

177. Synthèse de la Sér⁴-oxytocine, de l'Ala⁴-oxytocine, de la Sér⁵-oxytocine et de l'Ala⁵-oxytocine

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

(24 V 63)

Nous avons préparé récemment l'Asp(NH₂)⁴-oxytocine¹⁾, un analogue de l'oxytocine dans lequel la glutamine en position 4 est remplacée par l'asparagine. Ce peptide synthétique possède des propriétés biologiques voisines de celles de l'oxytocine et presque semblables à celles de l'isotocine (Sér⁴-Ile⁸-oxytocine), hormone naturelle présente dans l'hypophyse de certains poissons et dont la structure²⁾ a été confirmée dernièrement par synthèse^{3) 4) 5)}.

Afin de compléter nos connaissances sur l'influence de modifications en position 4 de l'oxytocine, comme nous l'avions fait précédemment en ce qui concerne d'autres positions⁶⁾, nous avons préparé maintenant la Sér⁴-oxytocine, qui possède une structure intermédiaire entre celles de l'oxytocine et de l'isotocine, ainsi que l'Ala⁴-oxytocine, qui ne diffère de la Sér⁴-oxytocine que par l'absence du groupe hydroxyle alcoolique, ou de l'Asp(NH₂)⁴-oxytocine que par la suppression du groupe carboxamide.

D'autre part, comme il n'existe encore que peu de données sur l'influence de modifications en position 5 de l'oxytocine, nous avons également préparé la Sér⁵-oxytocine et l'Ala⁵-oxytocine.

Les méthodes de synthèse que nous avons utilisées sont indiquées dans les schémas 1 à 4. Dans chaque cas, nous avons condensé le N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle⁷⁾ avec un des quatre hexapeptides correspondants, préparés eux-mêmes par la méthode récurrente⁸⁾. Dans les stades finals de la préparation de trois de ces hexapeptides, nous avons utilisé la nouvelle méthode de condensation à l'ester activé 2,4,5-trichlorophénylique⁹⁾.

Après purification par contre-courant, les produits finals se sont montrés homogènes à la chromatographie sur papier et à l'électrophorèse à haut voltage sur papier. La détermination de leur composition élémentaire et celle de leur contenu en acides aminés après hydrolyse ont donné les valeurs attendues. Leurs activités biologiques 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.

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

2) R. ACHER, J. CHAUVET, M. T. CHAUVET & D. CREPY, *Biochim. biophysica Acta* **58**, 624 (1962).

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

4) ST. GUTTMANN, *Helv.* **45**, 2622 (1962).

5) A. JÖHL, A. HARTMANN & H. RINK, *Biochim. biophysica Acta* **69**, 193 (1963).

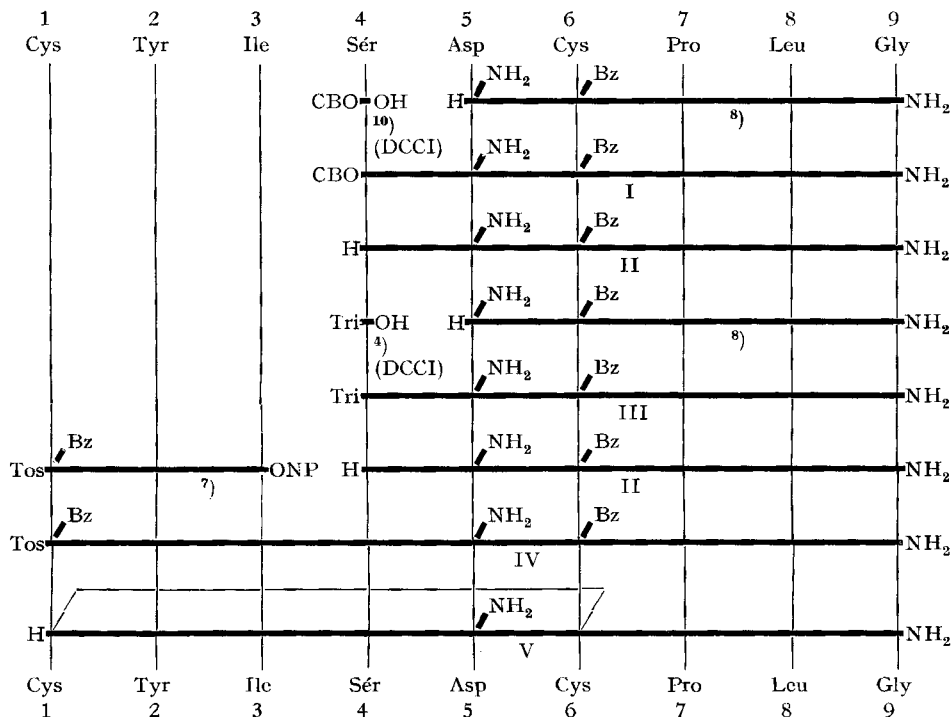
6) R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, B. BERDE & H. KONZETT, *Experientia* **17**, 377 (1961).

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

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

9) J. PLESS & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **46**, 1609 (1963).

