

213. Synthèse de la Phe²-Orn⁸-vasopressine et de la Phe²-Orn⁸-oxytocine, deux analogues de la vasopressine doués d'une activité pressorifique sélective¹⁾

par R. L. Huguenin

(29 VIII 64)

Nous avons observé précédemment [1] [2]²⁾ que si, dans les molécules de vasopressines et dans celle d'oxytocine, on remplaçait le 8^e reste d'acide aminé (arginine, lysine ou leucine) par un reste d'ornithine, cette substitution exerçait une influence marquée sur la sélectivité des activités vasopressiques.

D'autre part, il est connu que le remplacement du reste de tyrosine par un reste de phénylalanine en position 2 des molécules de vasopressines et de vasotocines [3] [4] [6], c'est-à-dire la suppression de l'hydroxyle phénolique, peut aussi être accompagné d'une variation de cette sélectivité.

Afin d'examiner de quel effet serait suivie l'introduction simultanée de ces deux modifications dans les molécules de vasopressine et d'oxytocine, nous avons entrepris la synthèse d'analogues de ces hormones comportant à la fois un reste de phénylalanine en position 2 et un reste d'ornithine en position 8, soit la Phe²-Orn⁸-vasopressine et la Phe²-Orn⁸-oxytocine, dont nous décrivons la synthèse dans le présent travail.

Les méthodes que nous avons utilisées sont indiquées dans les schémas 1 et 2. L'hexapeptide protégé N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide qui avait été obtenu précédemment [2] par condensation du N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-azide avec le L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide, a été synthétisé cette fois par la méthode récurrente à partir de ce même amide tripeptidique, en utilisant successivement les esters trichloro-2,4,5-phényliques de la N-CBO-S-benzyl-L-cystéine [7], de la N-CBO-L-asparagine et de la N-CBO-L-glutamine [7]. Après scission du groupe carbobenzoxy, l'hexapeptide libre obtenu a été condensé, soit avec le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalaninyl-L-phénylalaninate de *p*-nitrophényle [6], soit avec le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalaninyl-L-isoleucininate de *p*-nitrophényle [6]. Après scission par le sodium dans l'ammoniac liquide [8] des groupes protecteurs des nonapeptides obtenus, oxydation au ferricyanure [9] et purification par distribution en contre-courant, nous avons obtenu dans un cas la Phe²-Orn⁸-vasopressine (IX) et dans l'autre la Phe²-Orn⁸-oxytocine (XI). Ces deux produits se sont montrés homogènes à la chromatographie sur papier et à l'électrophorèse sur papier à haut voltage, dans différentes conditions, et ont fourni après hydrolyse les proportions attendues des acides aminés constituants. Les activités biologiques de ces deux peptides ont été déterminées par les Drs B. BERDE et E. STÜRMER de notre Département de recherches médico-biologiques (Dir.: Dr A. CERLETTI) et sont indiquées dans le tableau.

¹⁾ Une brève communication concernant la synthèse et les propriétés pharmacologiques de ces subs. ainsi que celles de l'Orn⁸-vasopressine et de l'Orn⁸-oxytocine, a paru précédemment [1].

²⁾ Les chiffres entre crochets renvoient à la bibliographie, p. 1941.

Tableau des activités biologiques

Formule chimique et désignation	Activités oxytociques en unités internationales par mg de base libre			Activités vasopressives en unités internationales par mg de base libre			Rapport activité pressorique/activité anti-diurétique
	Contraction de l'utérus isolé du 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-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Orn-Gly-NH ₂	10 ± 2	21 ± 1	~ 50	360 ± 26	88 ± 17		4:1
Orn ⁸ -vasopressine [2]							
H-CyS-Phe-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Orn-Gly-NH ₂	~ 0,5	< 0,01	~ 3	153 ± 11	16 ± 2		10:1
Phe ⁸ -Orn ⁸ -vasopressine (IX)							
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Orn-Gly-NH ₂	42 ± 5	90 ± 3	95 ± 6	103 ± 10	2,5 ± 0,3		40:1
Orn ⁸ -oxytocine [2]							
H-CyS-Phe-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Orn-Gly-NH ₂	~ 1	~ 3	7 ± 2	120 ± 10	0,55 ± 0,08		220:1
Phe ⁸ -Orn ⁸ -oxytocine (XI)							

affectée que les activités oxytociques et antidiurétique. Cette même modification appliquée à l'Orn⁸-oxytocine est suivie d'une forte diminution des activités oxytociques et antidiurétique, tandis qu'elle augmente légèrement l'activité pressorique.

