

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 49. Mitteilung: W. KELLER-SCHIERLEIN, P. MERTENS, V. PRELOG & A. WALSER, *Helv.* **48**, 710 (1965).
- [2] W. KELLER-SCHIERLEIN & G. RONCARI, *Helv.* **47**, 78 (1964); E. GÄUMANN, R. HÜTTER, W. KELLER-SCHIERLEIN, L. NEIPP, V. PRELOG & H. ZÄHNER, *Helv.* **43**, 601 (1960).
- [3] W. KELLER-SCHIERLEIN & G. RONCARI, *Helv.* **45**, 138 (1962).
- [4] W. HOFHEINZ, H. GRISEBACH & H. FRIEBOLIN, *Tetrahedron* **18**, 1265 (1962).
- [5] F. KORTE, U. CLAUSSEN & K. GÖHRING, *Tetrahedron* **18**, 1257 (1962).
- [6] D. M. LEMAL, P. D. PACHT & R. B. WOODWARD, *Tetrahedron* **18**, 1275 (1962).
- [7] H. WEBER, Diss. ETH Zürich, Nr. 3591 (1965). Vgl. auch P. A. VON DER MÜHLL, G. SETTIMI, H. WEBER & D. ARIGONI *Chimia* **19**, 595 (1965).
- [8] H. A. BARKER in M. J. COON, *Biochemical Preparations* **9**, 25 (1962).
- [9] M. EBERLE & D. ARIGONI, *Helv.* **43**, 1508 (1960).
- [10] R. KUHN, H. EGGE, R. BROSSMER, A. GAUHE, P. KLESSE, W. LOCHINGER, E. RÖHM, H. TRISCHMANN & D. TSCHAMPEL, *Angew. Chem.* **72**, 805 (1960).

**82. Synthèse de la désamino¹-Orn⁸-vasopressine,
de la désamino¹-Phe²-Orn⁸-vasopressine, de la désamino¹-Ile³-Orn⁸-vaso-
pressine (= désamino¹-Orn⁸-oxytocine)
et de la désamino¹-Phe²-Ile³-Orn⁸-vasopressine
(= désamino¹-Phe²-Orn⁸-oxytocine)**

par **R. L. Huguenin**

(29 XI 65)

Les vasopressines se distinguent de l'oxytocine principalement par la présence, en position 8, d'un acide aminé comportant à l'extrémité de sa chaîne latérale un groupe basique, cet acide aminé étant la lysine dans le cas de la vasopressine de Porc et d'Hipopotame, et l'arginine chez les autres mammifères étudiés. La présence de ce groupe basique (un groupe guanidino en position δ dans le cas de l'arginine, et un groupe amino en position ϵ dans celui de la lysine) joue un rôle important dans la manifestation des activités vasopressiques (activité antidiurétique et activité pressorique) car, en son absence, ces activités sont fortement réduites.

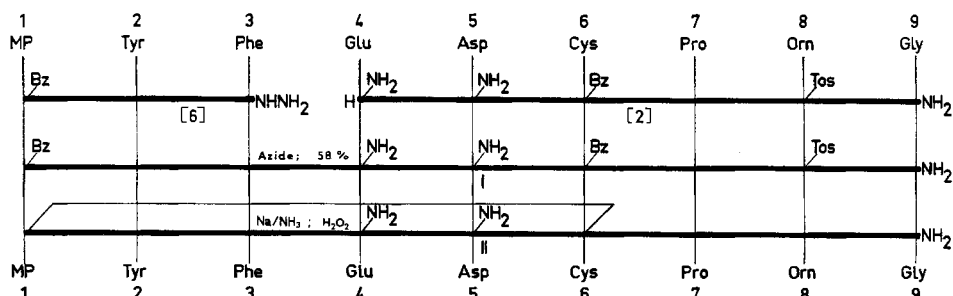
Le remplacement de l'arginine ou de la lysine par un autre acide aminé basique, l'ornithine (comportant un groupe δ -amino, lui aussi à l'extrémité de la chaîne latérale), avait conduit à un analogue, l'Orn⁸-vasopressine [1], doué d'une activité pressorique presque égale à celle de l'arginine-vasopressine, mais d'une activité antidiurétique quatre fois plus faible, ce qui lui conférait une certaine sélectivité en faveur de l'activité pressorique. Cette sélectivité se trouva encore renforcée par remplacement, dans l'Orn⁸-vasopressine, de la tyrosine en position 2 par la phénylalanine (Phe²-Orn⁸-vasopressine [2]), ou de la phénylalanine en position 3 par l'isoleucine (Ile³-Orn⁸-vasopressine = Orn⁸-oxytocine [1]), ou encore de la séquence Tyr-Phe (2-3) par la séquence Phe-Ile (Phe²-Ile³-Orn⁸-vasopressine = Phe²-Orn⁸-oxytocine [2]), l'activité pressorique subissant elle-même cependant une certaine diminution.

La suppression du groupe amino N-terminal dans les molécules d'oxytocine [3], de lysine-vasopressine [4] et d'arginine-vasopressine [5] [6] ayant été suivie d'une

augmentation de certaines des activités biologiques, nous avons décidé d'examiner les conséquences de cette suppression sur les molécules d'Orn⁸-vasopressine et de ses trois dérivés mentionnés plus haut. Nous avons donc synthétisé la désamino¹-Orn⁸-vasopressine, la désamino¹-Phe²-Orn⁸-vasopressine, la désamino¹-Ile³-Orn⁸-vasopressine (= désamino¹-Orn⁸-oxytocine) et la désamino¹-Phe²-Ile³-Orn⁸-vasopressine (= désamino¹-Phe²-Orn⁸-oxytocine), en choisissant pour la synthèse de ces analogues des méthodes de condensation évitant les risques de racémisation.

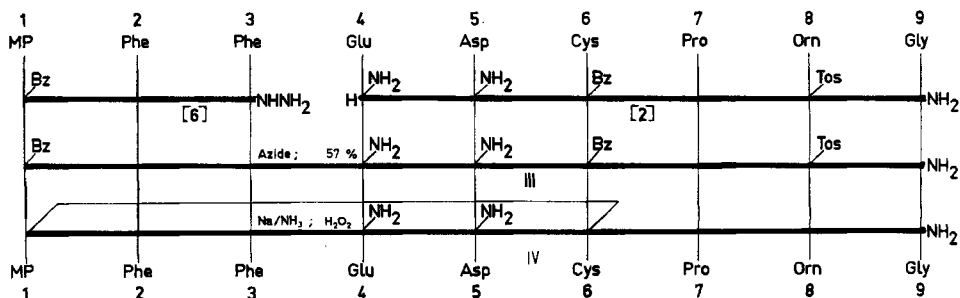
Le β -benzylthio-propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-hydrazide [6] et le β -benzylthio-propionyl-L-phénylalaninyl-L-phénylalaninyl-hydrazide [6] ont été transformés en leurs azides qui, par condensation avec l'hexapeptide L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N⁶-tosyl-L-ornithyl-glycinamide [1] [2], ont donné les dérivés protégés de la désamino-Orn⁸-vasopressine et de la désamino¹-Phe²-Orn⁸-vasopressine respectivement (Schémas 1 et 2).