Schéma 1. Synthèse de la Sér⁴-oxytocine



Abréviations: CBO- = carbobenzoxy-; Tos- = tosyl- = *p*-toluènesulfonyl-; Bz- = benzyl-; Tri- = trityl- = triphénylméthyl-; -ONP = *p*-nitrophényloxy-; -OCP = 2,4,5 trichlorophényloxy-; DCCI = dicyclohexyl-carbodiimide

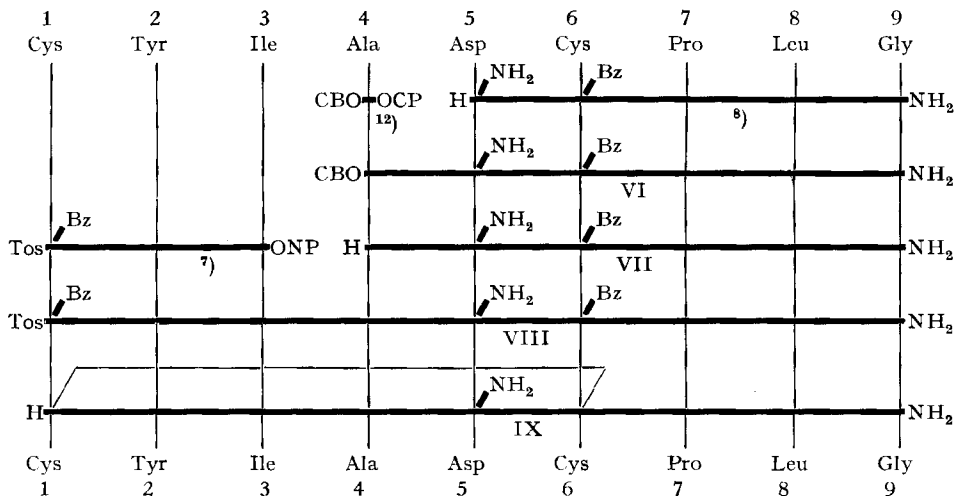
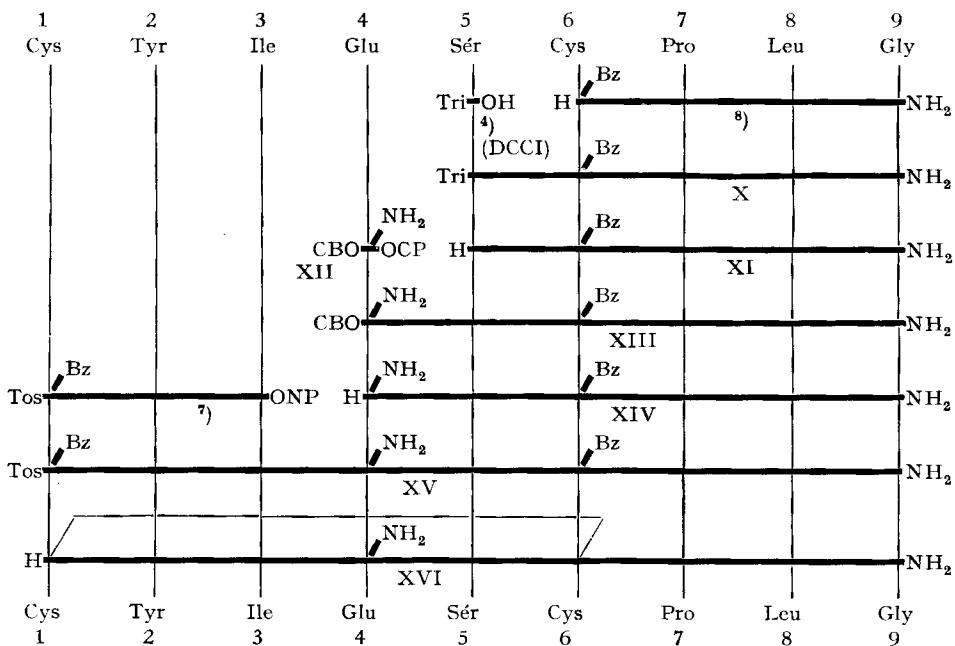
Il ressort de ces valeurs que le remplacement de la glutamine en position 4 de l'oxytocine par la sérine n'affecte que modérément les propriétés oxytociques, alors qu'il diminue considérablement les activités vasopressives et antidiurétiques. Il en résulte que la Sér⁴-oxytocine est un oxytocique encore plus sélectif que l'oxytocine et se rapproche beaucoup, par ses propriétés biologiques, de l'isotocine et de l'Asp(NH₂)⁴-oxytocine.

Le remplacement de la glutamine en cette même position 4 par l'alanine a un effet similaire, mais dans ce cas les activités oxytociques, à l'exception de l'action sur la glande mammaire, sont aussi nettement diminuées¹¹⁾.

Nous savions que le remplacement de l'asparagine par son homologue supérieur, la glutamine, en position 5 de l'oxytocine, provoquait un abaissement considérable

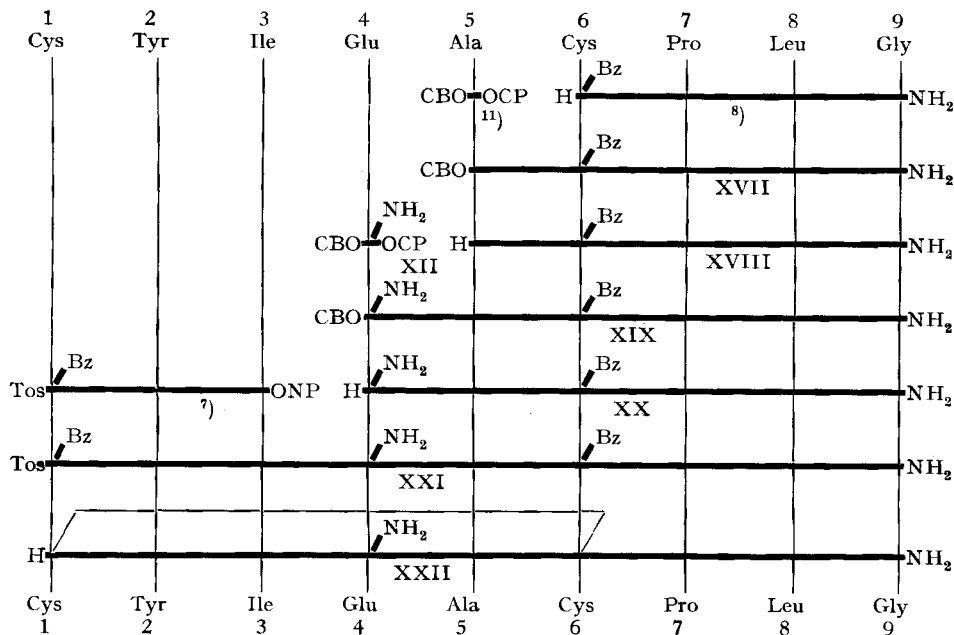
¹⁰⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 41, 1852 (1958).