La suppression de l'hydroxyle phénolique de la tyrosine en position 2 des molécules d'arginine-vasopressine, d'arginine-vasotocine (= Arg⁸-oxytocine), de lysine-vasopressine et de lysine-vasotocine (= Lys⁸-oxytocine) est accompagnée d'une diminution des activités biologiques, cette diminution étant parfois plus accentuée pour certaines activités que pour d'autres. Il n'était guère possible de prévoir quel effet exercerait une telle suppression chez l'Orn⁸-vasopressine et l'Orn⁸-oxytocine, car si l'on observe – en se limitant aux activités vasopressiques – une diminution plus marquée de l'activité antidiurétique que de l'activité pressorique dans les cas de la Phe²-Lys⁸-vasopressine [3] et de la Phe²-Lys⁸-oxytocine [4], c'est au contraire l'activité pressorique qui est la plus affectée dans le cas de la Phe²-Arg⁸-vasopressine [6]; dans celui de la Phe²-Arg⁸-oxytocine [6] enfin, la diminution est à peu près la même pour les deux types d'activités.

Les vasopressines naturelles aussi bien que l'oxytocine, présentent le même rapport activité pressorique/activité antidiurétique, rapport posé égal à 1:1. Dans la série des vasopressines, l'introduction d'un reste d'ornithine en position 8 élève ce rapport à 4:1; si cette même substitution est combinée avec la suppression de l'hydroxyle phénolique, on arrive à un rapport de 10:1. Dans la série de l'oxytocine, l'introduction d'un reste d'ornithine en position 8 élève le rapport à 40:1; effectuées simultanément, la substitution par l'ornithine en position 8 et la suppression de l'hydroxyle phénolique en position 2 permettent d'atteindre un rapport de 220:1.

L'introduction simultanée de ces deux modifications agit donc en augmentant nettement la sélectivité en faveur de l'activité pressorique; cette augmentation est plus prononcée dans la série de l'oxytocine que dans la série des vasopressines. Les récepteurs responsables de l'activité pressorique semblent donc être moins affectés par l'introduction de ces deux modifications que ne le sont les récepteurs gouvernant l'activité antidiurétique.

Partie expérimentale³⁾

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).

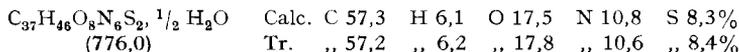
Les chromatographies sur papier ont été effectuées selon la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040 lavé». Rf_M dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:20); Rf_A dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/eau (35:35:30); Rf_p dans le mélange *n*-butanol/acide acétique/eau (70:10:20); Rf^0 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 & PFLEIDERER [10]: au pH 1,9 ($E_{1,9}$) dans le mélange acide formique/acide acétique/eau (10:10:75); au pH 5,8 ($E_{5,8}$) dans le mélange pyridine/acide acétique/eau (9:1:90). $E_{1,9} = 0,8$ His indique qu'à pH 1,9 la substance migre 0,8 fois la distance que migre l'histidine. Les exposants ⁰ et ^a ont la même signification que pour les chromatogrammes. Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et phérogrammes ont été décrits précédemment [11].

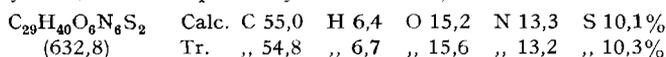
N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide (I). On dissout 22,3 g (50,7 mmoles) de L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide [2] et 29,3 g (55,8 mmoles) de N-CBO-

³⁾ La partie expérimentale a été réalisée avec l'assistance technique de M. A. MOSIMANN. Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr W. SCHÖENIGER).

