

### 203. Synthèse de la Gly<sup>8</sup>-oxytocine, de l'Ala<sup>8</sup>-oxytocine et de la But<sup>8</sup>-oxytocine

par P.-A. Jaquenoud

(28 IX 65)

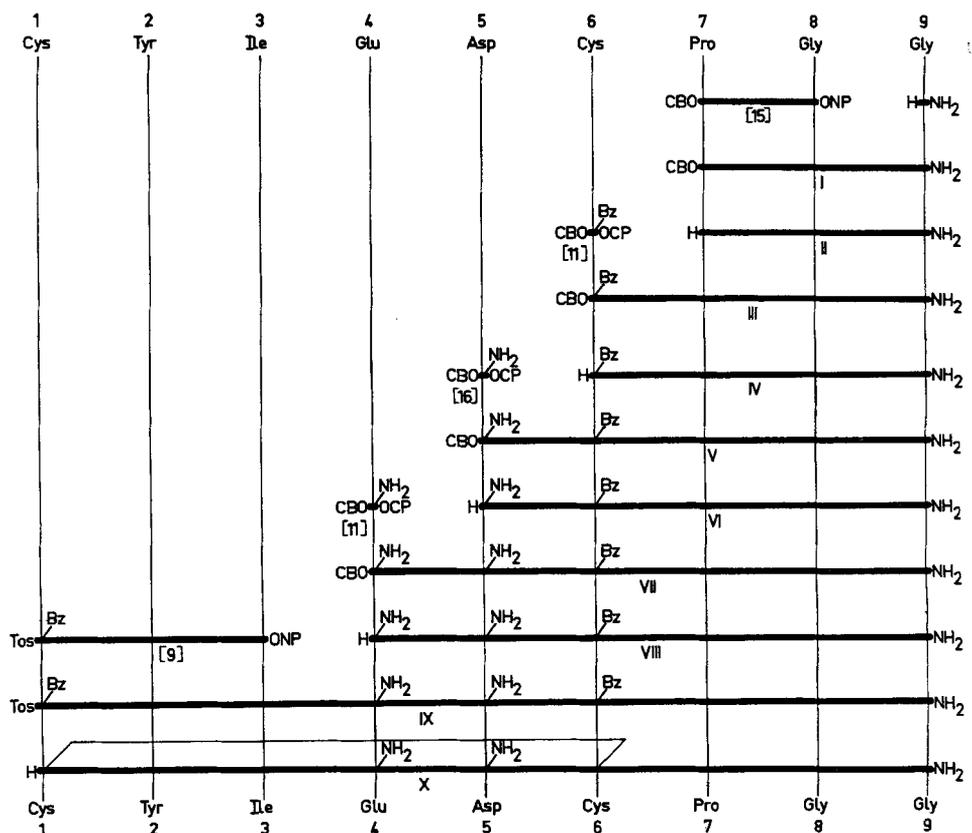
De nombreux analogues de l'oxytocine modifiés en position 8 ont été étudiés jusqu'à ce jour [1] [2]. Certains de ceux-ci, tels que l'Ile<sup>8</sup>-oxytocine [3], la Val<sup>8</sup>-oxytocine [3], la (N<sup>ε</sup>-formyl-Lys)<sup>8</sup>-oxytocine [4] et la Cit<sup>8</sup>-oxytocine [5], sont doués de fortes activités oxytociques, alors que d'autres possédant en position 8 un reste d'acide aminé basique, tels que l'Arg<sup>8</sup>-oxytocine (arginine-vasotocine) [6], la Lys<sup>8</sup>-oxytocine [7] et l'Orn<sup>8</sup>-oxytocine [8], sont également doués d'une forte activité pressorique. Etant donné qu'aucun analogue de l'oxytocine dépourvu de chaîne latérale en position 8 ou ne possédant qu'une courte chaîne aliphatique en cette position n'a été décrit jusqu'à ce jour, nous avons décidé de synthétiser la Gly<sup>8</sup>-oxytocine, l'Ala<sup>8</sup>-oxytocine et la But<sup>8</sup>-oxytocine.

Les méthodes de synthèse que nous avons utilisées sont décrites dans les schémas 1, 2 et 3. Les hexapeptides ont tous été préparés par la méthode récurrente. Dans le cas de la Gly<sup>8</sup>-oxytocine et de l'Ala<sup>8</sup>-oxytocine les hexapeptides correspondants ont été condensés avec le N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de *p*-nitro-phényle décrit précédemment [9]. Cette condensation peut conduire selon certains auteurs [10] à la racémisation partielle du reste isoleucine en position 3; cependant, dans les conditions que nous avons utilisées, aucune racémisation n'a pu être observée. En effet, l'étude des hydrolysats des nonapeptides obtenus révèle que la quantité d'isoleucine qui se serait racémisée (en donnant de la D-allo-isoleucine) est inférieure à 1%.

Dans le cas de la But<sup>8</sup>-oxytocine, nous avons utilisé pour la préparation du nonapeptide correspondant un schéma de synthèse entièrement récurrent. Dans la plupart des cas nous avons utilisé les esters actifs trichloro-2,4,5-phényliques des N-CBO-acides aminés [11].

Après scission par le sodium dans l'ammoniac liquide des groupes protecteurs des trois nonapeptides obtenus, oxydation à l'air et purification par distribution en contre-courant, nous avons obtenu la Gly<sup>8</sup>-oxytocine (X), l'Ala<sup>8</sup>-oxytocine (XXII) et la But<sup>8</sup>-oxytocine (XXXIX). Ces trois produits se sont montrés homogènes à la chromatographie sur papier et à l'électrophorèse à haut voltage sur papier, dans diverses conditions, et ont fourni après hydrolyse les acides aminés constituants dans les proportions attendues. Les activités biologiques de ces trois 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.

Il ressort de ces valeurs que la Gly<sup>8</sup>-oxytocine possède les activités les plus faibles et que l'Ala<sup>8</sup>-oxytocine, qui ne se distingue de celle-ci que par la présence d'un groupe méthyle supplémentaire, atteint un degré d'activité sensiblement plus élevé. Il est même remarquable que les valeurs d'activités de ce dernier analogue soient proportionnellement plus proches de celles de l'oxytocine, qu'elles ne le sont de celles de la

Schéma 1. Synthèse de la Gly<sup>8</sup>-oxytocine

Abréviations: CBO- = carbobenzoxy-; Tos- = *p*-toluènesulfonyl- = tosyl-; Bz- = benzyl-; -NP = *p*-nitrophényle; -CP = trichloro-2,4,5-phényle.

Gly<sup>8</sup>-oxytocine. La But<sup>8</sup>-oxytocine est encore plus active que les deux précédents analogues. Il est intéressant de constater que la Gly<sup>8</sup>-oxytocine est même légèrement moins active que la D-Leu<sup>8</sup>-oxytocine [12].