¹¹⁾ Dans une communication préliminaire qui vient de paraître (*J. biol. Chemistry*, 238, PC 1560 (1963)), V. DU VIGNEAUD, G. S. DENNING & S. DRABARCH rapportent la synthèse de la But⁴-oxytocine, dont les activités biologiques sont, comme sa structure le laisse attendre, intermédiaires entre celles de l'Ala⁴-oxytocine et de l'Asp(NH₂)⁴-oxytocine. Ces auteurs décrivent également une synthèse de l'Ala⁵-oxytocine, et indiquent pour les activités biologiques de celle-ci des valeurs concordant très bien avec celles trouvées pour notre propre produit.

Schéma 2. Synthèse de l'Ala⁴-oxytocineSchéma 3. Synthèse de la Sér⁶-oxytocine

de toutes les activités biologiques¹⁾. Afin de déterminer si cette désactivation provenait d'un empêchement stérique lors de la fixation sur le récepteur, il était intéressant de remplacer ce reste asparagine par d'autres restes moins volumineux que lui, tels que les restes sérine et alanine. Nous voyons, par les valeurs indiquées

¹²⁾ ED. SANDRIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 46, 1637 (1963).

Schéma 4. Synthèse de l'Ala⁵-oxytocine

dans le tableau, que la Sér⁵-oxytocine et l'Ala⁵-oxytocine sont aussi peu actives que la Glu(NH₂)⁵-oxytocine. Il en résulte que le facteur stérique n'est pas seul en cause et que la position 5 ne peut probablement pas être modifiée sans provoquer une inactivation de la molécule. Il est donc tentant de supposer que le groupe carboxamide du reste asparagine constitue un point de fixation important de l'oxytocine sur le récepteur¹¹⁾.

Nous avons d'autre part montré⁷⁾ que l'omission de n'importe lequel des trois acides aminés de la chaîne latérale diminuait les activités biologiques dans une même mesure que leur suppression simultanée. Ce fait permet de supposer que le groupe carboxamide en position terminale de la chaîne peptidique latérale constitue un second point de fixation sur le récepteur, expliquant ainsi l'importance primordiale de la longueur de cette chaîne.

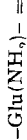
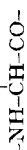
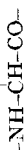
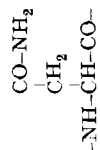
L'examen d'un modèle tridimensionnel de l'oxytocine montre que la fixation dans l'espace des deux groupes carboxamide en positions 5 et 9 a une grande influence sur la configuration de la molécule, car la présence de l'embranchement portant le pont disulfure en position 6 et celle du reste proline en position 7 ont un effet stérique qui diminue considérablement le degré de liberté du squelette peptidique. Il est probable qu'un troisième point de fixation se trouve au niveau du noyau aromatique du reste tyrosine en position 2, car le remplacement de celui-ci par un reste aliphatique de moindre encombrement (Sér²-oxytocine¹³⁾, Leu²-oxytocine¹⁴⁾) ou par un reste aromatique d'encombrement supérieur ((O-Me)Tyr²-

¹³⁾ ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 43, 200 (1960).

¹⁴⁾ K. JOST, J. RUDINGER & F. ŠORM, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* 26, 1708 (1961); J. RUDINGER, *Acta biologica germanica, Supplementband II*, p. 38.

Tableau des activités biologiques

Formule chimique et désignation	Activités oxytociques en unités internationales par mg				Activités vasopressiques en unités internationales par mg	
	Contraction de l'utérus du Rat	Baisse de la pression sanguine du Coq	Augmentation de la pression interne de la glande mammaire du Lapin	Augmentation de la pression 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	450 (± 30)	450 (± 30)	450 (± 30)	5 (± 1)	5 (± 1)	
H-CyS-Tyr-Ile-Sér-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Sér ⁴ -oxytocine (V)	195 (± 30)	230 (± 20)	255 (± 45)	< 0,1	0,06 (± 0,01)	
H-CyS-Tyr-Ile-Ala-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Ala ⁴ -oxytocine (IX)	36 (± 6)	65 (± 3)	240 (± 55)	< 0,01	< 0,01	
H-CyS-Tyr-Ile-Asp(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Asp(NH ₂) ⁴ -oxytocine ¹⁾	110 (± 30)	200 (± 15)	300 (± 130)	0,13 (± 0,03)	0,044 (± 0,005)	
H-CyS-Tyr-Ile-Sér-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Ile-Gly-NH ₂ Isotocine (= Sér ⁴ -Ile ⁶ -oxytocine) ⁴⁾	150 (± 12)	320 (± 15)	300 (± 15)	0,06 (± 0,01)	0,18 (± 0,03)	
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Sér-CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Sér ⁵ -oxytocine (XVI)	0,7 (± 0,2)	0,20 (± 0,01)	4,1 (± 0,8)	< 0,1	< 0,01	
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Ala-CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Ala ⁵ -oxytocine (XXII)	< 0,05	< 0,1	< 0,05	< 0,01	< 0,01	
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Glu(NH ₂)-CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂ Glu(NH ₂) ⁵ -oxytocine ¹⁾	1,0 (± 0,2)	0,80 (± 0,03)	7,3 (± 1,1)	< 0,01	—	



oxytocine¹⁴⁾ ¹⁵⁾) abaisse considérablement les activités biologiques, alors que la simple suppression de l'hydroxyle phénolique ne les diminue que plus faiblement¹⁶⁾.