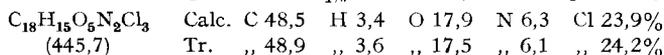
S-benzyl-L-cystéinate de trichloro-2,4,5-phényle [7] dans 30 ml de diméthylformamide, laisse séjourner 2 jours à 20°, puis ajoute 85 ml d'acétate d'éthyle, ce qui provoque la lente cristallisation de la substance. Après un repos de 5 h, on filtre, lave avec le mélange diméthylformamide/acétate d'éthyle 1:3 puis abondamment à l'acétate d'éthyle. Après séchage au vide à 40°, on obtient 31,0 g (78%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide, de F. 139°. Pour l'analyse, on recristallise un échantillon dans 4 vol. de méthanol. F. inchangé. $[\alpha]_D^{25} = -38^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,8$; diméthylformamide); $-47^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,3$; acide acétique à 95%).



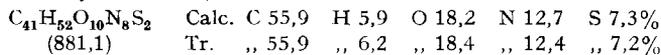
S-Benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide (II). Dans 150 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, on dissout 30,0 g (38,7 mmoles) de tétrapeptide protégé I. Après un séjour de 1 h à 20°, on introduit la solution sous agitation dans 1500 ml d'éther anhydre, filtre et lave à l'éther le précipité formé. On prépare la base libre en faisant passer la substance, en solution dans 120 ml de méthanol, à travers 200 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle OH⁻) puis en lavant encore par 600 ml de méthanol. Après évaporation du filtrat au vide puis séchage au vide poussé à 30°, on obtient 21,2 g (87%) de S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide amorphe. $[\alpha]_D^{25} = -38,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,1$; acide acétique à 95%). $E_{1,9}^0 = 0,8$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,6$ His. $\text{Rf}_M^0 = 0,8$; $\text{Rf}_P^0 = 0,6$; $\text{Rf}_A^0 = 0,75$ (substance chromatographiée à l'état de bromhydrate; révélation par ninhydrine et chlore).



N-CBO-L-Asparaginate de trichloro-2,4,5-phényle (III). A une solution, refroidie à -5° , de 8,00 g (30 mmoles) de N-CBO-L-asparagine et de 6,52 g (33 mmoles) de trichloro-2,4,5-phénol dans 30 ml de diméthylformamide, on ajoute 6,20 g (30 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide, puis secoue 2 h à température ordinaire. Après refroidissement à 0°, on éloigne et lave par 30 ml de diméthylformamide le précipité d'urée (6,46 g, 96%), évapore le filtrat au vide poussé à 30°, puis lave soigneusement le résidu à l'éther puis par NaHCO₃ 1N à $+5^\circ$, H₂O, AcOH 0,2N et H₂O. Après séchage au vide poussé à 25°, on obtient 8,03 g (60%) de N-CBO-L-asparaginate de trichloro-2,4,5-phényle de F. 224° (instantané). Pour l'analyse, on recristallise un échantillon dans l'alcool absolu. Aiguilles de F. 225° (instantané). $[\alpha]_D^{25} = -30^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,9$; diméthylformamide); $-33,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,8$; acide acétique à 95%). $E_{1,9}^a = 0,9$ Glu (révélation par ninhydrine et chlore).



N-CBO-L-Asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide (IV). On dissout 14,8 g (33,2 mmoles) de N-CBO-L-asparaginate de trichloro-2,4,5-phényle (III) dans 60 ml de diméthylformamide, ajoute une solution de 20,0 g (31,6 mmoles) de tétrapeptide libre II dans 50 ml de diméthylformamide, laisse séjourner 3-4 jours à 20° puis ajoute 110 ml d'acétate d'éthyle et laisse cristalliser à $+4^\circ$. Après 15 h, on essore le précipité formé, le lave 2 fois avec le mélange diméthylformamide/acétate d'éthyle 1:1 puis 3 fois à l'acétate d'éthyle seul. Après séchage au vide poussé à 40°, on obtient 21 g de N-CBO-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide de F. 171-174°. De la liqueur-mère cristallisent encore 2,5 g de produit de même F. Rendement total 84%. Pour l'analyse, on recristallise un échantillon par adjonction de 8 vol. de méthanol à sa solution dans 2 vol. de diméthylformamide. F. 173-174°. $[\alpha]_D^{25} = -39,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,2$; diméthylformamide).