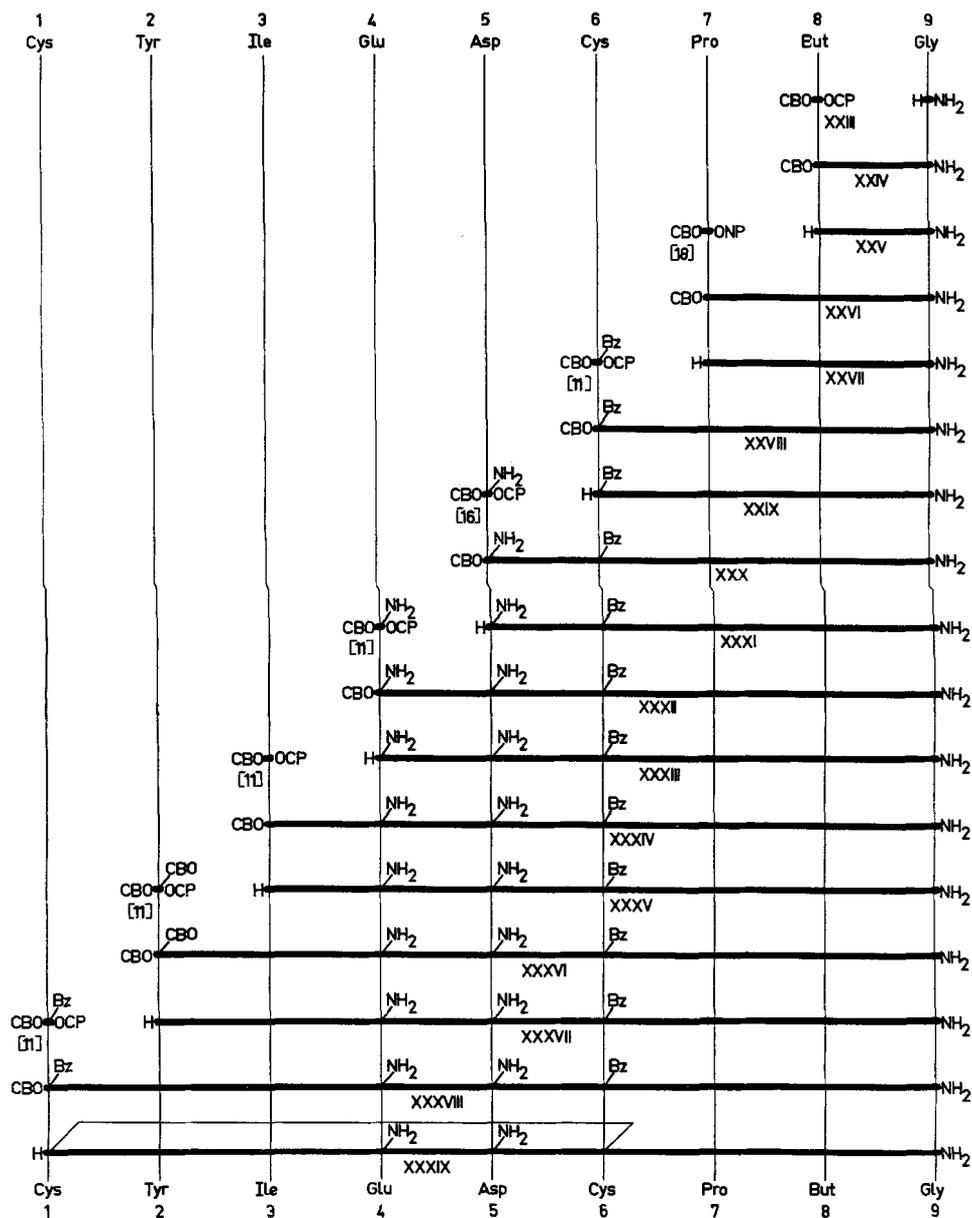
Il semble donc que la présence d'une chaîne aliphatique latérale en position 8 soit favorable à l'apparition des activités oxytociques.

### Partie expérimentale<sup>1)</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 chromatographies sur papier ont été effectuées selon la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040 lavé».  $R_{fM}$  dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:20);  $R_{fA}$  dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/eau (35:35:30);  $R_{fP}$  dans le mélange *n*-butanol/acide acétique/eau (70:10:20);  $R_f^\circ$  sans scission préalable;  $R_f^A$  après scission du groupe CBO- par séjour de 1 h à  $20^\circ$  dans une solution de HBr 2,5N dans l'acide acétique glacial. Les chromatographies en couche mince sont faites sur «Kieselgel G» sans scission préalable.

<sup>1)</sup> La partie expérimentale a été réalisée avec l'assistance technique de M. P. ERNST. Les microanalyses ont été effectuées dans notre laboratoire microanalytique (Dr. W. SCHOENIGER).



Schéma 3. Synthèse de la But<sup>8</sup>-oxytocine

Abréviations: voir Schéma 1.

tate d'éthyle jusqu'à ce qu'il devienne pulvérulent, filtre et sèche sous vide. On recristallise le produit obtenu (8,10 g; F. 136-140°) dans 40 ml d'éthanol bouillant, laisse séjourner une nuit à 0°, filtre et sèche au vide poussé. On obtient 5,50 g (61%) de N-CBO-L-prolyl-glycyl-glycinamide de F. 146°, très soluble dans l'eau.  $[\alpha]_D^{25} = -51^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; acide acétique à 95%);  $-63^\circ \pm 1^\circ$

Tableau des activités biologiques

Formules chimiques et désignations	Activités oxytociques en unités internationales par mg de base libre		Activités vasopressiques en unités internationales par mg de base libre	
	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
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Gly-Gly-NH <sub>2</sub> Gly <sup>8</sup> -oxytocine (X)	16 ± 1,5	7 ± 1,5	46 ± 7	0,6 ± 0,1
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Ala-Gly-NH <sub>2</sub> Ala <sup>8</sup> -oxytocine (XXII)	141 ± 17	135 ± 13	208 ± 8	11,6 ± 0,6
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-But-Gly-NH <sub>2</sub> But <sup>8</sup> -oxytocine (XXXIX)	—	440 ± 32	—	33 ± 2
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Val-Gly-NH <sub>2</sub> Val <sup>8</sup> -oxytocine [3]	200 ± 15	280 ± 17	310 ± 20	9 ± 1
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Ile-Gly-NH <sub>2</sub> Ile <sup>8</sup> -oxytocine [3]	289 ± 21	498 ± 37	328 ± 21	6,3 ± 0,8
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> Oxytocine	450 ± 30	450 ± 30	450 ± 30	5 ± 1
				1,1 ± 0,1
				0,8 ± 0,1
				5 ± 1