La fixation de la molécule d'oxytocine par ces trois points laisse un très grand degré de liberté aux groupes latéraux caractéristiques en position 3, 4 et 8, dont la modification n'a que peu d'influence sur les propriétés biologiques⁸⁾. Par contre, elle maintient le pont disulfure dans une position bien déterminée, qui est peut-être primordiale pour le mécanisme d'action de cette hormone.

Partie expérimentale¹⁷⁾

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 chromatographies sur papier ont été effectuées selon la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040 lavé». Rf_M dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/cau (65:15:20); Rf_A dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/cau (35:35:30); Rf_P dans le mélange *n*-butanol/acide acétique/cau (70:10:20); Rf° sans scission préalable; Rf^a après scission du groupe CBO- par séjour de 40 min à 20° dans une solution de HBr 4N dans l'acide acétique glacial.

Les électrophorèses sur papier ont été effectuées dans l'appareil à électrophorèse sous haute tension de WIELAND & PFLEIDERER¹⁸⁾: au pH 1,9 ($E_{1,9}$) dans le mélange acide formique/acide acétique/cau (10:10:75); au pH 5,8 ($E_{5,8}$) dans le mélange pyridine/acide acétique/cau (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 ^o et ^a ont la même signification que pour les chromatogrammes. Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et phérogrammes ont été décrits précédemment¹³⁾.

Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées selon la méthode ascendante sur silicagel (plaques de 10×10 cm), dans trois systèmes de solvants: chloroforme/méthanol (7:3) et (9:1), ainsi que méthanol pur. La révélation est effectuée par des vapeurs d'iode.

N-CBO-L-Séryl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (I). On dissout 3,50 g (5,8 mmoles) de L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide⁸⁾ et 1,55 g (6,5 mmoles) de N-CBO-L-sérine¹⁰⁾ dans 20 ml d'acétonitrile et 10 ml de *t*-butanol, refroidit à 0° , ajoute 1,43 g (6,5 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et maintient 3 j à 0° . On filtre, lave le résidu par 20 ml de pyridine et évapore les filtrats réunis à sec. On lave le résidu par HCl 1N jusqu'à pulvérisation complète, puis filtre, lave à l'eau et sèche. Après recristallisation dans un mélange acétate d'éthyle – éther, on obtient 2,90 gr (61%) de N-CBO-L-séryl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 179° . Homogène sur couche mince. $[\alpha]_D^{25} = -59,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-64,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-39,4^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,8$; $Rf_A^a = 0,8$; $Rf_P^a = 0,3$; $E_{1,9}^a = 0,8$ Try; $E_{5,8}^a = 0,0$ (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{38}H_{52}O_{10}N_8S$	Calc. C 56,1	H 6,4	O 19,7	N 13,8	S 3,9%
(812,9)	Tr. „ 55,9	„ 7,1	„ 19,1	„ 13,3	„ 3,9%

L-Séryl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (II). On dissout 4,07 g (5,0 mmoles) de l'hexapeptide I dans 40 ml d'acide trifluoroacétique contenant 0,4 ml d'eau, fait passer un courant de HBr à 0° pendant 1 h, précipite dans l'éther, filtre, redissout le précipité dans le méthanol, traite par IRA-410 (cycle OH⁻), concentre sous vide et précipite par l'éther. Après lavage et séchage, on obtient 2,71 g (80%) de L-séryl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 152° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -68,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%).

¹⁵⁾ H. D. LAW & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 82, 4579 (1960).

¹⁶⁾ P.-A. JAQUENOU & R. A. BOISSONNAS, Helv. 42, 788 (1959); M. BODANSKY & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 81, 1258, 6072 (1959).

¹⁷⁾ Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr. W. SCHOENIGER).

¹⁸⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, Angew. Chem. 67, 257 (1955).

$Rf_M^o = 0,8$; $Rf_A^o = 0,8$; $Rf_P^o = 0,3$; $E_{1,9}^o = 0,8$ Try; $E_{5,8}^o = 0,6$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{30}H_{46}O_8N_8S$ (678,8)	Calc.	C 53,1	H 6,7	O 18,9	N 16,5	S 4,7%
	Tr.	„ 53,3	„ 6,9	„ 19,3	„ 16,4	„ 4,8%

On obtient le même produit dans les mêmes conditions à partir de l'hexapeptide III.

N-Trityl-*L*-séryl-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyll-*L*-prolyll-*L*-leucyl-glycinamide (III). On dissout 2,78 g (8,0 mmoles) de *N*-trityl-*L*-sérine⁴) et 4,24 g (7,8 mmoles) de *L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyll-*L*-prolyll-*L*-leucyl-glycinamide⁸) dans 10 ml de diméthylformamide, ajoute 20 ml d'acétonitrile, refroidit à -10° , ajoute 1,65 g (8,0 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et maintient 16 h à 10° . On filtre, concentre à 10 ml, ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle et garde 16 h à 0° . Les cristaux formés sont filtrés, lavés à l'acétate d'éthyle à ébullition et séchés. On obtient ainsi 5,50 g (76%) de *N*-trityl-*L*-séryl-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyll-*L*-prolyll-*L*-leucyl-glycinamide de F. 175° (déc.). Homogène sur couche mince. $[\alpha]_D^{25} = -47,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,8$; $Rf_A^a = 0,5$; $Rf_P^a = 0,3$; $E_{1,9}^a = 0,8$ Try; $E_{5,8}^a = 0,0$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{49}H_{60}O_8N_8S$ (921,14)	Calc.	C 63,8	H 6,6	O 14,0	N 12,1	S 3,5%
	Tr.	„ 64,1	„ 7,0	„ 14,0	„ 11,8	„ 3,7%