Schéma 1. Synthèse de la désamino¹-Orn⁸-vasopressine



Abréviations: CBO- = benzyloxycarbonyle; MP- = β -mercaptopropionyle; Bz- = benzyle; -OCP = trichloro-2,4,5-phénoxy-; Tos- = tosyle = *p*-toluènesulfonyle

Schéma 2. Synthèse de la désamino¹-Phe²-Orn⁸-vasopressine



Abréviations: voir Schéma 1

Les deux dérivés protégés de la désamino¹-Ile³-Orn⁸-vasopressine et de la désamino¹-Phe²-Ile³-Orn⁸-vasopressine ont été synthétisés à partir du même hexapeptide par la méthode récurrente utilisant les esters actifs trichloro-2,4,5-phényliques, car le schéma 3 + 6, qui avait été utilisé avec succès pour les deux premiers analogues, fournit dans ces cas des produits moins purs. Après scission des groupes protecteurs par le sodium dans l'ammoniac liquide, oxydation par l'eau oxygénée, et distribution

Tableau I. *Activités biologiques*

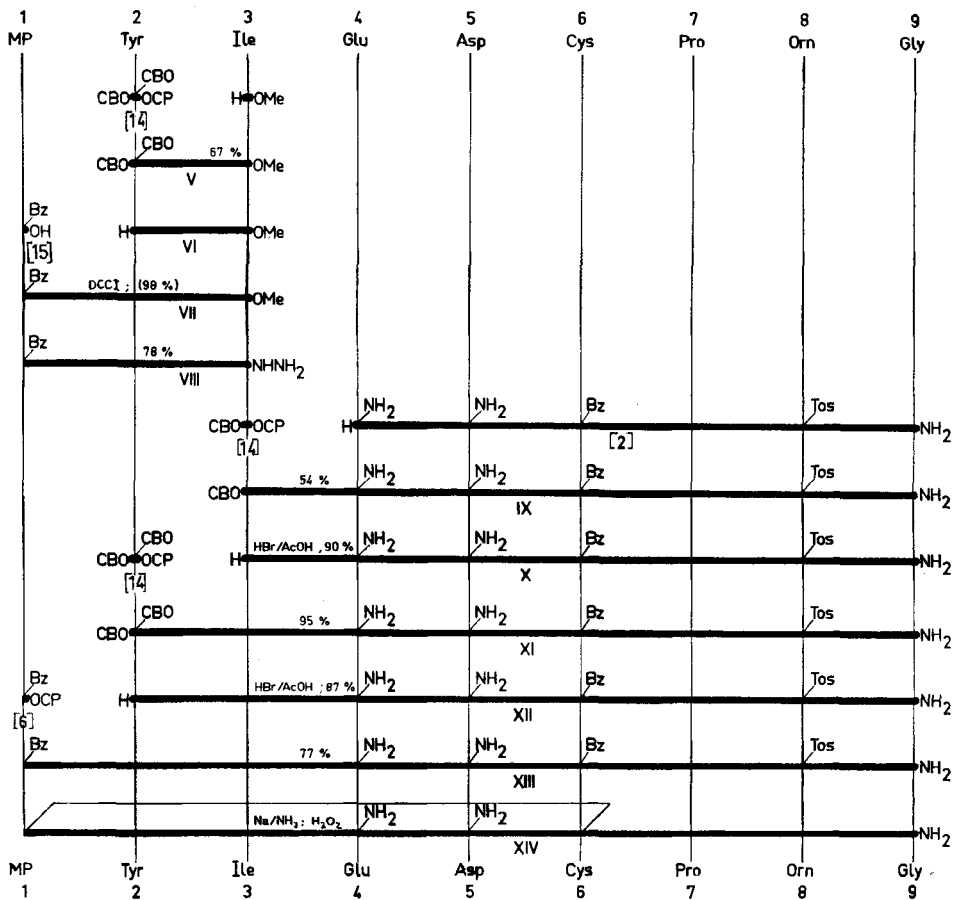
Formule chimique et désignation	Activités oxytociques en unités internationales par mg de base libre		Activités vasopressives en unités internationales par mg de base libre	
	Contraction de l'utérus isolé de Rat	Baisse de la pression sanguine du Coq	Augmentation de la pression interne de la glande mammaire du Lapin	Augmentation de la pression sanguine du Rat
H-CyS-Tyr-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Orn-Gly-NH ₂ Orn ⁸ -vasopressine [1]	10 ± 2	21 ± 1	~50	360 ± 26
S-CH ₂ -CH ₂ -CO-Tyr-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Orn-Gly-NH ₂ Désamino ¹ -Orn ⁸ -vasopressine (II)	15,5 ± 2	43 ± 9	43 ± 7	355 ± 30
H-CyS-Phe-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Orn-Gly-NH ₂ Phe ² -Orn ⁸ -vasopressine [2]	~0,5	b)	~3	153 ± 11
S-CH ₂ -CH ₂ -CO-Phe-Phe-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Orn-Gly-NH ₂ Désamino ¹ -Phe ² -Orn ⁸ -vasopressine (IV)	< 1	b)	2,6 ± 0,3	45 ± 2
H-CyS-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Orn-Gly-NH ₂ Ile ³ -Orn ⁸ -vasopressine [1]	42 ± 5	90 ± 3	95 ± 6	103 ± 10
S-CH ₂ -CH ₂ -CO-Tyr-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Orn-Gly-NH ₂ Désamino ¹ -Ile ³ -Orn ⁸ -vasopressine (XIV) ^{a)}	~80	400 ± 30	~300	270 ± 12
H-CyS-Phe-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Orn-Gly-NH ₂ Phe ² -Ile ³ -Orn ⁸ -vasopressine [2]	~1	~3 atypique	7 ± 2	120 ± 10
S-CH ₂ -CH ₂ -CO-Phe-Ile-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-Cys-Pro-Orn-Gly-NH ₂ Désamino ¹ -Phe ² -Ile ³ -Orn ⁸ -vasopressine (XXI) ^{a)}	< 2	18 ± 2	~10	100 ± 11

a) Ces activités biologiques sont plus élevées que celles citées dans [12]. b) Faible activité pressorique.

en contre-courant, les quatre désamino-nonapeptides obtenus se sont montrés homogènes à la chromatographie et à l'électrophorèse sur papier dans différents systèmes.