( $c = 1$ ; eau).  $E_{1,9}^a = 1,0$  Glu;  $E_{5,8}^a = 1,2$  His;  $Rf_A^a = 0,2$ ;  $Rf_M^a = 0,3$ ;  $Rf_P^a = 0,05$  (révélation par isatine, ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{17}H_{22}O_5N_4$	Calc. C 56,4	H 6,1	O 22,0	N 15,5%
(362,4)	Tr. „ 56,4	„ 6,5	„ 21,9	„ 15,6%

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycyl-glycinamide (III)*. On dissout 5,10 g (14 mmoles) de N-CBO-L-prolyl-glycyl-glycinamide (I) dans 20 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre et laisse reposer 1 h à 20°. Après quelques minutes déjà, le bromhydrate de L-prolyl-glycyl-glycinamide cristallise dans la solution. On ajoute de l'éther anhydre, filtre, lave plusieurs fois à l'éther anhydre et dissout le bromhydrate de tripeptide-amide ainsi obtenu dans 60 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution à travers une colonne de 70 ml d'Amberlite IRA 410 (cycle OH<sup>-</sup>), on lave encore la résine avec 200 ml de méthanol et évapore sous vide à 35°. On dissout le résidu (*tripeptide-amide libre, II*) dans 30 ml de diméthylformamide, ajoute 7,90 g (15 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de trichloro-2,4,5-phényle [11] et laisse reposer une nuit à température ordinaire. On évapore le diméthylformamide au vide poussé à 40°, redissout le résidu dans 50 ml d'acétate d'éthyle et laisse séjourner 5 h à 0°. On sépare par filtration les cristaux formés, lave avec peu d'acétate d'éthyle et sèche au vide poussé à 40°. On obtient 5,20 g (67%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycyl-glycinamide de F. 149°.  $[\alpha]_D^{23} = -36^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ ; diméthylformamide).  $E_{1,9}^a = 1,0$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,7$  Try;  $Rf_A^a = 0,60$ ;  $Rf_M^a = 0,64$  (révélation par ninhydrine, isatine et chlore; homogène).

$C_{27}H_{34}O_6N_5S$	Calc. C 58,3	H 6,2	O 17,2	N 12,6	S 5,8%
(556,7)	Tr. „ 58,3	„ 6,4	„ 17,4	„ 12,8	„ 5,9%

*N-CBO-L-Asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycyl-glycinamide (V)*. On dissout 3,60 g (6,5 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycyl-glycinamide (III) dans 35 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après 1 h à 20°, on évapore sous vide à 35°, triture le résidu avec de l'éther anhydre, filtre, lave sur le filtre avec plusieurs portions d'éther anhydre et redissout immédiatement le bromhydrate de tétrapeptide-amide dans 50 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution à travers une colonne de 40 ml d'Amberlite IRA 410 (cycle OH<sup>-</sup>), on lave la résine avec 150 ml de méthanol et évapore sous vide à 35°. On dissout le résidu (*tétrapeptide-amide libre, IV*) dans 7 ml de diméthylformamide et ajoute 3,10 g (7,0 mmoles) de N-CBO-L-asparaginate de trichloro-2,4,5-phényle [16]. Après une nuit, le pentapeptide-amide qui a précipité est suspendu dans l'acétate d'éthyle, séparé par filtration et séché sous vide. On redissout le produit obtenu (4,03 g) dans 50 ml de diméthylformamide en chauffant légèrement, précipite le pentapeptide-amide par adjonction de 150 ml d'acétate d'éthyle, filtre, lave à l'acétate d'éthyle et sèche au vide poussé. Après avoir répété cette purification une seconde fois, on obtient 3,40 g (78%) de N-CBO-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycyl-glycinamide de F. 216°.  $[\alpha]_D^{21} = -48^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ ; acide acétique 95%).  $E_{1,9}^a = 0,8$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,6$  His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{31}H_{39}O_8N_7S$	Calc. C 55,6	H 5,9	O 19,1	N 14,6	S 4,8%
(669,8)	Tr. „ 55,5	„ 6,4	„ 19,0	„ 14,8	„ 4,9%

*N-CBO-L-Glutaminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycyl-glycinamide (VII)*. On dissout 2,70 g (4,0 mmoles) de N-CBO-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycyl-glycinamide (V) dans 30 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après 90 min à 20°, on évapore sous vide à 35°, pulvérise le résidu avec de l'éther anhydre, filtre, lave sur le filtre avec plusieurs portions d'éther anhydre et redissout le bromhydrate du pentapeptide-amide dans 50 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution à travers une colonne de 30 ml d'Amberlite IRA 410 (cycle OH<sup>-</sup>), on lave la résine avec 150 ml de méthanol et évapore sous vide à 35°. On dissout le résidu (*pentapeptide-amide libre VI*) dans 8 ml de diméthylformamide et ajoute 1,93 g (4,2 mmoles) de N-CBO-L-glutamate de trichloro-2,4,5-phényle [11]. Après une nuit, l'hexapeptide-amide, qui a précipité, est suspendu dans 50 ml d'acétate d'éthyle, séparé par filtration, lavé à l'éthanol et séché sous vide. Afin de purifier le produit obtenu (2,74 g; F. 239°), on le suspend dans 20 ml d'éthanol bouillant, filtre à chaud et sèche au vide poussé. Après avoir répété deux fois cette purification, on obtient 2,25 g (70%) de N-CBO-L-glutaminyl-

L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycyl-glycinamide de F. 241–243°.  $[\alpha]_D^{23} = -53^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; acide acétique 95%);  $-35^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).  $E_{1,9}^a = 0,7$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,6$  His;  $Rf_A^a = 0,35$ ;  $Rf_M^a = 0,25$ ;  $Rf_P^a = 0,03$  (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{36}H_{47}O_{10}N_9S$	Calc.	C 54,2	H 5,9	O 20,1	N 15,8	S 4,0%
(797,9)	Tr.	,, 54,0	,, 6,1	,, 20,0	,, 15,7	,, 3,9%

*N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycyl-glycinamide (IX)*. On dissout 1,60 g (2,0 mmoles) de N-CBO-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycyl-glycinamide (VII) dans 20 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après 90 min à 20°, on évapore sous vide à 35°, pulvérise le résidu dans l'éther anhydre, filtre, lave à l'éther et redissout le bromhydrate de l'hexapeptide-amide dans 30 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution à travers une colonne de 20 ml d'Amberlite IRA 410 (cycle OH<sup>-</sup>), on lave la résine avec 100 ml de méthanol et évapore sous vide à 35°. On dissout le résidu (*hexapeptide-amide libre VIII*) dans 12 ml de diméthylformamide et ajoute 1,53 g (2,0 mmoles) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucine de *p*-nitrophényle [9]. Après 1 nuit, on précipite le nonapeptide-amide formé en ajoutant un excès d'acétate d'éthyle, filtre, lave au méthanol et sèche sous vide (2,22 g; 87%). On suspend le produit brut obtenu dans 25 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud et répète encore 2 fois cette purification. Après séchage sous vide poussé, on obtient 1,40 g (55%) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-glycyl-glycinamide de F. 262° (ramollissement à 250°).  $[\alpha]_D^{22} = -57^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; acide acétique 95%);  $-20^\circ \pm 1,5^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide). Chromatographie en couche mince dans le système *n*-butanol/acide acétique/eau (7:1:2) (révélation par iode; homogène).