L-Asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide (V). On dissout 22,0 g (25 mmoles) de pentapeptide protégé IV dans 150 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse reposer 1 h à 20° puis introduit la solution sous vive agitation dans 1,5 l d'éther sec. Le précipité est lavé à l'éther, séché au vide à 25° puis dissous dans 100 ml de méthanol et passé à travers une colonne contenant 300 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle OH⁻). On lave encore la résine avec 600 ml de méthanol, évapore au vide à 30° les filtrats réunis et obtient ainsi 16,2 g de produit présentant une petite impureté à l'électrophorèse. Pour le purifier, on le dissout dans 320 ml de *n*-butanol et lave cette solution une fois par 160 ml et deux fois par 80 ml

d'eau. La phase organique est évaporée au vide à 30°. Après séchage au vide poussé, on obtient 15,2 g (81%) de *L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-prolyl-*N*^δ-tosyl-*L*-ornithyl-glycinamide amorphe. $[\alpha]_D^{22} = -49^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,4$; acide acétique à 95%). $E_{1,9}^0 = 0,65$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,55$ His. $Rf_M^0 = 0,65$; $Rf_A^0 = 0,7$ (produit chromatographié à l'état de chlorhydrate; révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{38}H_{46}O_8N_8S_2$	Calc. C 53,1	H 6,2	O 17,1	N 15,0	S 8,6%
(746,9)	Tr. ,, 53,2	,, 6,7	,, 17,5	,, 15,4	,, 8,8%

N-CBO-*L*-Glutaminyll-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-prolyl-*N*^δ-tosyl-*L*-ornithyl-glycinamide (VI). A une solution de 14,2 g (19,0 mmoles) de pentapeptide libre V dans 30 ml de diméthylformamide, on ajoute 9,20 g (20,0 mmoles) de *N*-CBO-*L*-glutamate de trichloro-2,4,5-phényle [7]. La solution se prend bientôt en un gel. Après un séjour de 15 h à 20°, on triture la masse durcie dans 50 ml de mélange diméthylformamide/acétate d'éthyle 2:3, filtre, lave encore par 30 ml du même mélange puis abondamment à l'acétate d'éthyle. Après séchage au vide poussé à 50°, on obtient 16,8 g (88%) de *N*-CBO-*L*-glutaminyll-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-prolyl-*N*^δ-tosyl-*L*-ornithyl-glycinamide de F. 193° (après préchauffage à 150° environ). $[\alpha]_D^{21} = -38,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,3$; diméthylformamide) (Litt. [2]: F. 176–178°; $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,2$, diméthylformamide)).

$C_{46}H_{60}O_{12}N_{10}S_2, \frac{1}{2}H_2O$	Calc. C 54,3	H 6,0	O 19,6	N 13,8	S 6,3%
(1018,2)	Tr. ,, 54,0	,, 6,3	,, 19,6	,, 13,7	,, 6,5%

L-Glutaminyll-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-prolyl-*N*^δ-tosyl-*L*-ornithyl-glycinamide (VII). On dissout 16,0 g (15,7 mmoles) d'hexapeptide protégé VI dans 85 ml d'acide acétique anhydre, en chauffant à 50°, et ajoute, après refroidissement à 20°, 170 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après un séjour de 1 h à 20°, on introduit la solution sous vive agitation dans 1,7 l d'éther sec. Le précipité, lavé à l'éther puis séché au vide à 20°, est dissous dans 40 ml de méthanol et la solution ainsi obtenue est passée à travers une colonne de 200 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle OH⁻). On lave encore la résine avec 600 ml de méthanol puis évapore les filtrats réunis, au vide à 30°. Après séchage au vide poussé à 20°, on obtient 11,6 g (83%) de *L*-glutaminyll-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-prolyl-*N*^δ-tosyl-*L*-ornithyl-glycinamide amorphe. $[\alpha]_D^{22} = -48^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,6$; acide acétique à 95%) (Litt. [2]: -43°). $E_{1,9}^0 = 0,65$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,5$ His. $Rf_M^0 = 0,55$; $Rf_A^0 = 0,55$.