Les essais pharmacologiques ont été effectués par les Drs B. BERDE et E. STÜRMER de notre Département de recherches medicobiologiques (Dir. Dr A. CERLETTI). Comme on peut le voir en examinant le tableau I des activités biologiques, la sup-

Schéma 3. Synthèse du β -benzylthio-propionyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-hydrasid et synthèse de la désamino¹-Ile³-Orn⁸-vasopressine



pression du groupe amino N-terminal a eu pour effet commun chez les quatre analogues de diminuer nettement le rapport activité pressorique/activité antidiurétique: dans les cas de la désamino¹-Orn⁸-vasopressine (II) et de la désamino¹-Phe²-Ile³-Orn⁸-vasopressine (XXI), l'activité pressorique a été peu modifiée, mais l'activité antidiurétique a été sensiblement augmentée. Dans celui de la désamino¹-Phe²-Orn⁸-vasopressine (IV), l'activité antidiurétique a été peu changée, mais l'activité pressorique a beaucoup diminué. Dans le cas de la désamino¹-Ile³-Orn⁸-vasopressine (XIV) enfin, on note une augmentation des deux activités, celle de l'activité antidiurétique

étant cependant beaucoup plus importante. Ceci confirme l'observation faite précédemment [5] [6], selon laquelle la suppression du groupe amino N-terminal est favorable à la manifestation de l'activité antidiurétique. Quant aux activités oxytociques, elles n'ont été modifiées sensiblement que dans le cas de la désamino¹-Ile³-Orn⁸-vasopressine, chez laquelle elles ont subi une nette augmentation.

Schéma 4. Synthèse du β -benzylthio-propionyl-L-phénylalaninyl-L-isoleucinyl-hydrazipe et synthèse de la désamino¹-Phe²-Ile³-Orn⁸-vasopressine

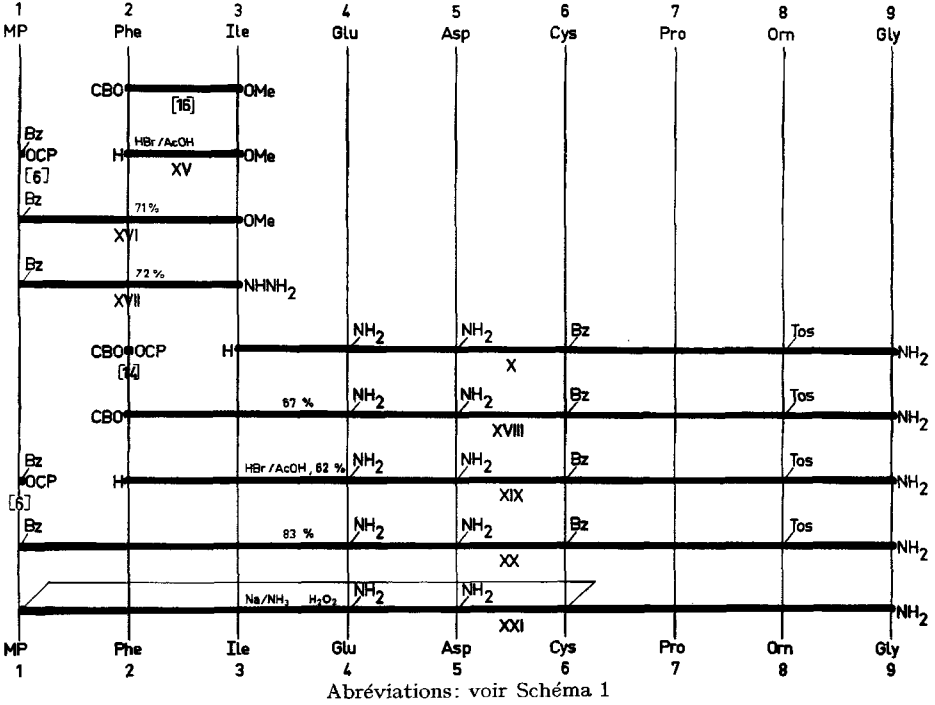
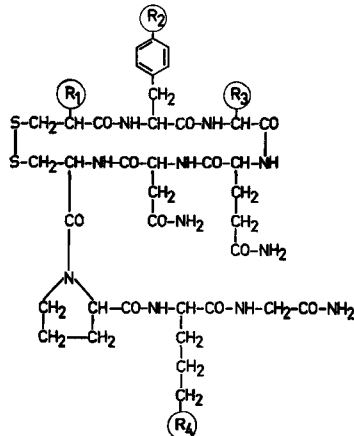










Schéma 5. Formule générale des vasopressines et de leurs analogues mentionnés dans ce travail



Pour la signification des restes R₁ à R₄, voir tableau II

Tableau II. Variation du rapport «activité pressorrique / activité antidiurétique» en fonction de certaines modifications de la molécule de vasopressine

