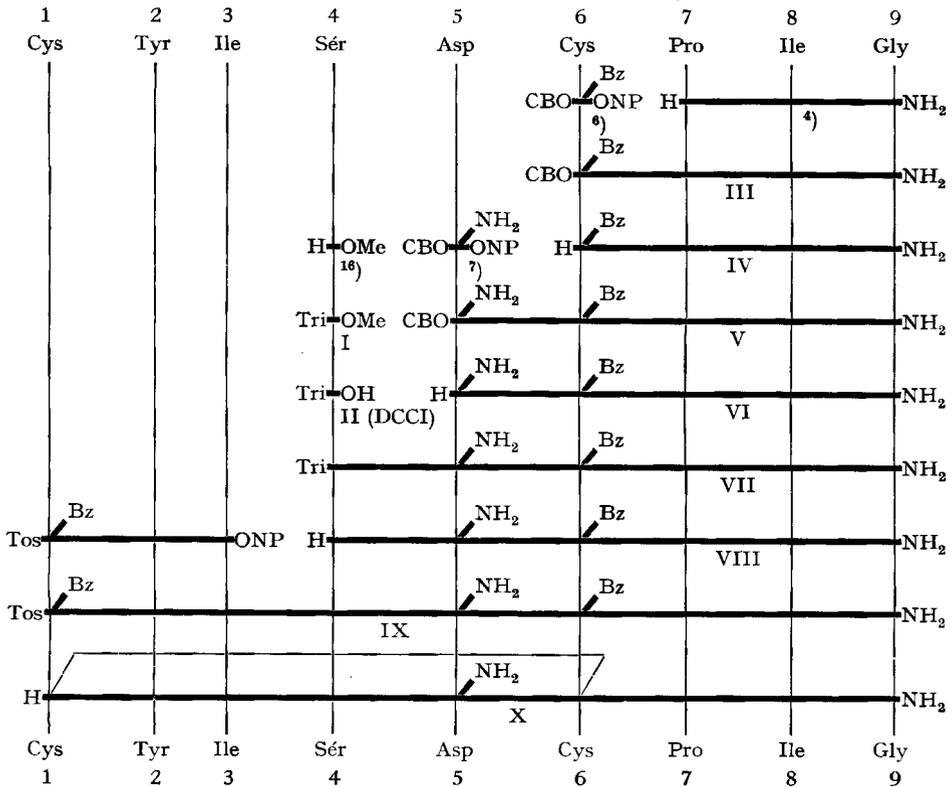
Un nouveau peptide possédant des propriétés proches de celles de l'oxytocine a été isolé à partir de l'hypophyse de trois poissons osseux (*Polliachus virens*, *Gadus luscus* et *Merluccius merluccius*) par ACHER et coll.^{1) 2)}. Se basant sur sa composition en acides aminés et sur les résultats de sa dégradation par la leucinaminopeptidase, ces auteurs considèrent que ce nouveau peptide est probablement un nouvel analogue de l'oxytocine, la Sér⁴-Ile⁸-oxytocine:



¹⁾ R. ACHER, J. CHAUVET, M. T. CHAUVET & D. CREPY, Biochem. biophys. Acta 51, 419 (1961).

²⁾ R. ACHER, J. CHAUVET, M. T. CHAUVET & D. CREPY, Biochem. biophys. Acta 58, 624 (1962).

Dans une brève communication préliminaire³⁾, nous avons rapporté la synthèse de la Sér⁴-Ile⁸-oxytocine, ainsi que les résultats d'un premier examen de ses propriétés biologiques; dans le présent travail, nous décrivons en détail cette synthèse effectuée selon le schéma du tableau 1: l'hexapeptide 4-9 (VIII) construit à partir du tripeptide 7-9⁴⁾ par la méthode récurrente est condensé avec le tripeptide 1-3⁵⁾ en nonapeptide protégé 1-9 (IX).