$C_{38}H_{54}O_{10}N_{10}S_2, 1H_2O$	Calc. C 51,1	H 6,3	O 19,7	N 15,7	S 7,2%
(893,1)	Tr. ,, 51,3	,, 6,6	,, 19,9	,, 15,7	,, 7,2%

N-CBO-*S*-Benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-phénylalanyl-*L*-phénylalanyl-*L*-glutaminyll-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-prolyl-*N*^δ-tosyl-*L*-ornithyl-glycinamide (VIII). Dans 6 ml de diméthylformamide, on dissout successivement 1,75 g (1,96 mmole) d'hexapeptide VII et 1,52 g (2,00 mmoles) de *N*-CBO-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-phénylalanyl-*L*-phénylalaninate de *p*-nitrophényle [6]. Après un séjour de 15 h à 20°, on triture la masse épaisse dans 24 ml d'acétone, filtre, lave au mélange diméthylformamide/acétone 1:5 puis à l'acétone seule. On traite le produit obtenu (2,29 g, F. 220°) à trois reprises par 10 ml de méthanol bouillant, en filtrant chaque fois à chaud. Après séchage au vide poussé à 40°, on obtient 2,05 g (70%) de *N*-CBO-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-phénylalanyl-*L*-phénylalanyl-*L*-glutaminyll-*L*-asparaginyll-*S*-benzyl-*L*-cystéinyl-*L*-prolyl-*N*^δ-tosyl-*L*-ornithyl-glycinamide de F. 222–224°. $[\alpha]_D^{23} = -39,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2$; diméthylformamide). $E_{1,9}^0 = 0,5$ Try. $Rf_M^0 = 0,85$; $Rf_A^0 = 0,75$ (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{74}H_{89}O_{15}N_{13}S_3$	Calc. C 59,4	H 6,0	O 16,0	N 12,2	S 6,4%
(1496,8)	Tr. ,, 59,6	,, 6,2	,, 16,3	,, 12,2	,, 6,1%

*Phe*²-*Orn*⁸-*vasopressine* (IX). On dissout 1,30 g (0,87 mmole) de nonapeptide protégé VIII dans environ 250 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute lentement du sodium jusqu'à persistance de la coloration bleue. Après adjonction de 0,85 g de NH₄Cl, on évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 800 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 7 puis ajoute du ferricyanure de potassium [9] en solution aqueuse 0,05N jusqu'à apparition d'une teinte jaune pâle (utilisé 31,3 ml, soit 90% de la théorie), acidifie à pH 4,5 au moyen d'acide acétique glacial, adsorbe le peptide sur 140 ml d'Amberlite IRC-50 (XE-64) (cycle acide) et, après lavage par 600 ml d'acide acétique à 1% pour éliminer les sels présents [12], élue la substance par 500 ml d'acide acétique 50%. L'éluat est évaporé au vide à 30°, et le résidu, dissous dans 40 ml d'acide