Structure en formule générale (voir schéma 5)				Désignation chimique	Activités vasopressives en unités internationales par mg de base libre	Pression Antidiurèse sanguine chez le Rat du Rat (P) (A)	Rapport : activité pressorique/ activité antidiurétique (P/A)
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄				
-H	-H	-CH ₂ - 	-NH-C(NH)-NH ₂	Désamino ¹ -Phe ² -Arg ⁸ -vasopressine [8] [6]	29	800	1/27,5
-H	-OH	-CH ₂ - 	-NH-C(NH)-NH ₂	Désamino ¹ -Arg ⁸ -vasopressine [5] [6]	370	1300	1/3,5
-NH ₂	-H	-CH ₂ - 	-NH-C(NH)-NH ₂	Phe ² -Arg ⁸ -vasopressine [7]	122	~350	1/2,9
-H	-OH	-CH ₂ -NH ₂	-CH ₂ -NH ₂	Désamino ¹ -Lys ⁸ -vasopressine [4]	126	301	1/2,4
-NH ₂	-OH	-CH(CH ₃)-C ₂ H ₅	-NH-C(NH)-NH ₂	Ile ³ -Arg ⁸ -vasopressine [7] [9]	245	250	1/1
-NH ₂	-OH	-CH ₂ - 	-NH-C(NH)-NH ₂	Arg ⁸ -vasopressine	~400	~400	1/1
-NH ₂	-OH	-CH ₂ -NH ₂	-CH ₂ -NH ₂	Lys ⁸ -vasopressine	270	250	1,1/1
-NH ₂	-H	-CH(CH ₃)-C ₂ H ₅	-NH-C(NH)-NH ₂	Phe ² -Ile ³ -Arg ⁸ -vasopressine [7]	125	109	1,1/1
-H	-OH	-CH ₂ - 	-NH ₂	Désamino ¹ -Orn ⁸ -vasopressine (II)	355	202	1,8/1
-NH ₂	-H	-CH ₂ -NH ₂	-CH ₂ -NH ₂	Phe ² -Lys ⁸ -vasopressine [10]	~55	~20	2,7/1
-H	-H	-CH ₂ - 	-NH ₂	Désamino ¹ -Phe ² -Orn ⁸ -vasopressine (IV)	45	13	3,5/1
-H	-OH	-CH(CH ₃)-C ₂ H ₅	-NH ₂	Désamino ¹ -Ile ³ -Orn ⁸ -vasopressine (XIV)	270	~70	3,9/1
-NH ₂	-OH	-CH ₂ - 	-NH ₂	Orn ⁸ -vasopressine [1]	360	88	4,1/1
-NH ₂	-OH	-CH(CH ₃)-C ₂ H ₅	-CH ₂ NH ₂	Ile ³ -Lys ⁸ -vasopressine [11]	130	24	5,4/1
-NH ₂	-H	-CH ₂ - 	-NH ₂	Phe ² -Orn ⁸ -vasopressine [2]	153	16	9,6/1
-H	-H	-CH(CH ₃)-C ₂ H ₅	-NH ₂	Désamino ¹ -Phe ² -Ile ³ -Orn ⁸ -vasopressine (XXI)	100	~4	25/1
-NH ₂	-H	-CH(CH ₃)-C ₂ H ₅	-CH ₂ -NH ₂	Phe ² -Ile ³ -Lys ⁸ -vasopressine [13]	32	1	32/1
-NH ₂	-OH	-CH(CH ₃)-C ₂ H ₅	-NH ₂	Ile ³ -Orn ⁸ -vasopressine [1]	103	2,5	41/1
-NH ₂	-H	-CH(CH ₃)-C ₂ H ₅	-NH ₂	Phe ² -Ile ³ -Orn ⁸ -vasopressine [2]	120	0,55	220/1

Dans le tableau II nous avons classé, sur la base de leur rapport activité pressorifique/activité antidiurétique, les analogues connus des vasopressines (Arg⁸, Lys⁸-et Orn⁸-vasopressines) dans lesquels une ou plusieurs des trois modifications suivantes ont été apportées: remplacement de la phénylalanine en position 3 par l'isoleucine (caractéristique de la molécule d'oxytocine); remplacement de la tyrosine en position 2 par la phénylalanine, c'est-à-dire suppression de l'hydroxyle phénolique; suppression du groupe α -amino N-terminal.

D'une manière générale, on remarque que, de trois analogues ne différant que par l'acide aminé basique situé en position 8, celui comportant l'arginine se trouve du côté «antidiurétique» de la série, tandis que celui comportant la lysine, et plus encore celui comportant l'ornithine, se rapprochent du côté «pressorifique» de celle-ci. Le groupe δ -guanidino en position 8 favorise donc l'activité antidiurétique, qu'il rend moins sensible à l'effet des modifications citées plus haut, tandis qu'un groupe ε - ou δ -amino en position 8 à l'extrémité de la chaîne latérale favorise l'activité pressorifique, qu'il protège en quelque sorte contre l'effet des modifications mentionnées ci-dessus. En effet, si une même modification est introduite simultanément dans les mêmes analogues de l'Arg⁸-vasopressine, de la Lys⁸-vasopressine et de l'Orn⁸-vasopressine, l'activité antidiurétique est moins abaissée que l'activité pressorifique dans le cas de l'analogue portant le groupe guanidino (arginine). Au contraire, dans le cas de l'analogue comprenant à la place du groupe δ -guanidino un groupe ε -amino (lysine) ou mieux un groupe δ -amino (ornithine), c'est l'activité pressorifique qui est le moins abaissée.

En ce qui concerne les effets propres exercés par les trois modifications mentionnées plus haut, on voit que l'introduction de l'isoleucine en position 3 abaisse surtout l'activité antidiurétique, sauf en présence du groupe δ -guanidino, qui exerce son effet atténuateur. La suppression de l'hydroxyle phénolique en position 2, effectuée sur un analogue chez lequel l'une des activités prédomine, a pour effet d'augmenter encore la sélectivité en faveur de cette activité. Ainsi, chez l'Orn⁸-vasopressine qui comporte en position 8 le groupe δ -amino favorisant l'activité pressorifique, l'introduction de la phénylalanine en position 2 abaisse beaucoup plus l'activité antidiurétique que l'activité pressorifique, augmentant ainsi la sélectivité en faveur de celle-ci. Chez la dés-amino-arginine-vasopressine, comportant en position 8 un groupe δ -guanidino favorisant l'activité antidiurétique, l'introduction de la phénylalanine en position 2 abaisse au contraire davantage l'activité pressorifique, renforçant chez l'analogue ainsi obtenu la sélectivité en faveur de l'activité antidiurétique. Enfin, il ressort du tableau que la suppression du groupe α -amino N-terminal favorise systématiquement l'activité antidiurétique. Ainsi, dans le cas de l'Orn⁸-vasopressine et de ses dérivés, qui tous possèdent une sélectivité en faveur de l'activité pressorifique, la suppression du groupe α -amino N-terminal provoque une diminution de cette sélectivité.

Partie expérimentale ²⁾

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 ont été effectuées selon la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier «SCHLEICHER & SCHUELL 2040 lavé». Rf_M dans le mélange méthyl-éthyl-cétone/pyridine/eau (65:15:20); Rf_p dans le mélange *n*-butanol/acide acétique/eau (70:10:20);

²⁾ 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. SCHÖNIGER).

Rf_A dans le mélange alcool isoamylique/pyridine/eau (35:35:30). Rf^o sans scission préalable; Rf^a après scission des groupes benzyloxycarboxyle par séjour de 40 min à 20° dans une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre.

Les électrophorèses sur papier ont été effectuées dans l'appareil à électrophorèse sous haute tension de WIELAND & PFLEIDERER [17]: à pH 1,9 (E_{1,9}) dans le mélange acide formique/acide acétique/eau (15:10:75); à 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 a et o ont la même signification que pour les chromatogrammes.

Les réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes et des phérogrammes ont été décrits précédemment [18].