Tableau 1. Schéma de synthèse de la Sér⁴-Ile⁸-oxytocine

Abréviations: CBO = carbobenzoxy-; Bz = benzyl-; Tos = tosyl = *p*-toluènesulfonyl-; Tri = trityl = triphénylméthyl-; NP = *p*-nitrophényle; DCCI = dicyclohexyl-carbodiimide

Ces opérations ont été effectuées par la méthode de l'ester activé *p*-nitrophénylique^{6) 7)}, sauf dans le cas de la sérine, qui a été introduite à l'aide du dicyclohexyl-carbodiimide⁸⁾. Après la scission des groupes protecteurs par le sodium dans l'ammoniac liquide et oxydation par un courant d'air⁹⁾, le nonapeptide cyclique obtenu a

³⁾ ST. GUTTMANN, B. BERDE & E. STÜRMER, *Experientia* 18, 445 (1962).

⁴⁾ P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 44, 113 (1961).

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

⁶⁾ M. BODÁNSZKY, M. SZELKE, E. TÖKÖRMÉNY & E. WEISZ, *Chemistry and Ind.* 1955, 1517.

⁷⁾ M. BODÁNSZKY & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* 81, 5688 (1959).

⁸⁾ J. C. SHEEHAN & J. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 1067 (1955).

⁹⁾ V. DU VIGNEAUD, CH. RESSLER, J. M. SWAN, C. W. ROBERTS & P. G. KATSOYANNIS, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 3115 (1954).

Tableau 2. *Activités biologiques* (en unités internationales par mg)

Formule chimique et désignation	Activités oxytociques			Activités vasopressiques	
	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-Sér-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Ile-Gly-NH ₂ Sér ⁴ -Ile ⁸ -oxytocine	150 (± 12)	320 (± 15)	300 (± 15)	0,06 (± 0,01)	0,18 (± 0,03)
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Oxytocine	450 (± 30)	450 (± 30)	450 (± 30)	5 (± 1)	5 (± 1)
H-CyS-Tyr-Ile-Asp(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Asp(NH ₂) ⁴ -oxytocine	120 (± 29)	202 (± 12)	300 (± 128)	0,13 (± 0,03)	0,044 (± 0,005)
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Ile-Gly-NH ₂ Ile ⁸ -oxytocine	289 (± 21)	489 (± 37)	328 (± 21)	6 (± 1)	1,1 (± 0,1)

été purifié par contre-courant. Sa pureté finale a été vérifiée par chromatographie et électrophorèse sur papier dans une série de systèmes. L'hydrolysate acide total contient les acides aminés dans les rapports attendus.

Les activités biologiques¹⁰⁾ sont indiquées dans le tableau 2. Comparé à l'oxytocine, ce nouvel analogue possède des activités oxytociques qui ne sont que légèrement plus faibles, alors que ses activités pressoriques sont très fortement diminuées. La Sér⁴-Ile⁸-oxytocine est donc un oxytocique encore plus sélectif que l'oxytocine.

HELLER et coll.¹¹⁾ ont trouvé que le « Second Peptide Oxytocique » du lieu noir possède une activité dépressorie sur le Poulet 2,3 fois plus grande que son activité utérotonique sur le Rat. Ce rapport est pratiquement le même ($320/150 = 2,1$) dans le cas de notre nouveau peptide. Il est donc probable que la Sér⁴-Ile⁸-oxytocine est non seulement identique au peptide d'ACHER²⁾, mais également à celui décrit par HELLER¹¹⁾.

Comme nous savions que l'Ile⁸-oxytocine⁴⁾ possède pratiquement les mêmes propriétés biologiques que l'oxytocine, on pouvait s'attendre à ce que la présence de l'isoleucine en position 8 de la Sér⁴-Ile⁸-oxytocine n'eût pas une grosse influence sur les activités biologiques. Par contre, nous avons constaté jusqu'ici que l'introduction de sérine en position 2 ou 3 des hormones hypophysaires supprimait complètement les activités biologiques¹²⁾. Il est donc remarquable qu'ici la présence de sérine en position 4 n'ait pas le même effet.