$C_{60}H_{78}O_{14}N_{12}S_3$	Calc.	C 56,0	H 6,1	O 17,4	N 13,0	S 7,5%
(1287,5)	Tr.	,, 55,8	,, 6,2	,, 17,5	,, 12,8	,, 7,4%

*Gly<sup>8</sup>-oxytocine (X)*. On dissout 677 mg (0,525 mmole) de nonapeptide-amide protégé IX dans environ 300 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et, sous agitation, on ajoute lentement du sodium jusqu'à apparition d'une teinte bleue dans la solution. Après adjonction de 125 mg de NH<sub>4</sub>Cl, on évapore à sec sous vide, dissout le résidu dans 500 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,8 et oxyde en faisant passer un courant d'air dans la solution sous agitation jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. Après avoir acidifié cette solution au pH 4,5, on filtre sur Hyflo-Supercell puis concentre sous vide jusqu'à 100 ml, équilibre avec du butanol-2 de manière à obtenir 100 ml de chaque phase que l'on introduit dans les quatre premiers tubes d'un appareil automatique de contre-courant. Après 453 transferts dans le système butanol-2/eau/acide acétique (1000:1200:1), on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes [17]. On obtient un pic principal de  $K = 0,21$  et un pic secondaire de  $K = 0,15$ . Le contenu des tubes centraux du pic principal est réuni, concentré au vide et lyophilisé. Le produit obtenu, qui représente 47% de l'azote peptidique mis en réaction, est homogène à la chromatographie ( $Rf_A^o = 0,57$ ;  $Rf_M^o = 0,47$ ;  $Rf_P^o = 0,18$ ), à l'électrophorèse ( $E_{5,8}^o = 0,5$  His et 1,5 Try;  $E_{1,9}^o = 0,6$  Try) et dans une combinaison bidimensionnelle (électrophorèse à pH 1,9 suivie, après évaporation du tampon, d'une chromatographie ascendante perpendiculaire dans le système *n*-butanol/acide acétique/eau 7:1:2), après révélation par ninhydrine et chlore. L'hydrolyse acide (HCl 6N; 16 h à 110° en l'absence d'air) fournit les proportions attendues des acides aminés constituants. – *Activités biologiques*: se référer au tableau. Pouvoir rotatoire du lyophilisat:  $[\alpha]_D^{23} = -28^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,5$ ; eau). Pour l'analyse, un échantillon est séché 2 h à 100°.

$C_{39}H_{68}O_{12}N_{12}S_2 + 2H_2O$	Calc.	C 47,5	H 6,3	O 22,7	N 17,0	S 6,5%
(951,1 + 36,0)	Tr.	,, 47,6	,, 6,3	,, 23,1	,, 17,5	,, 6,4%

### b) Synthèse de l'Ala<sup>8</sup>-oxytocine

*N-CBO-L-Alanyl-glycinamide (XI)*. On dissout 1,21 g (11 mmoles) de chlorhydrate de glycine dans 20 ml de méthanol à 90% et fait passer cette solution sur de l'Amberlite IRA-410 (cycle OH<sup>-</sup>) jusqu'à disparition des ions Cl<sup>-</sup>, lave l'Amberlite au méthanol à 90% et évapore sous vide à 30°. Après avoir dissous le résidu dans 4 ml de diméthylformamide, on ajoute 4,03 g (10 mmoles) de N-CBO-L-alanine de trichloro-2,4,5-phényle [11] et laisse reposer à température

ordinaire. Après une nuit, on évapore sous vide et ajoute de l'éther anhydre au résidu sirupeux. On filtre la masse cristalline obtenue et sèche au vide. On obtient 2,61 g (94%) de N-CBO-L-alanyl-glycinamide de F. 119–121°.  $[\alpha]_D^{25} = +4,8 \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ ; diméthylformamide);  $-7,5 \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ ; méthanol).  $E_{1,9}^a = 0,8$  His;  $E_{5,8}^a = 1,5$  His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{13}H_{17}O_4N_3$	Calc.	C 55,9	H 6,1	O 22,9	N 15,1%
(279,3)	Tr.	,, 55,9	,, 6,1	,, 22,9	,, 15,2%

*N-CBO-L-Prolyl-L-alanyl-glycinamide (XIII)*. On dissout 2,23 g (8 mmoles) de N-CBO-L-alanyl-glycinamide (XI) dans 150 ml de méthanol avec 10 ml d'acide acétique glacial et hydrogène en présence de palladium à 10% sur charbon actif. Après 1 h l'hydrogénation est totale; on filtre, évapore le filtrat sous vide, dissout le résidu (*dipeptide-amide acétate XII*) dans 5 ml de diméthylformamide, ajoute 2,96 g (8 mmoles) de N-CBO-L-prolinate de *p*-nitrophényle [18] et laisse reposer à température ordinaire. Après une nuit, on concentre sous vide, ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle, triture, filtre et sèche au vide (2,2 g; 73%). Pour purifier le tripeptide-amide brut, on le suspend dans de l'éthanol bouillant, laisse refroidir, filtre, lave sur le filtre avec un peu d'éthanol froid et sèche au vide. On obtient 1,86 g (62%) de N-CBO-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide de F. 191–192°.  $[\alpha]_D^{25} = -90 \pm 2,5^\circ$  ( $c = 1,2$ ; eau). [Littérature [19]: F. 191–192°;  $[\alpha]_D^{30} = -95^\circ$  ( $c = 1,2$ ; eau)].  $Rf_A^a = 0,4$ ;  $Rf_M^a = 0,3$ ;  $Rf_P^a = 0,2$ ;  $E_{1,9}^a = 1,0$  Glu;  $E_{5,8}^a = 1,2$  His (révélation par isatine, ninhydrine et chlore; homogène). Chromatographie en couche mince dans le système méthanol/chloroforme (1:9) (révélation par l'iode et la ninhydrine; homogène).