1. Synthèse de la désamino¹-Orn⁸-vasopressine

β-Benzylthio-propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide (I). A une solution, refroidie à -5°, de 0,78 g (1,50 mmole) de *β*-benzylthio-propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-hydrazide [6] dans un mélange de 6 ml de diméthylformamide, 6 ml d'isopropanol et 0,75 ml d'HCl aq. 6N, on ajoute, sous lente agitation, 0,32 ml (1,6 mmole) d'une solution aqueuse 5M de nitrite de sodium. Après 5 min de lente agitation on fait couler la solution dans 40 ml de NaHCO₃ aq. 0,25N, sépare par centrifugation le précipité formé, le lave deux fois à l'eau et le sèche au vide poussé 5 h à 0°. L'azide ainsi obtenu est ajouté à une solution de 1,27 g (1,45 mmole) de L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide [2] dans 9 ml de diméthylformamide, et on agite une nuit à température ordinaire, sous lente concentration au vide. La solution est ensuite additionnée de 40 ml d'acétate d'éthyle, le précipité gélatineux formé est centrifugé, lavé par 40 ml de mélange diméthylformamide/acétate d'éthyle 1:4 puis encore 3 fois à l'acétate d'éthyle. Après séchage au vide, on triture le produit dans 5 ml d'acide acétique 1N, filtre, lave à l'acide acétique 1N, à l'eau, sèche et traite à quatre reprises par 5 ml de méthanol bouillant, en filtrant à chaud chaque fois. On obtient, après séchage au vide à 50°, 1,14 g (58%) de *β*-benzylthio-propionyl-L-tyrosyl-L-phénylalaninyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-*δ*-tosyl-L-ornithyl-glycinamide de F. 233–237° (déc.). [α]_D = -40,5° ± 1° (c = 1,2; diméthylformamide).

C ₆₆ H ₈₂ O ₁₄ N ₁₂ S ₃ (1363,7)	Calc. C 58,1 Tr. „ 57,7	H 6,1 „ 6,2	O 16,4 „ 16,6	N 12,3 „ 12,6	S 7,1% „ 7,0%
--	----------------------------	----------------	------------------	------------------	------------------

Désamino¹-Orn⁸-vasopressine (II). On dissout 1,00 g (0,733 mmole) de désaminopeptide protégé I 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 0,5 g de NH₄Cl on évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 700 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,3 au moyen de NH₄OH 4N, ajoute 0,9 ml d'H₂O₂ 1M et agite à température ordinaire jusqu'à réaction négative au nitroprussiate (env. 20 min). Après acidification à pH 4–4,5 au moyen d'acide acétique glacial, on adsorbe le peptide sur 65 ml d'amberlite IRC-50 (XE-64) (cycle acide) et, après lavage par 400 ml d'acide acétique à 1% pour éliminer les sels présents [19], élue la substance par 250 ml d'acide acétique à 50%. L'éluat est évaporé au vide à 30° et le résidu est soumis à une distribution en contre-courant dans le système *s*-butanol/eau/acide acétique 120:160:1. Après 200 transferts, on détermine sur des aliquotes [20] la position du sommet principal (*K* = 0,28), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore le *s*-butanol et concentre la solution aqueuse au vide à 30° puis lyophilise. On obtient ainsi 335 mg de poudre contenant 46 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 280 mg (37%) de désamino¹-Orn⁸-vasopressine (base). [α]_D²⁵ = -111° (c = 2,3 [base libre; calculé sur la base du dosage d'azote peptidique]; acide acétique 0,1N). E_{1,9}^o = 0,55 Try; E_{5,8}^o = 0,45 His. Rf_M^o = 0,4; Rf_P^o = 0,2; Rf_A^o = 0,45 (échantillon chromatographié à l'état de chlorhydrate) (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN). Un témoin d'arginine-vasopressine a donné les valeurs suivantes: E_{1,9}^o = 0,9 Try; E_{5,8}^o = 0,6 His. Rf_M^o = 0,30; Rf_P^o = 0,10; Rf_A^o = 0,45. L'hydrolyse totale (HCl 6N, 24 h à 110° en l'absence d'air) a fourni les proportions suivantes des acides aminés³⁾: Tyr: 0,95 (calc. 1,00); Phe: 0,98 (1,00); Glu: 1,02 (1,00);

³⁾ Les analyses d'acides aminés selon STEIN & MOORE ont été effectuées par le Dr R. WEBER, Institut de Chimie organique, Bâle (analogues II et IV), et par le Dr J.-F. PÉCHÈRE, Institut ED. VAN BENEDEN, Liège (analogues XIV et XXI). Nous les en remercions vivement.

Asp 1,02 (1,00); Pro: 1,02 (1,00); Orn: 1,03 (1,00), Gly: 1,00 (1,00); NH₃: 3,40 (3,00); total [disulfure mixte de cystéine et d'acide β-mercaptopropionique + demi-cystine]⁴⁾: 0,98 (1,00). Pour l'analyse, un échantillon du peptide est séché au vide poussé, 16 h à 100°.

C ₄₅ H ₆₂ O ₁₂ N ₁₅ S ₂ ·2H ₂ O (1063,3)	Calc. C 50,8 Tr. ,, 50,4	H 6,3 ,, 6,9	N 15,8 ,, 16,1	S 6,0% ,, 6,0%
---	-----------------------------	-----------------	-------------------	-------------------

2. Synthèse de la désamino¹-Phe²-Orn⁸-vasopressine

β-Benzylthio-propionyl-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide (III). A une solution, refroidie à -5°, de 0,76 g (1,51 mmole) de β-benzylthio-propionyl-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-hydrazide [6] dans un mélange de 6 ml de diméthylformamide, 6 ml d'isopropanol et 0,75 ml d'HCl aq. 6N, on ajoute sous lente agitation 0,32 ml (1,6 mmole) d'une solution aqueuse 5M de nitrite de sodium. Après 5 min de lente agitation, on fait couler la solution dans 40 ml de NaHCO₃ 0,25 N, sépare par centrifugation le précipité formé, le lave deux fois à l'eau et le sèche au vide poussé 5 h à 0°. L'azide ainsi obtenu est ajouté à une solution de 1,26 g (1,44 mmole) de L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide [2] dans 9 ml de diméthylformamide, et on agite une nuit à température ordinaire, sous lente concentration au vide. La solution est ensuite additionnée de 40 ml d'acétate d'éthyle, le précipité gélatineux formé est centrifugé, lavé par 40 ml de mélange diméthylformamide/acétate d'éthyle 1:4, puis encore 3 fois à l'acétate d'éthyle; après séchage au vide, on trituré le produit dans 5 ml d'acide acétique 1N, filtre, lave par 3 ml d'acide acétique 1N puis 3 fois à l'eau, sèche et traite à cinq reprises par 5 ml de méthanol bouillant, en filtrant à chaud chaque fois. On obtient, après séchage au vide à 50°, 1,12 g (57%) de β-benzylthio-propionyl-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide de F. 246–247° (avec suintement vers 220°). [α]_D²⁵ = -37,5° ± 1° (c = 1,9; diméthylformamide).