acétique 0,01N, est encore passé sur 40 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle acétate) pour éliminer les ions ferrocyanure encore présents. On lave par 120 ml d'acide acétique 0,01N et évapore au vide à 30°. Le produit ainsi obtenu est soumis à une distribution en contre-courant dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoroacétique 120:160:1. Après 200 transferts, on détermine sur des aliquotes [13] la position du sommet principal ($K = 0,50$), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore le *sec*-butanol au vide à 30°, fait passer la solution aqueuse résiduelle sur 220 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle acétate) pour éliminer l'acide trifluoroacétique, lave par 650 ml d'acide acétique 0,01N, concentre au vide et lyophilise. On obtient ainsi 276 mg de poudre contenant 41,5 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 234 mg de base libre de Phe²-Orn⁸-vasopressine. $E_{1,9}^0 = 1,02$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,73$ His; $Rf_M^0 = 0,03$; $Rf_P^0 = 0,10$; $Rf_A^0 = 0,25$ (révélation par ninhydrine et chlore). Un témoin d'arginine-vasopressine a donné les valeurs: $E_{1,9}^0 = 0,95$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,65$ His; $Rf_M^0 = 0,19$; $Rf_P^0 = 0,11$; $Rf_A^0 = 0,41$. L'hydrolyse acide (HCl 6N, 16 h à 110° en l'absence d'air) fournit les proportions attendues des acides aminés constituants. Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau. Pour l'analyse, un échantillon est séché au vide poussé, 16 h à 100°.

$C_{45}H_{88}O_{11}N_{13}S_2 \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$ (1053,3)	Calc. C 51,3 H 6,3 O 19,0 N 17,3 S 6,1%
	Tr. „ 51,3 „ 5,9 „ 18,8 „ 17,1 „ 6,1%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide (X). Dans 7 ml de diméthylformamide, on dissout successivement 1,79 g (2,0 mmoles) d'hexapeptide VII et 1,45 g (2,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-isoleucinate de *p*-nitrophényle [6]. La solution se prend rapidement en gel. Après un séjour de 15 h à 20°, on triture la masse épaisse dans 28 ml d'acétone, filtre, lave au mélange diméthylformamide/acétone 1:5 puis à l'acétone seule. On traite le produit obtenu, à trois reprises, par 10 ml de méthanol bouillant, en filtrant à chaud chaque fois. Après séchage au vide poussé à 40°, on obtient 2,54 g (87%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide de F. 241–243°. $[\alpha]_D^{25} = -40^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,7$; diméthylformamide). $E_{1,9}^0 = 0,5$ Try. $Rf_M^0 = 0,85$; $Rf_A^0 = 0,8$ (révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{71}H_{91}O_{15}N_{13}S_3$ (1462,8)	Calc. C 58,3 H 6,3 N 12,4 S 6,6%
	Tr. „ 58,4 „ 6,4 „ 12,2 „ 6,6%

Phe²-Orn⁸-oxytocine (XI). On dissout 1,30 g (0,89 mmole) de nonapeptide protégé X dans environ 250 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute lentement du sodium jusqu'à persistance de la coloration bleue. Après adjonction de 0,85 g de NH₄Cl, on évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 800 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 7 puis ajoute du ferrocyanure de potassium [9] en solution aqueuse 0,05N jusqu'à apparition d'une teinte jaune pâle (utilisé 32,5 ml, soit 91% de la théorie), acidifie à pH 4,5 au moyen d'acide acétique glacial, adsorbe le peptide sur 140 ml d'Amberlite IRC-50 (XE-64) (cycle acide) et, après lavage par 600 ml d'acide acétique à 1% pour éliminer les sels présents [12], élue la substance par 500 ml d'acide acétique 50%. L'éluat est évaporé au vide à 30° et le résidu, dissous dans 40 ml d'acide acétique 0,01N, est passé encore sur 40 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle acétate) pour éliminer les ions ferrocyanure encore présents. On lave par 120 ml d'acide acétique 0,01N, évapore au vide à 30°. Le produit ainsi obtenu est soumis à une distribution en contre-courant dans le système *sec*-butanol/eau/acide trifluoroacétique 120:160:1. Après 200 transferts, on détermine sur des aliquotes [13] la position du sommet principal ($K = 0,39$), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore le *sec*-butanol au vide à 30°, fait passer la solution aqueuse résiduelle sur 320 ml d'Amberlite IRA-410 (cycle acétate) pour éliminer l'acide trifluoroacétique, lave par 950 ml d'acide acétique 0,01N, concentre au vide et lyophilise. On obtient ainsi 351 mg de poudre contenant 52,8 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 288 mg de base libre de Phe²-Orn⁸-oxytocine. $E_{1,9}^0 = 1,07$ Try; $E_{6,8}^0 = 0,75$ His; $Rf_M^0 = 0,02$; $Rf_P^0 = 0,11$; $Rf_A^0 = 0,25$ (révélation par ninhydrine et chlore). Un témoin d'arginine-vasopressine a donné les valeurs indiquées sous IX. L'hydrolyse acide (HCl 6N, 16 h à 110° en l'absence d'air) fournit les proportions attendues des acides aminés constituants. Les activités biologiques sont indiquées dans le tableau. Pour l'analyse, un échantillon est séché au vide poussé, 16 h à 100°.