N-Tosyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyll-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucyl-*L*-séryll-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyll-*L*-prolyll-*L*-leucyl-glycinamide (IV). On dissout 1,35 g (2,0 mmoles) d'hexapeptide III et 1,56 g (2,05 mmoles) de *N*-tosyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyll-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucinate de *p*-nitrophényle⁷) dans 3 ml de diméthylformamide, maintient 12 h à 20° , précipite par l'acétate d'éthyle, filtre, lave le précipité dans le méthanol chaud, filtre et sèche. On obtient 1,24 g (47%) de *N*-tosyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyll-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucyl-*L*-séryll-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyll-*L*-prolyll-*L*-leucyl-glycinamide de F. 212° . Homogène sur couche mince. $[\alpha]_D^{25} = -32,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-70,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%).

$C_{62}H_{83}O_{14}N_{11}S_3$ (1302,6)	Calc.	C 57,2	H 6,5	O 17,2	N 11,8	S 7,4%
	Tr.	„ 56,9	„ 6,7	„ 17,6	„ 11,7	„ 7,1%

*Sér*⁴-oxytocine (V). On dissout 1,00 g (0,7 mmole) de nonapeptide IV dans 750 ml d'ammoniac redistillé sur sodium, puis on y ajoute sous forte agitation du sodium jusqu'à couleur bleue persistante, décolore par adjonction de NH_4Cl , évapore à sec, redissout le résidu dans 750 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,8 et y fait barboter de l'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. On ramène le pH à 4,0, évapore à sec et purifie le résidu par répartition en contre-courant dans le système *s*-butanol/eau/acide acétique (1000:1200:1). Après 475 transferts, on détermine sur des aliquotes¹⁹) la position du sommet principal ($K = 0,50$), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore au vide le *s*-butanol et lyophilise la solution aqueuse. Le résidu contient 68,2 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 426 mg (63%) de *Sér*⁴-oxytocine. Celle-ci est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse sur papier après révélation par ninhydrine, chlore, bleu de bromophénol et FOLIN. $Rf_M^o = 0,6$; $Rf_A^o = 0,7$; $Rf_P^o = 0,6$; $E_{1,9}^o = 0,7$ Try; $E_{5,8}^o = 0,3$ His. L'hydrolyse acide totale (HCl 6N, 16 h, 110°) donne les acides aminés composants dans les rapports attendus. Pour l'analyse un échantillon est séché 2 h à 100° .

$C_{41}H_{63}O_{12}N_{11}S_2 + 1\frac{1}{2} H_2O$ (993,2)	Calc.	C 49,6	H 6,7	O 21,8	N 15,5	S 6,4%
	Tr.	„ 49,4	„ 6,9	„ 22,0	„ 15,3	„ 6,3%

Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau.

N-CBO-*L*-Alanyl-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyll-*L*-prolyll-*L*-leucyl-glycinamide (VI). On dissout 3,65 g (9,0 mmoles) de CBO-*L*-alaninate de trichloro-2,4,5-phényle¹²) et 5,32 g (9,0 mmoles) de *L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyll-*L*-prolyll-*L*-leucyl-glycinamide⁸) dans 20 ml de diméthylformamide et maintient 2 j à 20° . L'hexapeptide formé cristallise. On filtre, lave à l'acétate d'éthyle, au méthanol et à l'éther. Après séchage, on obtient 5,80 g (78%) de *N*-CBO-*L*-alanyl-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyll-*L*-prolyll-*L*-leucyl-glycinamide de F. 245° (ramollissement à 238°). Homogène

¹⁹) H. O. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).

sur couche mince. $[\alpha]_D^{25} = -92,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,8$; $Rf_A^a = 0,6$; $Rf_P^a = 0,6$; $E_{1,9}^a = 0,8$ Try; $E_{5,8}^a = 0,6$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{38}H_{52}O_9N_8S$	Calc.	C 57,2	H 6,6	O 18,1	N 14,0	S 4,0%
(796,9)	Tr.	„ 57,1	„ 6,7	„ 17,9	„ 14,0	„ 4,1%

L-Alanyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-L-glycinamide (VII). On dissout 5,60 g (7,0 mmoles) d'hexapeptide VI dans 60 ml d'une solution 4,5N HBr dans l'acide acétique et maintient 1 h à 20°. On concentre sous vide et précipite par adjonction d'éther. On filtre, redissout le précipité dans le méthanol, fait passer sur IRA 410 (cycle OH⁻), évapore à sec, lave le résidu par l'acétate d'éthyle, puis l'éther, et sèche. On obtient 4,25 g (92%) de *L-alanyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide*. $[\alpha]_D^{25} = -84,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-70,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-90,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol). $Rf_M^o = 0,5$; $Rf_A^o = 0,6$; $Rf_P^o = 0,6$; $E_{1,9}^o = 0,8$ Try; $E_{5,8}^o = 0,5$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{20}H_{46}O_7N_8S$	Calc.	C 54,4	H 7,0	O 16,9	N 16,9	S 4,8%
(662,8)	Tr.	„ 54,2	„ 7,3	„ 17,5	„ 17,5	„ 4,9%

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-alanyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (VIII). On dissout 3,98 g (6,0 mmoles) d'hexapeptide VII et 5,00 g (6,5 mmoles) de *N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de p-nitrophényle*⁷⁾ dans 20 ml de diméthylformamide, maintient 2 j à 20° puis ajoute 200 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave le précipité plusieurs fois par l'acétate d'éthyle puis le méthanol à ébullition, filtre et sèche. On obtient ainsi 4,90 g (63%) de *N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-alanyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide* de F. 239-242°. Homogène sur couche mince. $[\alpha]_D^{25} = -73,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-39,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide).