L'Asp(NH₂)⁴-oxytocine que nous avons préparée précédemment¹³⁾ possède des activités biologiques se rapprochant de celles de la Sér⁴-Ile⁸-oxytocine. Il semble donc se confirmer à première vue que le raccourcissement de la chaîne latérale en position 4 n'a qu'une influence restreinte sur les propriétés biologiques de l'oxytocine¹³⁾.

Partie expérimentale¹⁴⁾. – *N-Trityl-L-sérinate de méthyle (I)*. On dissout 15,5 g (100 mmoles) de L-sérinate de méthyle¹⁵⁾ dans 150 ml de chloroforme, ajoute 31 ml (220 mmoles) de triéthylamine et 26,7 g (110 mmoles) de triphénylchlorométhane, maintient 3 h à 0°, lave la solution par l'eau, sèche sur Na₂SO₄ et évapore à sec. Par recristallisation du résidu dans le mélange benzène-éther de pétrole (1:1) on obtient 28,0 g (77%) de N-trityl-L-sérinate de méthyle de F. 148°. $Rf_M^t = 0,5$; $Rf_A^t = 0,6$; $Rf_B^t = 0,2$; $E_{5,8}^t = 1,3$ His; $E_{1,9}^t = 0,8$ His. $[\alpha]_D^{21} = +24^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $+29^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol).

$C_{23}H_{23}O_3N$	Calc.	C 76,4	H 6,4	O 13,3	N 3,9%
(361,4)	Tr.	,, 76,2	,, 6,4	,, 13,0	,, 3,7%

N-Trityl-L-sérine (II). On chauffe 2 min. à reflux 75 ml d'une solution méthanolique de KOH 3,5N contenant 36,1 g (100 mmoles) d'ester I, refroidit à 0°, ajoute 350 ml de H₃PO₄ 1N, filtre, redissout le précipité dans l'acétate d'éthyle, lave avec H₃PO₄ 1N, sèche et évapore à sec. En recristallisant le résidu dans un mélange de benzène et d'éther de pétrole (1:1) on obtient 30,9 g

¹⁰⁾ Les activités biologiques ont été déterminées par les Drs B. BERDE et E. STÜRMER de notre Département de recherches médico-biologiques (Dir.: D^r A. CERLETTI).

¹¹⁾ H. HELLER, B. T. PICKERING, J. MAETZ & F. MOREL, *Nature* 191, 670 (1961).

¹²⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, B. BERDE & H. KONZETT, *Experientia* 17, 377 (1961).

¹³⁾ P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 45, 1601 (1962).

¹⁴⁾ Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (D^r W. SCHÖNI-GER). – Pour les méthodes et les abréviations utilisées, cf. ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 45, 2517 (1962).

¹⁵⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 41, 1852 (1958).

(89%) de N-trityl-L-sérine de F. 160°. $[\alpha]_D^{21} = -2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $+9^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol).

Après scission du groupe trityle, les Rf et E sont ceux de la sérine.

$C_{22}H_{21}O_3N$	Calc. C 76,1	H 6,1	O 13,8	N 4,0%
(347,4)	Tr. ,, 75,8	,, 6,3	,, 13,6	,, 4,0%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (III). On dissout 4,20 g (9,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de *p*-nitrophényle⁶) et 2,38 g (8,4 mmoles) de L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide⁴) dans 6 ml de diméthylformamide, laisse reposer 24 h à 20°, puis ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle, lave par HCl 1N, sèche et évapore à sec. Après trituration sous éther, on recristallise le résidu dans 50 ml de méthanol/eau (3:5). On obtient ainsi 4,70 g (92%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide de F. 167°. $Rf_M^a = 0,7$; $Rf_A^a = 0,7$; $Rf_P^a = 0,8$; $E_{1,9}^a = 0,9$ Try; $E_{5,8}^a = 0,8$ His. $[\alpha]_D^{21} = -53^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-81^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique à 95%).