$C_{18}H_{24}O_5N_4$	Calc.	C 57,4	H 6,4	O 21,2	N 14,9%
(376,4)	Tr.	,, 57,7	,, 6,6	,, 21,2	,, 14,7%

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide (XV)*. On dissout en chauffant légèrement 1,58 g (4,2 mmoles) de N-CBO-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide (XIII) dans 100 ml de méthanol et hydrogène en présence de palladium à 10% sur charbon actif. Après 3 h l'hydrogénation est totale, on sépare le catalyseur par filtration et évapore le filtrat sous vide. On dissout le résidu (*tripeptide-amide libre, XIV*) dans 8 ml de diméthylformamide, ajoute 2,30 g (4,3 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de trichloro-2,4,5-phényle [11] et laisse reposer à température ordinaire. Après une nuit, on concentre sous vide, ajoute 100 ml d'éther, triture, décante l'éther, dissout le résidu dans 12 ml d'acétate d'éthyle et laisse reposer à 4°. On sépare par filtration la masse cristalline formée, lave avec un peu d'acétate d'éthyle froid et sèche sous vide (1,85 g; 77%). On recristallise le tétrapeptide-amide brut dans 15 ml d'éthanol absolu bouillant, laisse reposer à 4°, filtre et sèche sous vide à 50°. On obtient 1,44 g (60%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide de F. 144°.  $[\alpha]_D^{25} = -46,5 \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ ; diméthylformamide);  $-86^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ ; acide acétique 95%).  $Rf_A^a = 0,70$ ;  $Rf_M^a = 0,75$ ;  $E_{1,9}^a = 0,9$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,7$  His (révélation par ninhydrine, isatine et chlore; homogène).

$C_{28}H_{35}O_6N_5S$	Calc.	C 59,0	H 6,2	O 16,9	N 12,3	S 5,6%
(569,7)	Tr.	,, 59,0	,, 6,4	,, 16,9	,, 12,5	,, 5,7%

*N-CBO-L-Asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide (XVII)*. On dissout 1,31 g (2,3 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide (XV) dans 15 ml d'une solution 2,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après 1 h à 20°, on évapore sous vide à 35°, triture le résidu à l'éther anhydre, filtre et redissout le bromhydrate de tétrapeptide-amide dans 15 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution à travers une colonne de 15 ml d'Amberlite IRA 410 (cycle OH<sup>-</sup>), on lave la résine au méthanol et évapore sous vide à 35°. On dissout le résidu (*tétrapeptide-amide libre, XVI*) dans 4 ml de diméthylformamide et ajoute 1,11 g (2,5 mmoles) de N-CBO-L-asparaginate de trichloro-2,4,5-phényle [16]. Après une nuit, le pentapeptide-amide qui a précipité est suspendu dans l'acétate d'éthyle, séparé par filtration et séché sous vide. On suspend le produit obtenu (1,30 g; F. 239°) dans 20 ml d'éthanol bouillant, filtre et sèche au vide poussé. Après cette purification, on obtient 1,16 g (74%) de N-CBO-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide de F. 239°.  $[\alpha]_D^{25} = 75 \pm 1,5^\circ$  ( $c = 1$ ; acide acétique 95%);  $-43^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).  $Rf_A^a = 0,6$ ;  $Rf_M^a = 0,6$ ;  $E_{5,8}^a = 0,7$  His;  $E_{1,9}^a = 0,8$  Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{32}H_{41}O_8N_7S$	Calc.	C 56,2	H 6,0	O 18,7	N 14,3	S 4,7%
(683,8)	Tr.	,, 56,2	,, 6,3	,, 18,6	,, 14,6	,, 4,7%

*N-CBO-L-Glutaminyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide (XIX)*. On dissout 1,02 g (1,50 mmole) de N-CBO-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide (XVII) dans 10 ml d'une solution 2,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après 1 h à 20°, on évapore sous vide à 35°, triture à l'éther anhydre, filtre et redissout le bromhydrate de pentapeptide-amide dans 15 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution à travers une colonne de 15 ml d'Amberlite IRA 410 (cycle OH<sup>-</sup>), on lave avec 50 ml de méthanol et évapore à sec. On dissout le résidu (*pentapeptide-amide libre, XVIII*) dans 7 ml de diméthylformamide et ajoute 0,72 g (1,56 mmole) de N-CBO-L-glutamate de trichloro-2,4,5-phényle [11]. Après une nuit, on précipite l'hexapeptide-amide formé avec un excès d'acétate d'éthyle, sépare par filtration, sèche sous vide, et purifie en suspendant dans 10 ml d'éthanol bouillant. Après filtration à chaud et séchage au vide poussé, on obtient 0,82 g (67%) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide de F. 224°.  $[\alpha]_D^{25} = -74^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; acide acétique 95%);  $-39^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).  $Rf_A^a = 0,5$ ;  $Rf_M^a = 0,4$ ;  $E_{1,9}^a = 0,9$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,7$  His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{37}H_{49}O_{10}N_9S$	Calc. C 54,7	H 6,1	O 19,7	N 15,5	S 4,0%
(811,9)	Tr. „	54,5	„ 6,4	„ 19,1	„ 15,2
					„ 4,0%

*N-Tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide (XXI)*. On dissout 0,65 g (0,8 mmole) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide (XIX) dans 10 ml d'une solution 2,5 N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après 1 h à 20°, on évapore sous vide à 35°, triture le résidu dans l'éther anhydre, filtre et redissout le bromhydrate d'hexapeptide-amide dans 15 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution à travers une colonne de 10 ml d'Amberlite IRA 410 (cycle OH<sup>-</sup>), on lave la résine avec 50 ml de méthanol et évapore sous vide à 35°. On dissout le résidu (*hexapeptide-amide libre, XX*) dans 7 ml de diméthylformamide et ajoute 0,61 g (0,8 mmole) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de *p*-nitro-phényle [9]. Après une nuit, on précipite le nonapeptide-amide formé en ajoutant un excès d'acétate d'éthyle, filtre et sèche sous vide. On suspend le produit brut obtenu dans 10 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud et répète encore deux fois cette purification. Après séchage sous vide poussé, on obtient 0,65 g (62%) de N-tosyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-alanyl-glycinamide de F. environ 265°.  $[\alpha]_D^{25} = -69^\circ \pm 1,5^\circ$  ( $c = 1$ ; acide acétique 95%);  $-23^\circ \pm 1,5^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide). Chromatographie en couche mince dans le système *n*-butanol/acide acétique/eau (7:1:2) (révélation par iode; homogène).

$C_{61}H_{80}O_{14}N_{12}S_3$	Calc. C 56,3	H 6,2	O 17,2	N 12,9	S 7,4%
(1301,6)	Tr. „	56,1	„ 6,5	„ 17,1	„ 12,6
					„ 7,4%