$C_{82}H_{83}O_{13}N_{11}S_3$	Calc.	C 57,9	H 6,5	O 16,2	N 12,0	S 7,5%
(1286,6)	Tr.	„ 57,7	„ 6,7	„ 16,1	„ 11,7	„ 7,8%

Ala⁴-oxytocine (IX). On dissout 3,0 g (2,34 mmoles) de nonapeptide VIII dans 2200 ml d'ammoniac anhydre. On traite au sodium, oxyde à l'air et purifie par contre-courant comme pour la Ser⁴-oxytocine (V) ci-dessus. Après 647 transferts, on détermine la position du sommet principal ($K = 0,41$) sur des aliquotes¹⁹⁾, réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore au vide le *s*-butanol et lyophilise la solution aqueuse. Le résidu contient 111,2 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 686 mg (36%) d'*Ala⁴-oxytocine*. Celle-ci est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse sur papier après révélation par ninhydrine, chlore, bleu de bromophénol et FOLIN. $Rf_M^o = 0,7$; $Rf_A^o = 0,7$; $Rf_P^o = 0,6$; $E_{1,9}^o = 0,7$ Try; $E_{5,8}^o = 0,5$ His. L'hydrolyse acide totale (HCl 6N, 16 h, 110°) donne les acides aminés composants dans les rapports attendus. Pour l'analyse, un échantillon est séché 2 h à 100°.

$C_{41}H_{83}O_{11}N_{11}S_2 + H_2O$	Calc.	C 50,9	H 6,8	O 19,8	N 15,9	S 6,6%
(968,2)	Tr.	„ 50,7	„ 6,9	„ 20,0	„ 16,2	„ 6,2%

Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau.

N-Trityl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (X). On dissout 5,20 g (15 mmoles) de *N-trityl-L-sérine*⁴⁾ et 7,20 g (15 mmoles) de *S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide*⁸⁾ dans 75 ml d'acétonitrile contenant 5 ml de diméthylformamide, refroidit à 0°, ajoute 3,20 g (15 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agit pendant 20 h à 20°. On filtre, évapore le filtrat à sec, triture le résidu dans l'éther de pétrole jusqu'à pulvérisation complète, filtre, redissout dans l'acétate d'éthyle, lave par H₂SO₄ 1N, NH₄OH 1N, H₂O, sèche, évapore à sec, redissout dans un minimum d'acétate d'éthyle et précipite à l'éther. Après deux précipitations répétées dans les mêmes conditions, on obtient 9,20 g (75%) de *N-trityl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide* de F. 118-136° (déc.). Homogène sur couche mince. $[\alpha]_D^{25} = -100^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,2$; méthanol); $-69,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,3$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,8$; $Rf_A^a = 0,8$; $Rf_P^a = 0,8$; $E_{1,9}^a = 0,8$ Try; $E_{5,8}^a = 0,7$ His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{45}H_{54}O_8N_6S$	Calc.	C 67,0	H 6,8	O 11,9	N 10,4	S 4,0%
(807,0)	Tr.	„ 66,7	„ 7,3	„ 12,0	„ 10,1	„ 4,1%

L-Séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XI). On dissout 8,07 g (10 mmoles) du pentapeptide X dans 50 ml d'acide trifluoracétique, maintient 1 h à 20°, évapore à sec, lave le résidu par l'éther, le dissout dans le méthanol, fait passer la solution obtenue à travers IRA-410 (cycle OH⁻) évapore à sec, redissout dans du méthanol et précipite par l'éther. Après séchage, on obtient 4,70 g (83%) de *L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide* de F. 120° (déc.). $[\alpha]_D^{22} = -84,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-65,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; méthanol); $-65,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^0 = 0,6$; $Rf_A^0 = 0,7$; $Rf_P^0 = 0,6$; $E_{1,9}^0 = 0,8$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,6$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{26}H_{40}O_6N_6S$ (564,7)	Calc.	C 55,2	H 7,2	O 17,0	N 14,8	S 5,7%
	Tr.	55,6	7,8	17,7	14,8	5,5%

N-CBO-L-Glutamate de trichloro-2,4,5-phényle (XII). On suspend 27,3 g (100 mmoles) de *N-CBO-L-glutamine* et 50,0 g de tri-(trichloro-2,4,5-phényl)-phosphite⁹) dans 500 ml de pyridine, agit 12 h à 20°, concentre sous pression réduite, ajoute 1000 ml d'acétate d'éthyle, lave successivement par H_2SO_4 1N, $NaHCO_3$ 1N, H_2SO_4 1N, sèche sur Na_2SO_4 , évapore à sec et recristallise dans l'éthanol. On filtre, lave à l'éthanol et sèche. On obtient 24,8 g (53%) de *N-CBO-L-glutamate de trichloro-2,4,5-phényle* de F. 180°. Homogène sur couche mince. $[\alpha]_D^{22} = -17,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $E_{1,9}^a = 1,0$ Glu (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{19}H_{17}O_5N_2Cl_3$ (459,72)	Calc.	C 49,6	H 3,7	O 17,4	N 6,0	Cl 23,1%
	Tr.	49,8	3,8	17,7	6,2	23,0%