$C_{31}H_{41}O_8N_5S$	Calc. C 60,9	H 6,7	O 15,7	N 11,4	S 5,2%
(611,7)	Tr. ,, 60,7	,, 6,9	,, 16,0	,, 12,1	,, 5,3%

S-Benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-L-glycinamide (IV). On dissout 3,50 g (5,7 mmoles) d'amide térapeptidique III dans 20 ml d'HBr 3,5N dans l'acide acétique, laisse 1 h à 20°, évapore à sec, triture sous éther et filtre. On redissout le résidu dans 100 ml de méthanol et traite par 20 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle OH⁻). L'évaporation à sec fournit 2,60 g de S-Bz-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide analytiquement pur, qu'on utilise aussitôt pour la suite de la synthèse. $Rf_M^0 = 0,7$; $Rf_A^0 = 0,7$; $Rf_P^0 = 0,8$; $E_{1,9}^a = 0,9$ Try; $E_{5,8}^a = 0,8$ His.

N-CBO-L-Asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (V). On dissout 2,62 g (5,5 mmoles) d'amide térapeptidique IV et 2,60 g (6,6 mmoles) de N-CBO-L-asparaginate de *p*-nitrophényle⁷) dans 10 ml de diméthylformamide, ajoute 60 ml d'acétate d'éthyle et maintient 48 h à 20°. Les cristaux formés sont filtrés, lavés successivement à l'acétate d'éthyle, au méthanol et à l'éther, puis séchés: 2,73 g (73%) de N-CBO-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide de F. 212°. $Rf_M^a = 0,5$; $Rf_A^a = 0,6$; $Rf_P^a = 0,4$; $E_{1,9}^a = 0,5$ Try; $E_{5,8}^a = 0,5$ His. $[\alpha]_D^{21} = -51^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-75^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%).

$C_{35}H_{47}O_8N_7S$	Calc. C 57,9	H 6,5	O 17,6	N 13,5	S 4,4%
(725,8)	Tr. ,, 57,8	,, 6,5	,, 18,0	,, 13,4	,, 4,4%

L-Asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VI). On dissout 2,60 g d'amide pentapeptidique V dans 20 ml d'HBr 3,5N dans l'acide acétique, laisse 1 h à 20°, évapore à sec, triture sous éther, filtre, redissout le résidu dans 100 ml de méthanol, élimine les ions Br⁻ par traitement avec de l'Amberlite IRA-410 (cycle OH⁻) et évapore à sec. Le résidu de 2,12 g de L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide, pur, est utilisé immédiatement pour la suite de la synthèse. $Rf_M^0 = 0,5$; $Rf_A^0 = 0,6$; $Rf_P^0 = 0,4$; $E_{1,9}^0 = 0,5$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,5$ His.

N-Trityl-L-séryl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VII). On dissout 1,39 g (4,0 mmoles) de N-trityl-L-sérine (II) et 2,12 g (3,9 mmoles) d'amide pentapeptidique VI dans 5 ml de diméthylformamide, ajoute 10 ml d'acétonitrile, refroidit à -10° , ajoute 0,82 g de dicyclohexyl-carbodiimide et maintient 4 h à 10° . On filtre, ajoute au filtrat 50 ml d'acétate d'éthyle et maintient 12 h à 0° . Les cristaux formés sont filtrés, lavés à l'acétate d'éthyle bouillant et séchés: 2,21 g (76%) de N-trityl-L-séryl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide de F. 160° déc. $Rf_M^a = 0,8$; $Rf_A^a = 0,5$; $Rf_P^a = 0,3$; $E_{1,9}^a = 0,8$ Try; $E_{5,8}^a = 0,6$ His. $[\alpha]_D^{21} = -41^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$; diméthylformamide); $-65^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$; acide acétique 95%).