C ₆₆ H ₈₂ O ₁₃ N ₁₂ S ₃ ·1H ₂ O (1365,7)	Calc. C 58,0 Tr. ,, 58,1	H 6,2 ,, 6,4	O 16,4 ,, 16,7	N 12,3 ,, 12,0	S 7,0% ,, 7,1%
---	-----------------------------	-----------------	-------------------	-------------------	-------------------

Désamino¹-Phe²-Orn⁸-vasopressine (IV). On dissout 1,00 g (0,732 mmole) de désamino-nona-peptide protégé III 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 0,5 g de NH₄Cl on évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 700 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à 8,3 au moyen de NH₄OH 4N, ajoute 0,95 ml d'H₂O₂ 1M et agite à température ordinaire jusqu'à réaction négative au nitroprussiate (20 min). Après acidification à pH 4–4,5 au moyen d'acide acétique glacial, on adsorbe le peptide sur 65 ml d'amberlite IRC-50 (XE-64) (cycle acide) et, après lavage par 500 ml d'acide acétique à 1% pour éliminer les sels présents [19], élue la substance par 300 ml d'acide acétique à 50%. L'éluat est évaporé au vide à 30° et le résidu est soumis à une distribution en contre-courant dans le système s-butanol/eau/acide acétique 120:160:1. Après 200 transferts, on détermine sur des aliquotes [20] la position du sommet principal (K = 0,34), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore le s-butanol et concentre la solution aqueuse au vide à 30° puis lyophilise. On obtient ainsi 250 mg de poudre contenant 32 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 184 mg (25%) de base libre de désamino¹-Phe²-Orn⁸-vasopressine. [α]_D²⁵ = -118° (c = 1,3 [base libre; concentration calculée sur la base du dosage d'azote peptidique]; acide acétique 0,1N). E_{1,9}⁰ = 0,55 Try; E_{5,8}⁰ = 0,45 His. Rf_M⁰ = 0,4; Rf_P⁰ = 0,2; Rf_A⁰ = 0,45 (révélation par ninhydrine et chlore). Un témoin d'arginine-vasopressine a donné les valeurs suivantes: E_{1,9}⁰ = 0,9 Try; E_{5,8}⁰ = 0,6 His. Rf_M⁰ = 0,30; Rf_P⁰ = 0,10; Rf_A⁰ = 0,45. L'hydrolyse totale (HCl 6N 24 h à 110° en l'absence d'air) a fourni les proportions suivantes des acides aminés³⁾: Phe: 1,97 (calc. 2,00); Glu: 0,99 (1,00); Asp: 1,00 (1,00); Pro: 1,02 (1,00); Orn: 1,02 (1,00); Gly: 1,00 (1,00); NH₃: 3,41 (3,00); total [disulfure mixte d'acide β-mercaptopropionique et de cystéine + demi-cystine]⁴⁾: 0,97 (1,00). Pour l'analyse, un échantillon de peptide est séché au vide poussé, 16 h à 100°.

C ₄₅ H ₆₂ O ₁₁ N ₁₂ S ₂ ·1CH ₃ COOH,1H ₂ O (1089,3)	Calc. C 51,8 Tr. ,, 51,9	H 6,3 ,, 6,3	N 15,4 ,, 15,4	S 5,9% ,, 5,9%
---	-----------------------------	-----------------	-------------------	-------------------

⁴⁾ Pendant l'hydrolyse, le disulfure mixte subit une dismutation partielle en cystine et disulfure de l'acide β-mercaptopropionique [3].

3. Synthèse de la désamino¹-Ile³-Orn⁸-vasopressine

O, N-Dibenzoyloxycarbonyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (V). A une solution, refroidie à 0°, de 18,2 g (100 mmoles) de chlorhydrate de L-isoleucinate de méthyle dans 30 ml d'eau, on ajoute une solution, également refroidie, de 11,5 g de K₂CO₃ dans 20 ml d'eau, extrait à l'acétate d'éthyle glacé (3 fois 50 ml), sèche la phase organique sur MgSO₄, filtre et ajoute une solution de 60,0 g (95 mmoles) de O,N-di-CBO-L-tyrosinate de trichloro-2,4,5-phényle [14]. On évapore l'acétate d'éthyle au vide à 30° puis laisse reposer la solution une nuit à 25°. On ajoute 375 ml d'acétate d'éthyle et 200 ml d'HCl 0,5N, secoue, lave la phase organique par HCl 1N, H₂O, KHCO₃ 1N, H₂O, sèche sur MgSO₄ rapidement (le dipeptide a tendance à cristalliser) et évapore au vide à 30°. Après recristallisation à partir de 650 ml d'éthanol, on obtient 38,8 g (67%) de O,N-di-CBO-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle de F. 151°, homogène à la chromatographie sur couche mince (silicagel, système benzène/acétone 2:1, révélation par vapeurs d'iode). Pour l'analyse, on recristallise un échantillon de 2,0 g dans 15 volumes d'éthanol et obtient 1,47 g de produit de F. 158°. $[\alpha]_D^{20} = +2,7^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1$; acide acétique à 95%); $-2,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1$; diméthylformamide). $E_{1,9}^a = 0,9$ Glu; $E_{5,8}^a = 0,85$ His. $Rf_M^a = 0,99$; $Rf_P^a = 0,75$; $Rf_A^a = 0,93$ (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN).

$C_{32}H_{36}O_8N_2$	Calc. C 66,7	H 6,3	O 22,2	N 4,9%
(576,7)	Tr. ,, 66,6	,, 6,7	,, 21,9	,, 5,0%

β-Benzylthio-propionyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (VII). On dissout 17,3 g (30,0 mmoles) d'ester dipeptidique V dans 200 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique et laisse séjourner 1 h à 25°. Après évaporation à sec, triturations répétées dans l'éther, séchage au vide, redissolution dans du méthanol anhydre et évaporation au vide à 30°, on obtient 12,0 g de bromhydrate de L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (VI) (Br: calc. 20,5%; tr. 20,8%) qu'on dissout dans 25 ml d'acétonitrile contenant 5,9 g (30,0 mmoles) d'acide β-benzylthio-propionique [15]. On refroidit à 0°, ajoute 4,50 ml (32 mmoles) de triéthylamine et aussitôt 6,20 g (30,0 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite 5 h à 25°. Après évaporation du solvant au vide à 30°, dissolution du résidu dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'HCl 1N, on lave encore la phase organique par HCl 1N, H₂O, NH₄OH 1N, H₂O, sèche sur Na₂SO₄, évapore au vide et sèche au vide poussé à 30°. On obtient ainsi 14,3 g (98%) de β-benzylthio-propionyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle sous forme d'un sirop vitrifié présentant à la chromatographie sur couche mince de silicagel (chloroforme/méthanol 95:5; révélation par vapeurs d'iode) quelques impuretés mineures, mais pouvant être directement transformé en hydrazide VIII. Pour l'analyse, on purifie un échantillon par chromatographie sur colonne (silicagel, chloroforme/méthanol 95/5). $[\alpha]_D^{23} = -8,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,3$; diméthylformamide).