*Ala<sup>8</sup>-oxytocine (XXII)*. On dissout 135 mg (0,104 mmole) de nonapeptide protégé XXI dans environ 80 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute lentement du sodium jusqu'à apparition d'une teinte bleue dans la solution. Après adjonction de 25 mg de NH<sub>4</sub>Cl, on évapore à sec sous vide, dissout le résidu dans 100 ml d'acide acétique 0,01 N, ajuste le pH à 8,8 et oxyde en faisant passer un courant d'air dans la solution sous agitation, jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. Après avoir acidifié cette solution au pH 4,5, on filtre sur Hyflo-Supercell puis concentre sous vide jusqu'à 50 ml, équilibre avec du butanol-2 de manière à obtenir 50 ml de chaque phase, que l'on introduit dans les deux premiers tubes d'un appareil automatique de contre-courant. Après 250 transferts dans le système butanol-2/eau/acide acétique (1000:1200:1), on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes [17]. On obtient un pic principal de  $K = 0,18$ . Le contenu des tubes centraux de ce pic est réuni, concentré sous vide et lyophilisé. Le produit obtenu qui représente 44% de l'azote peptidique mis en réaction, est homogène à la chromatographie ( $Rf_A^o = 0,56$ ;  $Rf_M^o = 0,46$ ;  $Rf_P^o = 0,1$ ), à l'électrophorèse ( $E_{1,9}^o = 0,7$  Try;  $E_{5,8}^o = 0,5$  His et 1,6 Try) et dans une combinaison bidimensionnelle (électrophorèse à pH 1,9 suivie après évaporation du tampon, d'une chromatographie ascendante perpendiculaire dans le système *n*-butanol/acide acétique/eau 7:1:2) après révélation par ninhydrine et chlore. L'hydrolyse acide (HCl 6 N; 16 h à 110° en l'absence d'air) fournit les proportions attendues des acides aminés constituants.

*Activités biologiques*: se référer au tableau.

c) Synthèse de la But<sup>9</sup>-oxytocine

*N-CBO-L- $\alpha$ -Aminobutyrate de trichloro-2,4,5-phényle (XXIII)*. On dissout 9,00 g (38 mmoles) d'acide *N-CBO-L- $\alpha$ -aminobutyrique* [20] avec 8,30 g (42 mmoles) de trichloro-2,4,5-phénol dans 130 ml d'acétate d'éthyle, refroidit à  $-10^\circ$ , ajoute 7,85 g (38 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et laisse réagir 30 min à  $-10^\circ$ , puis 3 h à température ordinaire. Après avoir séparé par filtration la dicyclohexylurée formée pendant la réaction, on évapore le filtrat à sec, redissout le résidu dans 20 ml d'éthanol absolu et laisse reposer 48 h à  $0^\circ$ . Les cristaux formés sont séparés par filtration, lavés sur le filtre avec un peu d'éthanol froid et séchés au vide poussé. On obtient 13,50 g (85%) de *N-CBO-L- $\alpha$ -aminobutyrate de trichloro-2,4,5-phényle* de F.  $99^\circ$ .  $[\alpha]_D^{25} = -33^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ ; acide acétique 95%);  $-19^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ ; diméthylformamide). Chromatographie en couche mince dans les systèmes méthanol/chloroforme (1:9) et benzène/acétone (2:1), (révélation par l'iode; homogène).

$C_{18}H_{16}O_4NCl_3$ (416,8)	Calc. C 51,9	H 3,9	O 15,4	N 3,4	Cl 25,5%
	Tr. ,, 52,0	,, 4,0	,, 15,6	,, 3,2	,, 25,4%

*N-CBO-L- $\alpha$ -Aminobutyryl-glycinamide (XXIV)*. On dissout 3,85 g (35 mmoles) de chlorhydrate de glycinamide dans 75 ml de méthanol à 90% et fait passer cette solution sur de l'Amberlite IRA 410 (cycle  $OH^-$ ) jusqu'à disparition des ions  $Cl^-$ , lave la résine avec 150 ml de méthanol à 90% et évapore sous vide à  $30^\circ$ . Après avoir dissous le résidu dans 20 ml de diméthylformamide, on ajoute 13,70 g (33 mmoles) de *N-CBO-L- $\alpha$ -aminobutyrate de trichloro-2,4,5-phényle* (XXIII) et laisse reposer à température ordinaire. Après une nuit, on évapore sous vide, pulvérise le résidu dans 100 ml d'éther anhydre, filtre et sèche sous vide. On dissout le dipeptide-amide brut obtenu (9,4 g; 98%) dans 30 ml d'éthanol bouillant, ajoute 60 ml d'éther, laisse reposer quelques heures à  $0^\circ$ , sépare les cristaux formés par filtration, lave avec un mélange éthanol/éther (1:2) et sèche au vide poussé. On obtient 7,90 g (82%) de *N-CBO-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide* de F.  $149^\circ$ .  $[\alpha]_D^{21} = +4,4^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2$ ; diméthylformamide);  $-7^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ ; acide acétique 95%).  $E_{1,9}^a = 1,2$  Glu;  $E_{5,8}^a = 1,2$  His;  $Rf_A^a = 0,45$ ;  $Rf_M^a = 0,35$  (révélation par ninhydrine et chlore; homogène). Chromatographie en couche mince dans les systèmes benzène/acétone (2:1); *n*-butanol/acide acétique/eau (7:1:2) et méthanol (révélation par l'iode; homogène).

$C_{14}H_{19}O_4N_3$ (293,3)	C 57,3	H 6,5	O 21,8	N 14,3%
	Tr. ,, 57,5	,, 6,6	,, 21,8	,, 14,3%

*N-CBO-L-Prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXVI)*. On dissout 7,35 g (25 mmoles) de *N-CBO-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide* (XXIV) dans 250 ml de méthanol avec 1,5 ml d'acide acétique anhydre (25 mmoles) et hydrogène en présence de 2 g de palladium à 10% sur charbon actif. Après 2 h l'hydrogénation est totale, on filtre, évapore le filtrat sous vide, dissout le résidu (acétate de dipeptide-amide, XXV) dans 25 ml de diméthylformamide avec 10,00 g (27 mmoles) de *N-CBO-L-prolinate de p-nitrophényle* [18]. Après une nuit à  $40^\circ$ , on évapore sous vide, dissout le résidu dans 200 ml de chloroforme, extrait le chloroforme avec 2 fois 50 ml d'HCl 1N, contre-extrait la phase aqueuse, saturée par du NaCl, avec plusieurs portions de chloroforme et évapore les solutions chloroformiques sous vide. Après pulvérisation dans l'éther et séchage sous vide, on recrystallise le tripeptide-amide brut ainsi obtenu (6,05 g; 62%) dans 30 ml d'éthanol bouillant, laisse reposer à  $0^\circ$ , sépare par filtration les cristaux formés, lave sur le filtre avec un peu d'éthanol glacé et sèche au vide poussé. On obtient 4,95 g (51%) de *N-CBO-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide* de F.  $177^\circ$  (ramollissement à  $170^\circ$ ).  $[\alpha]_D^{20} = -80^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ ; acide acétique 95%);  $-41^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2$ ; diméthylformamide).  $E_{1,9}^a = 1,0$  Glu;  $E_{5,8}^a = 1,1$  His;  $Rf_A^a = 0,5$ ;  $Rf_M^a = 0,4$ ;  $Rf_P^a = 0,2$  (révélation par isatine, ninhydrine et chlore; homogène). Chromatographie en couche mince dans les systèmes méthanol/chloroforme (1:9) et *n*-butanol/acide acétique/eau (7:1:2) (révélation par l'iode; homogène).