N-CBO-L-Glutaminyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XIII). On dissout 4,5 g (8,0 mmoles) du pentapeptide XI et 3,70 g (8,0 mmoles) de l'ester XII dans 20 ml de diméthylformamide, maintient 10 h à 20° puis ajoute 150 ml d'acétate d'éthyle et garde à 0°. Après 16 h on sépare par filtration les cristaux formés, lave à l'acétate d'éthyle et sèche. On obtient ainsi 6,50 g (97%) de *N-CBO-L-glutaminyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide* de F. 196° (déc.). Homogène sur couche mince. $[\alpha]_D^{22} = -48,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1$; diméthylformamide); $-68,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1$; acide acétique 95%). $Rf_M^a = 0,6$; $Rf_A^a = 0,6$; $Rf_P^a = 0,4$; $E_{1,9}^a = 0,7$ Try; $E_{5,8}^a = 0,5$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{39}H_{54}O_{10}N_8S$ (827,0)	Calc.	C 56,6	H 6,6	O 19,3	N 13,5	S 3,9%
	Tr.	56,4	6,6	19,2	14,0	3,8%

L-Glutaminyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XIV). On dissout 5,78 g (7,0 mmoles) d'hexapeptide XIII dans 30 ml d'acide trifluoracétique, ajoute 0,5 ml d'eau, y fait passer à 0° un courant d'HBr, concentre à 10 ml et précipite par l'éther. On lave le précipité à l'éther, redissout dans du méthanol, fait passer la solution obtenue à travers 120 ml d'IRA 410 (cycle OH⁻), évapore à sec, lave le résidu à l'acétate d'éthyle, puis à l'éther, et sèche. On obtient ainsi 3,70 g (76%) de *L-glutaminyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide* de F. 69–71° (déc.). $[\alpha]_D^{22} = -57,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,3$; acide acétique 95%); $-120,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; méthanol); $-54,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,6$; $Rf_A^a = 0,6$; $Rf_P^a = 0,5$; $E_{1,9}^a = 0,7$ Try; $E_{5,8}^a = 0,5$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{31}H_{48}O_8N_8S$ (692,8)	Calc.	C 53,7	H 7,0	O 18,5	N 16,1	S 4,6%
	Tr.	53,4	7,4	18,6	16,3	4,5%

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XV). On dissout 3,96 g (5,2 mmoles) de *N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de p-nitrophényle*⁷) et 3,46 g (5,0 mmoles) de l'hexapeptide XIV dans 10 ml de diméthylformamide, maintient 2 j à 20°, ajoute 20 ml d'acétate d'éthyle et filtre. On lave le précipité à deux reprises par 100 ml d'acétate d'éthyle à l'ébullition, puis par HCl 1N et l'eau. Après séchage on obtient 5,10 g (77%) de *N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-séryl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide* de F. 223° (ramollissement à 216°). Homogène sur couche mince. $[\alpha]_D^{22} = -68,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-33,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 0,9$; diméthylformamide).

$C_{63}H_{85}O_{14}N_{11}S_3$ (1316,6)	Calc.	C 57,5	H 6,5	O 17,0	N 11,7	S 7,3%
	Tr.	57,3	6,6	16,6	11,7	7,2%

Sér⁵-oxytocine (XVI). On dissout 3,00 g (2,28 mmoles) de nonapeptide XVI dans 2200 ml d'ammoniac anhydre. On traite au sodium, oxyde à l'air et purifie par contre-courant comme pour la Sér⁴-oxytocine (V). Après 400 transferts, on détermine sur des aliquotes¹⁹) la position du sommet principal ($K = 0,45$), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore au vide le *s*-butanol et lyophilise la solution aqueuse. Le résidu contient 175,7 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 1,117 g (50%) de Sér⁵-oxytocine. Celle-ci est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse sur papier après révélation par ninhydrine, bleu de bromophénol, chlore et FOLIN. $Rf_M^O = 0,6$; $Rf_A^O = 0,7$; $Rf_P^O = 0,6$; $E_{1,9}^O = 0,7$ Try; $E_{6,8}^O = 0,3$ His. L'hydrolysate acide (HCl 6N, 110°, 16 h) donne les acides aminés composants dans les rapports attendus. Pour l'analyse, un échantillon est séché 2 h à 100°.

$C_{42}H_{65}O_{12}N_{11}S_2 + H_2O$ (998,2)	Calc. C 50,5 H 6,7 O 20,8 N 15,4 S 6,4%
	Tr. „ 50,8 „ 6,8 „ 20,8 „ 15,4 „ 6,2%

Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau.

N-CBO-L-Alanyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XVII). On dissout 7,20 g (15 mmoles) de S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide⁸) et 6,10 g (15 mmoles) de N-CBO-L-alaninate de trichloro-2,4,5-phényle¹²) dans 30 ml de diméthylformamide, garde 16 h à 20°, puis ajoute 300 ml d'acétate d'éthyle. Après 6 h à 0° on isole par filtration le produit cristallisé, lave par l'acétate d'éthyle, refroidit à 0° et sèche. On obtient ainsi 7,06 g (69%) de N-CBO-L-alanyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 165°. Homogène sur couche mince. $[\alpha]_D^{25} = -94,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,4$; méthanol); $-49,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-41,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^A = 0,7$; $Rf_A^A = 0,7$; $Rf_P^A = 0,7$; $E_{1,9}^A = 0,9$ Try; $E_{6,8}^A = 0,7$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{34}H_{46}O_7N_6S$ (682,8)	Calc. C 59,8 H 6,8 O 16,4 N 12,3 S 4,7%
	Tr. „ 59,8 „ 6,9 „ 16,7 „ 12,3 „ 4,8%

L-Alanyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XVIII). On dissout 6,15 g (9,0 mmoles) de pentapeptide XVII dans 62 ml d'une solution 4,5N de HBr dans l'acide acétique, garde 1 h à 20°, concentre à 30 ml, précipite par l'éther, lave à l'éther et filtre. On redissout le précipité dans le méthanol, fait passer à travers 50 ml d'IRA-410 (cycle OH⁻) évapore à sec, lave le résidu à l'éther et sèche. On obtient ainsi 4,01 g (80%) de L-alanyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 110° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -85,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^O = 0,7$; $Rf_A^O = 0,6$; $Rf_P^O = 0,7$; $E_{1,9}^O = 0,9$ Try; $E_{6,8}^O = 0,7$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