$C_{49}H_{60}O_8N_8S$	Calc. C 63,8	H 6,6	O 14,0	N 12,1	S 3,5%
	Tr. ,, 64,0	,, 6,8	,, 14,1	,, 11,9	,, 3,5%

L-Séryl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (VIII). On dissout 2,03 g (2,5 mmoles) d'amide hexapeptidique VII dans 10 ml d'acide trifluoroacétique contenant 0,2 ml d'eau, y fait passer à 0° un courant d'HBr gazeux pendant 1 h, évapore à sec, triture sous éther, filtre, dissout le résidu dans du méthanol, élimine les ions Br⁻ par de l'Amberlite IRA-410 (cycle OH⁻) et concentre la solution jusqu'à l'apparition de cristaux, ajoute de l'éther, filtre et sèche. On obtient ainsi 1,47 g (86%) de L-séryl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-iso-

leucyl-glycinamide de F. 150° (déc.). $Rf_M^0 = 0,8$; $Rf_A^0 = 0,5$; $Rf_P^0 = 0,3$; $E_{1,9}^0 = 0,8$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,6$ His.

$C_{30}H_{46}O_8N_8S$	Calc. C 53,1	H 6,8	O 18,9	N 16,5	S 4,7%
(678,8)	Tr. „ 52,9	„ 6,8	„ 18,9	„ 16,1	„ 4,8%

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-séryl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-isoleucyl-glycinamide (IX). On suspend 1,67 g (2,2 mmoles) de *N*-tosyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucinate de *p*-nitrophényle⁶) et 1,37 g (2,0 mmoles) d'amide hexapeptidique VIII dans 6 ml de diméthylformamide, agite 4 jours à 20°, ajoute de l'acétate d'éthyle, filtre, lave le précipité au méthanol bouillant, filtre et sèche. On obtient ainsi 1,28 g de *N*-tosyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-tyrosyl-*L*-séryl-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-prolyl-*L*-isoleucyl-glycinamide de F. 222°. Du méthanol de lavage, on obtient encore 0,26 g de nonapeptide de même pureté que la première fraction, soit au total 1,54 g (59%). $E_9^0 = 0$; $E_{5,8}^0 = 0$. $[\alpha]_D^{21} = -68^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-24^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide).

$C_{62}H_{83}O_{14}N_{11}S_3$	Calc. C 57,2	H 6,5	O 17,2	N 11,8	S 7,4%
(1302,6)	Tr. „ 56,9	„ 6,8	„ 17,3	„ 11,6	„ 7,3%

Ser⁴-Ile⁸-Oxytocine (= Isotocine) (X). On dissout 1,00 g (0,7 mmole) d'amide nonapeptidique IX dans 600 ml d'ammoniac redistillé sur sodium puis on y ajoute du sodium jusqu'à couleur bleue persistante, décolore à l'aide de NH_4Cl , évapore à sec, dissout le résidu dans 700 ml d'acide acétique 0,01 N, amène le pH de la solution à 8,8 et y fait barboter de l'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. Après évaporation à sec et purification par distribution en contre-courant dans le système *sec*-butanol/eau/acide acétique (100:120:1) et détermination colorimétrique de la courbe de répartition¹⁶), on obtient deux sommets. Les tubes centraux du sommet principal ($K = 0,57$) contiennent 48% de l'azote peptidique introduit dans l'appareil. Le produit ainsi obtenu est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse, après révélation par chlore, ninhydrine et bleu de bromophénol. $Rf_M^0 = 0,6$; $Rf_A^0 = 0,7$; $Rf_P^0 = 0,5$; $E_{1,9}^0 = 0,6$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,4$ His. L'hydrolyse acide totale (HCl 6N, 12 h à 110°) donne les acides aminés composants dans les rapports attendus.

Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau 2.

SUMMARY

Ser⁴-Ile⁸-oxytocin has been synthesized by condensing the tripeptide (1-3) with the recurrently prepared hexapeptide (4-9), the *p*-nitrophenylester method being extensively used in the condensation steps.

In comparison with oxytocin, this novel analog exhibits only slightly lower oxytocic activities, whereas its pressoric and antidiuretic properties are much more markedly decreased. The identity of Ser⁴-Ile⁸-oxytocin with a neurohypophysal hormone recently isolated from different species of teleost fish is postulated.

Laboratoires de chimie pharmaceutique
SANDOZ S.A., Bâle

¹⁶) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* 193, 265 (1951).