$C_{18}H_{26}O_5N_4$ (390,4)	Calc. C 58,5	H 6,7	O 20,5	N 14,4%
	Tr. ,, 58,4	,, 6,8	,, 20,5	,, 14,5%

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXVIII)*. On dissout 3,90 g (10 mmoles) de *N-CBO-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide* (XXVI) dans 150 ml de méthanol et hydrogène en présence de 1 g de palladium à 10% sur charbon actif. Après 1 h l'hydrogénation est totale; on filtre, évapore le filtrat sous vide, dissout le résidu (*tripeptide-amide libre*,

XXVII) dans 10 ml de diméthylformamide avec 5,25 g (10 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de trichloro-2,4,5-phényle [11]. Après une nuit, on évapore sous vide, triture à l'éther anhydre, décante, dissout le résidu dans 40 ml d'acétate d'éthyle bouillant et laisse reposer à 0°. On sépare par filtration les cristaux formés, lave avec peu d'acétate d'éthyle froid et sèche au vide poussé. On obtient 4,60 g (79%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide de F. 143–144°.  $[\alpha]_D^{25} = -83,5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ ; acide acétique 95%).  $E_{1,9}^a = 0,9$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,7$  His;  $Rf_M^a = 0,7$ .

$C_{26}H_{37}O_6N_5S$ (583,7)	Calc. C 59,7	H 6,4	O 16,5	N 12,0	S 5,5%
	Tr. ,, 59,7	,, 6,4	,, 16,5	,, 12,3	,, 5,5%

N-CBO-L-Asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXX). On dissout 2,90 g (5,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXVIII) dans 30 ml d'une solution 2,5N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre. Après 1 h à 20°, on évapore sous vide, triture le résidu à l'éther anhydre, filtre et redissout le bromhydrate du tétrapeptide-amide dans 50 ml de méthanol. Après avoir fait passer cette solution à travers une colonne de 40 ml d'Amberlite IRA 410 (cycle OH<sup>-</sup>), on lave la résine avec 150 ml de méthanol et évapore sous vide à 35°. On dissout le résidu (*tétrapeptide-amide libre*, XXX) dans 10 ml de diméthylformamide et ajoute 2,45 g (5,5 mmoles) de N-CBO-L-asparaginate de trichloro-2,4,5-phényle [16]. Après une nuit, le pentapeptide-amide qui a précipité est suspendu dans l'acétate d'éthyle, séparé par filtration et séché au vide poussé. On obtient 3,20 g (92%) de N-CBO-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide de F. 222°.  $[\alpha]_D^{25} = -77^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; acide acétique 95%);  $-50^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).  $E_{1,9}^a = 0,8$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,6$  His;  $Rf_M^a = 0,6$  (révélation par ninhydrine et chlore; homogène). Chromatographie en couche mince dans le système *n*-butanol/acide acétique/eau (7:1:2) (révélation par l'iode; homogène).

$C_{33}H_{45}O_8N_7S$ (697,8)	Calc. C 56,8	H 6,2	O 18,3	N 14,0	S 4,6%
	Tr. ,, 56,9	,, 6,5	,, 18,3	,, 13,9	,, 4,7%

N-CBO-L-Glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXXI). On scinde 2,75 g (4,0 mmoles) de N-CBO-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXX), fait réagir le *pentapeptide-amide libre* XXXI ainsi obtenu avec 1,98 g (4,3 mmoles) de N-CBO-L-glutamate de trichloro-2,4,5-phényle [11], comme décrit sous XXX. On obtient 3,00 g (91%) de N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide de F. environ 250° (ramollissement à 198°).  $[\alpha]_D^{25} = -52^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide);  $-78^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; acide acétique 95%).  $E_{1,9}^a = 0,8$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,6$  His;  $Rf_A^a = 0,5$ ;  $Rf_M^a = 0,4$  (révélation par ninhydrine et chlore; homogène). Chromatographie en couche mince dans le système *n*-butanol/acide acétique/eau (7:1:2) (révélation à l'iode; homogène).

$C_{38}H_{51}O_{10}N_9S$ (825,9)	Calc. C 55,2	H 6,2	O 19,4	N 15,3	S 3,9%
	Tr. ,, 54,8	,, 6,4	,, 19,6	,, 15,3	,, 3,9%

N-CBO-L-Isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXXIV). On scinde 2,80 g (3,4 mmoles) de N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXXII), fait réagir l'*hexapeptide-amide libre* XXXIII ainsi obtenu avec 1,70 g (3,8 mmoles) de N-CBO-L-isoleucinate de trichloro-2,4,5-phényle [11], comme décrit sous XXX. On purifie l'heptapeptide-amide en le suspendant dans du méthanol bouillant, filtre et sèche au vide poussé. On obtient 2,40 g (75%) de N-CBO-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide de F. 242°.  $[\alpha]_D^{25} = -79^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,5$ ; acide acétique 95%);  $-50^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).  $E_{1,9}^a = 0,8$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,6$  His. Chromatographie en couche mince dans le système *n*-butanol/acide acétique/eau (7:1:2) (révélation à l'iode; homogène).

$C_{44}H_{62}O_{11}N_{10}S$ (939,1)	Calc. C 56,3	H 6,7	O 18,7	N 14,9	S 3,4%
	Tr. ,, 55,7	,, 6,9	,, 18,7	,, 15,5	,, 3,5%

N,O-Di-CBO-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXXVI). On scinde 2,15 g (2,3 mmoles) de N-CBO-L-isoleucyl-L-

glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXXIV), fait réagir l'*heptapeptide-amide libre XXXV* ainsi obtenu avec 1,57 g (2,5 mmoles) de N, O-di-CBO-L-tyrosinate de trichloro-2, 4, 5-phényle [11], comme décrit sous XXX, suspend l'octapeptide-amide dans du méthanol bouillant, filtre et sèche au vide poussé. On obtient 2,10 g (74%) de N, O-di-CBO-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide de F. 248°.  $[\alpha]_D^{25} = -59^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; acide acétique 95%);  $-35^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).  $E_{1,9}^a = 0,8$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,5$  His.

$C_{61}H_{77}O_{15}N_{11}S$	Calc.	C 59,2	H 6,3	O 19,4	N 12,5	S 2,6%
(1236,4)	Tr.	., 58,9	., 6,7	., 19,6	., 12,3	., 2,7%

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyL-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXXVIII)*. On scinde 1,98 g (1,6 mmole) de N, O-diCBO-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide (XXXVI), fait réagir l'*octapeptide-amide libre XXXVII* ainsi obtenu avec 0,95 g (1,8 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinate de trichloro-2, 4, 5-phényle [11], comme décrit sous XXX. On suspend le nonapeptide-amide brut dans du méthanol bouillant, filtre à chaud, répète deux fois cette purification et sèche au vide poussé. On obtient 1,28 g (62%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyl-L- $\alpha$ -aminobutyryl-glycinamide de F. 255–256°.  $[\alpha]_D = -68^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; acide acétique 95%);  $-48^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ ; diméthylformamide).  $E_{1,9}^a = 0,45$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,0$  Try. Chromatographie en couche mince dans les systèmes acide acétique glacial et *n*-butanol/acide acétique/eau (7:1:2) (révélation par l'iode; homogène).