N-CBO-L-Glutaminyl-L-alanyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XIX). On dissout 3,84 g (7,0 mmoles) de pentapeptide XVIII et 3,21 g (7,0 mmoles) d'ester XII dans 20 ml de diméthylformamide, garde 2 j à 20°, puis ajoute 200 ml d'acétate d'éthyle et filtre. On lave la masse cristalline par l'acétate d'éthyle à 0°, puis par l'éther, et sèche. On obtient ainsi 4,50 g (79%) de N-CBO-L-glutaminyl-L-alanyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 192°. Homogène sur couche mince. $[\alpha]_D^{25} = -50,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide); $-78,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^A = 0,5$; $Rf_A^A = 0,6$; $Rf_P^A = 0,6$; $E_{1,9}^A = 0,8$ Try; $E_{6,8}^A = 0,6$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{39}H_{54}O_9N_8S$ (811,0)	Calc. C 57,8 H 7,1 O 17,8 N 13,8 S 3,9%
	Tr. „ 56,8 „ 7,1 „ 17,5 „ 13,6 „ 4,0%

L-Glutaminyl-L-alanyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XX). On dissout 5,67 g (7,0 mmoles) d'hexapeptide XIX dans 60 ml d'une solution 4,5N de HBr dans l'acide acétique. Après 1 h à 20°, on concentre à 30 ml, ajoute 200 ml d'éther, filtre, lave le précipité à l'éther, le redissout dans le méthanol, fait passer la solution obtenue à travers 50 ml d'IRA-410 (cycle OH⁻), évapore à sec, lave le résidu à l'éther et sèche. On obtient ainsi 4,25 g (89%) de L-glutaminyl-L-alanyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 110° (déc.). $[\alpha]_D^{25} = -83,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%). $Rf_M^O = 0,5$; $Rf_A^O = 0,5$; $Rf_P^O = 0,6$; $E_{1,9}^O = 0,8$ Try; $E_{6,8}^O = 0,6$ His (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{31}H_{48}O_7N_8S + H_2O$ (694,9)	Calc. C 57,3 H 7,6 O 18,5 N 16,1 S 4,6%
	Tr. „ 57,7 „ 7,6 „ 18,3 „ 16,4 „ 4,7%

N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-alanyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XXI). On dissout 4,60 g (6,0 mmoles) de *N*-tosyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucinate de *p*-nitrophényle⁷) et 4,62 g (6,0 mmoles) d'hexapeptide XX dans 15 ml de diméthylformamide, garde 2 j à 20°, ajoute 150 ml d'acétate d'éthyle, filtre et essore. On lave le précipité en le suspendant à deux reprises dans 50 ml de méthanol bouillant. On filtre, lave à l'éther et sèche. On obtient une première portion de 2,61 g de nonapeptide. Le filtrat méthanolique est évaporé à sec et le résidu, lavé par l'acétate d'éthyle puis par le méthanol à ébullition. On obtient ainsi encore 1,62 g, soit au total 4,23 g (54%) de *N*-tosyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-tyrosyl-*L*-isoleucyl-*L*-glutaminyl-*L*-alanyl-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-prolyl-*L*-leucyl-glycinamide de F. 230–235°. Homogène sur couche mince. $[\alpha]_D^{25} = -74,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique 95%); $-35,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide).

$C_{63}H_{85}O_{13}N_{11}S_3$	Calc.	C 58,2	H 6,6	O 16,0	N 11,9	S 7,4%
(1300,6)	Tr.	„ 57,2	„ 6,8	„ 16,2	„ 12,1	„ 7,7%

Ala⁵-oxytocine (XXII). On dissout 2,00 g (1,54 mmole) de nonapeptide XXI dans 1500 ml d'ammoniac anhydre. On traite au sodium, oxyde à l'air et purifie par contre-courant comme pour la Sér⁴-oxytocine (V) ci-dessus. Après 791 transferts, on détermine sur des aliquotes¹⁹) la position du sommet principal ($K = 0,28$), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore au vide le *s*-butanol et lyophilise la solution aqueuse. Le résidu contient 154,0 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 964 mg (65%) d'*Ala⁵-oxytocine*. Celle-ci est homogène à la chromatographie et à l'électrophorèse sur papier après révélation par ninhydrine, chlore, bleu de bromophénol et FOLIN. $Rf_M^0 = 0,7$; $Rf_A^0 = 0,7$; $Rf_P^0 = 0,6$; $E_{1,9}^0 = 0,7$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,5$ His. L'hydrolyse totale (HCl 6N, 110°, 16 h) donne les acides aminés composants dans les rapports attendus. Pour l'analyse un échantillon est séché 2 h à 100°.

$C_{42}H_{65}O_{11}N_{11}S_2 + \frac{1}{2} H_2O$	Calc.	C 51,9	H 6,8	O 18,9	N 15,8	S 6,6%
(973,2)	Tr.	„ 52,0	„ 6,7	„ 19,0	„ 15,6	„ 6,7%

Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau.

SUMMARY

Ser⁴-oxytocin and Ala⁴-oxytocin have been synthesized and found to possess biological properties not very different from those of isotocin. Ser⁵-oxytocin and Ala⁵-oxytocin have also been prepared and found to be almost inactive. An hypothesis concerning the mode of fixation of oxytocin on its receptor is presented.

Laboratoires de chimie pharmaceutique, SANDOZ SA., Bâle