$C_{26}H_{34}O_5N_2S$	Calc. C 64,2	H 7,0	O 16,4	N 5,8	S 6,6%
(486,6)	Tr. ,, 64,1	,, 7,1	,, 16,2	,, 6,1	,, 6,5%

β-Benzylthio-propionyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-hydrazide (VIII). A une solution de 10,0 g (20,6 mmoles) d'ester VII dans 110 ml de méthanol anhydre on ajoute 20 ml d'hydrazine anhydre et laisse séjourner 20 h à 25°. Le précipité formé est essoré, lavé au méthanol et à l'eau jusqu'à neutralité et séché au vide à 40°. Le produit obtenu (8,5 g (85%)), F. 249–250° est recristallisé à partir de 65 ml de diméthylformamide chaud. La masse épaisse formée par refroidissement est diluée par 1 volume de méthanol, refroidie à 0°, filtrée, lavée au moyen du mélange diméthylformamide/méthanol 1:1 puis au méthanol seul. Après séchage au vide poussé à 40°, on obtient 7,75 g (78%) de β-benzylthio-propionyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-hydrazide de F. 253–254°. $[\alpha]_D^{23} = -12,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,9$; diméthylformamide). Le produit est homogène à la chromatographie en couche mince (silicagel/méthanol). $E_{1,9}^o = 0,6$ Try (révélation par chlore et FOLIN).

$C_{25}H_{34}O_4N_4S$	Calc. C 61,7	H 7,0	O 13,2	N 11,5	S 6,6%
(486,6)	Tr. ,, 61,2	,, 7,2	,, 13,2	,, 11,4	,, 6,5%

N-Benzoyloxycarbonyl-L-isoleucyl-L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-N⁰-tosyl-L-ornithyl-glycinamide (IX). On dissout 30,7 g (34,4 mmoles) de L-glutaminy-L-asparaginy-L-S-benzyl-L-cystéiny-L-prolyl-N⁰-tosyl-L-ornithyl-glycinamide [2] dans 150 ml de diméthylformamide, ajoute 18,7 g (42,0 mmoles) de N-CBO-L-isoleucinate de trichloro-2,4,5-phényle [14] et laisse reposer 20 h à 25°. On dilue le mélange de réaction pris en masse par 300 ml d'acétate d'éthyle,

sépare par centrifugation, lave le culot par 300 ml de mélange diméthylformamide/acétate d'éthyle 1:4 puis à l'acétate d'éthyle (3 fois 300 ml). On sèche au vide, suspend le produit à trois reprises dans 150 ml de méthanol bouillant en filtrant à chaud chaque fois et sèche de nouveau⁵⁾. Pour le purifier, on suspend le produit dans 200 ml de diméthylformamide chaud (60°), reprend l'insoluble dans plusieurs fractions successives de 50 ml de diméthylformamide chaud jusqu'à dissolution de toute la substance (350 ml de diméthylformamide en tout). On précipite le produit par adjonction de 500 ml de méthanol, refroidit à 25° et laisse reposer quelques heures. Après filtration, lavage au moyen du mélange diméthylformamide/méthanol 7:10 (2 fois 200 ml), au méthanol seul (2 fois 200 ml) et à l'acétate d'éthyle (2 fois 200 ml), sèche au vide à 40°, on obtient 20,7 g (54%) de N-benzyloxycarbonyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^δ-tosyll-L-ornithyll-glycinamide de F. 222–225°. $[\alpha]_D^{25} = -36,5 \pm 1^\circ$ ($c = 1,8$; diméthylformamide).

$C_{62}H_{71}O_{13}N_{11}S_2$	Calc. C 55,6	H 6,4	N 13,7	S 5,7%
(1122,4)	Tr. „ 55,6	„ 6,5	„ 13,7	„ 5,6%

L-Isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^δ-tosyll-L-ornithyll-glycinamide (X). On dissout 19,8 g (17,6 mmoles) d'heptapeptide protégé IX dans 100 ml d'acide acétique anhydre en chauffant à 50°, refroidit à 25°, ajoute 400 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre et laisse reposer à température ordinaire. Après 1 h on introduit la solution dans 2 l d'éther sec sous vive agitation, filtre, lave le précipité à l'éther et sèche au vide à 25°. On dissout le bromhydrate obtenu dans 200 ml de méthanol, ajoute 250 ml d'amberlite IRA-410 (cycle basique) et 20 ml d'eau pour améliorer la solubilité de la base libre du peptide. On secoue 10 min, filtre, lave la résine au méthanol à 90% et évapore le filtrat au vide à 30°. Après séchage au vide poussé à 25°, on obtient 15,7 g (90%) de L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^δ-tosyll-L-ornithyll-glycinamide de F. 163–168°. $[\alpha]_D^{25} = -44,5 \pm 1^\circ$ ($c = 1,2$; acide acétique à 95%). $E_{1,9}^0 = 0,55$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,45$ His. $Rf_M^0 = 0,63$; $Rf_A^0 = 0,62$ (échantillon chromatographié à l'état de formiate; révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{44}H_{65}O_{11}N_{11}S_2$	Calc. C 53,5	H 6,6	N 15,6	S 6,5%
(988,2)	Tr. „ 53,4	„ 6,7	„ 15,2	„ 6,4%

O,N-Di-benzyloxycarbonyll-L-tyrosyll-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^δ-tosyll-L-ornithyll-glycinamide (XI). On dissout 2,70 g (2,73 mmoles) d'heptapeptide X et 1,98 g (3,15 mmoles) de O,N-di-CBO-L-tyrosinate de trichloro-2,4,5-phényle [14] dans 20 ml de diméthylformamide et laisse la solution séjourner 20 h à 25°. On ajoute 80 ml d'acétate d'éthyle, sépare par centrifugation le précipité formé, le suspend dans 100 ml de mélange diméthylformamide/acétate d'éthyle 1:4 puis trois fois dans 100 ml d'acétate d'éthyle en centrifugeant chaque fois. Après séchage au vide, on triture le produit dans HCl 1N (3 fois 10 ml), lave à l'eau jusqu'à neutralité et sèche au vide poussé à 50°. On obtient ainsi 3,68 g (95%) de O,N-di-benzyloxycarbonyll-L-tyrosyll-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^δ-tosyll-L-ornithyll-glycinamide de F. 224–226°. $[\alpha]_D^{25} = -44,5 \pm 1^\circ$ ($c = 1,3$; acide acétique à 95%).