$C_{42}H_{65}O_{11}N_{13}S_2 \cdot 2CH_3COOH$ (1112,3)	Calc. C 49,7 H 6,6 N 16,4 S 5,8%
	Tr. „ 49,5 „ 6,7 „ 16,7 „ 6,1%

SUMMARY

Phe²-Orn⁸-vasopressin and Phe²-Orn⁸-oxytocin have been prepared by synthesis. Both analogues, but especially the second one, have a more selective pressor activity than the natural vasopressins and than most hitherto synthesized analogues of these hormones.

Laboratoires de chimie pharmaceutique
SANDOZ S.A., Bâle

BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. BERDE, R. A. BOISSONNAS, R. L. HUGUENIN & E. STÜRMER, *Experientia* 20, 42 (1964).
 [2] R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 46, 1669 (1963).
 [3] R. A. BOISSONNAS & ST. GUTTMANN, *Helv.* 43, 190 (1960).
 [4] P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *synthèse non publiée, résultats cités dans* [5].
 [5] R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, B. BERDE & H. KONZETT, *Experientia* 17, 377 (1961).
 [6] R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 45, 1629 (1962).
 [7] J. PLESS & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 46, 1609 (1963).
 [8] V. DU VIGNEAUD, CH. RESSLER, J. M. SWAN, C. W. ROBERTS & P. G. KATSOYANNIS, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 3115 (1954).
 [9] V. DU VIGNEAUD, G. WINESTOCK, V. V. S. MURTI, D. B. HOPE & R. D. KIMBROUGH JR, *J. biol. Chemistry* 235, PC64 (1960); D. B. HOPE, V. V. S. MURTI & V. DU VIGNEAUD, *ibid.* 237, 1563 (1962).
 [10] TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 67, 257 (1955).
 [11] ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 43, 200 (1960).
 [12] H. B. F. DIXON, *Biochim. biophys. Acta* 34, 251 (1959).
 [13] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* 193, 265 (1951).

214. Die ESR.-Spektren der Radikal-Anionen des Hexamethyl- und des Hexaäthylradialens

von F. Gerson

(1. IX. 64)

Nachdem das Hexamethylradialen (I) vor einigen Jahren von HOPFF & WICK [1] beschrieben wurde, ist kürzlich HOPFF & GATI [2] die Darstellung der Hexaäthyl-Verbindung II gelungen. I und II sind symmetrische Alkyl-Derivate des noch unbekanntem Hexamethylencyclohexans (III), das Radialen genannt wird [3].

Physikalisch-chemische Eigenschaften des Hexamethylradialens [3] weisen darauf hin, dass die Molekel I nicht eben sein kann, sondern, dass der zentrale Sechsring voraussichtlich in einer Sesselform vorliegt. Kalotten-Modelle nach STUART-BRIEGLER zeigen, dass dies auch für die Hexaäthyl-Verbindung II im vermehrten Masse gelten muss.

Die hohe Symmetrie von III (D_{6h}) bleibt infolge der Störung durch die Alkylsubstituenten in den Derivaten I und II nicht erhalten. Nimmt man jedoch an, dass die mittlere Konformation in I und II noch die Symmetrie D_{3d} aufweist, so sind im Durchschnitt alle α -, β - und γ -Protonen äquivalent, und für die aus I und ableitbaren Radikal-Anionen lassen sich relativ einfache ESR.-Hyperfeinstrukturen erwarten. (Nach der