$C_{63}H_{82}O_{14}N_{12}S_2$	Calc.	C 58,4	H 6,4	O 17,3	N 13,0	S 4,9%
(1295,5)	Tr.	., 58,2	., 6,7	., 17,6	., 12,8	., 4,9%

*But<sup>8</sup>-oxytocine (XXXIX)*. On dissout 663 mg (0,510 mmole) de nonapeptide protégé XXXVIII dans environ 300 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute lentement du sodium jusqu'à apparition d'une teinte bleue dans la solution. Après adjonction de 125 mg de  $NH_4Cl$ , on évapore à sec sous vide, dissout le résidu dans 500 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,8 et oxyde en faisant passer un courant d'air dans la solution sous agitation jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. Après acidification à pH 4,5, on filtre cette solution sur Hyflo-Supercell puis concentre sous vide jusqu'à 100 ml, adsorbe le peptide sur une colonne de 50 ml d'Amberlite IRC-50 (XE 64) (cycle acide) et, après lavage par l'acide acétique 1% pour éliminer les sels présents [21], élue la substance par l'acide acétique 50%. On évapore l'acide acétique sous vide, et le produit obtenu est soumis à une distribution en contre-courant dans le système butanol-2/eau/acide acétique (1000:1200:1). Après 215 transferts, on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes [17]. On obtient un pic principal de  $K = 0,22$  et un pic secondaire de  $K = 0,10$ . Le contenu des tubes centraux du pic principal est réuni, concentré au vide et lyophilisé. Le produit obtenu, qui représente 40% de l'azote peptidique de départ, est homogène à la chromatographie sur papier ( $Rf_A^o = 0,58$ ;  $Rf_M^o = 0,42$ ;  $Rf_P^o = 0,14$ ), à la chromatographie en couche mince sur Kieselgel G (dans *n*-butanol/acide acétique/eau 7:1:2) et à l'électrophorèse ( $E_{1,9}^o = 0,65$  Try;  $E_{5,8}^o = 1,6$  Try) après révélation par ninhydrine et chlore. L'hydrolyse acide (HCl 6N; 16 h à 110° en l'absence d'air) fournit les proportions attendues des acides aminés constituants. - *Activités biologiques*: se référer au tableau. Pouvoir rotatoire du lyophilisat:  $[\alpha]_D^{25} = -53^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 0,5$ ; eau). Pour l'analyse, un échantillon est séché au vide poussé 16 h à 100°.

$C_{41}H_{62}O_{12}N_{12}S_2 + CH_3COOH + H_2O$	Calc.	C 48,9	H 6,5	O 22,7	N 15,9	S 6,0%
(979,2 + 60,0 + 18,0)	Tr.	., 49,3	., 6,9	., 22,6	., 15,3	., 5,9%

#### SUMMARY

Gly<sup>8</sup>-oxytocin and Ala<sup>8</sup>-oxytocin have been synthesized according to the 3+6 scheme, and But<sup>8</sup>-oxytocin to the full recurring scheme, active esters having been used almost throughout for the formation of peptide bonds. The comparison of their biological activities with those of oxytocin, Val<sup>8</sup>-oxytocin and Ile<sup>8</sup>-oxytocin, shows that omission of the aliphatic side chain of the amino-acid in position 8 strongly de-

presses the activities. Nevertheless an ethyl group (But<sup>8</sup>-oxytocin) and even a methyl group (Ala<sup>8</sup>-oxytocin) are sufficient to confer to the molecule a high degree of activity.

Laboratoires de chimie pharmaceutique  
SANDOZ S. A., Bâle

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, B. BERDE & H. KONZETT, *Experientia* **17**, 377 (1961).
- [2] B. BERDE & R. A. BOISSONNAS, dans: *Pituitary Gland* **3**, p. 624 (Ed.: G. W. HARRIS, Butterworths, London 1965).
- [3] P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **44**, 113 (1961).
- [4] R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, résultats non publiés cités dans [2].
- [5] M. BODANSZKY & C. A. BIRKHIMER, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 1258 (1962).
- [6] P. G. KATSOYANNIS & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **233**, 1352 (1958); R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **45**, 1629 (1962); B. BERDE, R. L. HUGUENIN & E. STÜRMER, *Experientia* **18**, 444 (1962).
- [7] R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, *Helv.* **43**, 182 (1960); R. D. KIMBROUGH & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **236**, 778 (1961); R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **45**, 1629, note 8 (1962).
- [8] R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **46**, 1669 (1963); B. BERDE, R. A. BOISSONNAS, R. L. HUGUENIN & E. STÜRMER, *Experientia* **20**, 42 (1964).
- [9] P.-A., JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **45**, 1462 (1962).
- [10] I. PHOTAKI & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 908 (1965).
- [11] J. PLESS & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **46**, 1609 (1963).
- [12] C. H. SCHNEIDER & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 3005 (1962).
- [13] TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* **67**, 257 (1955).
- [14] ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **43**, 200 (1960).
- [15] M. A. ONDETTI, *J. med. Chemistry* **6**, 10 (1963).
- [16] R. L. HUGUENIN, *Helv.* **47**, 1934 (1964).
- [17] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 (1951).
- [18] M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 5688 (1959).
- [19] K. HEYNS & G. LEGLER, *Z. physiol. Chem.* **321**, 161 (1961).
- [20] S. G. WALEY, *Biochem. J.* **68**, 189 (1958); K. HOFMANN, J. ROSENTHALER, R. D. WELLS & H. YAJIMA, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 4991 (1964); V. DU VIGNEAUD, G. S. DENNING, S. DRABAREK & W. Y. CHAN, *J. biol. Chemistry* **239**, 472 (1964).
- [21] H. B. F. DIXON, *Biochim. biophysica Acta* **34**, 251 (1959).

## 204. Sennosid C, ein neues Glucosid aus *Cassia angustifolia* (Senna)

9. Mitteilung über Anthraglykoside [1] [2]

von **W. Schmid** und **E. Angliker**

(2. X. 65)

*1. Einleitung.* Die Hauptwirkstoffe der Sennesblätter und -schoten (*Cassia angustifolia* VAHL und *Cassia acutifolia* DELILE), die Sennoside A und B, sind von STOLL und Mitarbeitern [2–4] aufgefunden und aufgeklärt worden. In einem Vortrag von B. BECKER, gehalten an der Tagung der deutschen Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung in Münster [2], sind die Ergebnisse der Senna-Forschung bis 1958 zusammengefasst. Darin wurden auch die neueren Arbeiten von FAIRBAIRN diskutiert.