$C_{69}H_{86}O_{17}N_{12}S_2$	Calc. C 58,4	H 6,1	O 19,2	N 11,8	S 4,5%
(1419,7)	Tr. „ 58,4	„ 6,3	„ 19,5	„ 11,7	„ 4,5%

L-Tyrosyll-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyll-L-prolyll-N^δ-tosyll-L-ornithyll-glycinamide (XII). On dissout 3,48 g (2,45 mmoles) d'octapeptide protégé XI dans 15 ml d'acide acétique anhydre en chauffant à 50°, refroidit à 25°, ajoute 60 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre et laisse séjourner 1 h à 25°. On introduit la solution dans 0,6 l d'éther sous vive agitation, filtre et lave abondamment à l'éther le bromhydrate d'octapeptide ayant précipité. Après séchage au vide, le produit est dissous dans 20 ml du mélange diméthylformamide/H₂O/méthanol 2:2:3 et la solution ainsi obtenue est secouée 10 min avec 50 ml d'amberlite IRA-410 (cycle basique). Après filtration, lavage au moyen du même mélange (3 fois 50 ml), évaporation au vide poussé à 30°, on obtient 2,45 g (87%) de L-tyro-

⁵⁾ A ce stade, le produit obtenu n'est électrophorétiquement pas complètement pur; il est toutefois possible de l'utiliser tel quel pour le stade suivant (X: scission par HBr/CH₃COOH, élimination des ions bromhydriques par de l'amberlite IRA-410), à condition de purifier le peptide libre obtenu, en lavant sa solution n-butanolique trois fois par de petites quantités d'eau (rdt global IX-X: 67%).

syl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyL-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide amorphe. $[\alpha]_D^{25} = -48,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; acide acétique à 95%). $E_{1,9}^0 = 0,47$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,0$. $Rf_M^0 = 0,65$; $Rf_A^0 = 0,7$ (chromatographié à l'état de formiate) (révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN). $C_{53}H_{74}O_{13}N_{12}S_2$ Calc. C 55,3 H 6,5 N 14,6 S 5,6%
(1151,4) Tr. „ 55,3 „ 6,8 „ 14,6 „ 5,4%

β-Benzylthio-propionyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyL-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide (XIII). — a) On dissout 2,00 g (1,74 mmole) d'octapeptide XII dans 10 ml de diméthylformamide, ajoute 0,75 g (2,00 mmoles) de *β*-benzylthio-propionate de trichloro-2,4,5-phényle [6] et laisse séjourner 2 jours à 25°. Le produit formé précipite en partie. A la suspension obtenue on ajoute 40 ml d'acétate d'éthyle, centrifuge, lave le culot par 30 ml de mélange diméthylformamide/acétate d'éthyle 1:4, puis à l'acétate d'éthyle seul (3 fois 30 ml). Après séchage au vide, le produit est trituré dans HCl 1N (3 fois 10 ml) puis lavé à l'eau jusqu'à neutralité. On sèche à nouveau au vide poussé puis suspend la substance dans 10 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud, lave au méthanol chaud et sèche au vide poussé à 40°. On obtient ainsi 1,78 g (77%) de *β*-benzylthio-propionyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyL-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide de F. 236–238°. $[\alpha]_D^{25} = -34^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide).

$C_{63}H_{84}O_{14}N_{12}S_3$ Calc. C 56,9 H 6,4 O 16,8 N 12,6 S 7,2%
(1329,7) Tr. „ 56,7 „ 6,4 „ 17,1 „ 12,3 „ 7,2%

b) Ce désamino-nona peptide protégé a été également préparé par la méthode à l'azide, dans les conditions décrites sous I, à partir de l'hydrazide VIII et de l'hexapeptide L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyL-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide [2], mais dans un état de pureté inférieur à celui obtenu sous a).

Désamino¹-Ile³-Orn⁸-vasopressine (XIV). On dissout 1,50 g (1,11 mmole) de désamino-nona peptide protégé XIII dans environ 300 ml d'ammoniac redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute du sodium jusqu'à persistance de la coloration bleue. Après adjonction de 0,8 g de NH₄Cl, on évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 900 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à environ 8 au moyen de NH₄OH 4N, ajoute 1,35 ml d'H₂O₂ 1M et agite à température ordinaire jusqu'à réaction négative au nitroprussiate (env. 15 min). Après acidification à pH 4–4,5 au moyen d'acide acétique glacial, on adsorbe le peptide sur 150 ml d'amberlite CG-50 (cycle acide) et, après lavage par 700 ml d'acide acétique à 1% pour éliminer les sels [19], élue la substance par 400 ml d'acide acétique à 50%. L'éluat est évaporé au vide à 30° et le résidu est soumis à une distribution en contre-courant dans le système *s*-butanol/cau/acide acétique 120:160:1. Après 200 transferts, on détermine colorimétriquement [20] sur des aliquotes la position du sommet principal ($K = 0,24$), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore le *s*-butanol et concentre la solution aqueuse au vide à 30° puis lyophilise. On obtient ainsi 568 mg de poudre contenant 81 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 480 mg (44%) de désamino¹-Ile³-Orn⁸-vasopressine (base). $[\alpha]_D^{25} = -84^\circ$ ($c = 1,7$ [base libre; calculé sur la base du dosage d'azote peptidique]; acide acétique 0,1N). $E_{1,9}^0 = 0,55$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,45$ His. $Rf_M^0 = 0,35$; $Rf_P^0 = 0,15$; $Rf_A^0 = 0,45$ (échantillon chromatographié à l'état de chlorhydrate; révélation par ninhydrine, chlore et FOLIN). Un témoin d'arginine-vasopressine a donné les valeurs suivantes: $E_{1,9}^0 = 0,9$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,6$ His. $Rf_M^0 = 0,30$; $Rf_P^0 = 0,10$; $Rf_A^0 = 0,45$. L'hydrolyse totale (HCl 6N, 24 h à 110° en l'absence d'air) a fourni les proportions suivantes des acides aminés³): Tyr 0,94 (calc. 1,00); Ile 0,97 (1,00); Glu 1,00 (1,00); Asp 1,01 (1,00); Pro 0,99 (1,00); Orn 1,00 (1,00); Gly 0,96 (1,00); NH₃ 2,45 (3,00); total [disulfure mixte de cystéine et d'acide *β*-mercaptopropionique + demi-cystine]⁴): 1,13 (1,00). Pour l'analyse, un échantillon du peptide est séché au vide poussé, 16 h à 100°.

$C_{42}H_{64}O_{12}N_{12}S_2 \cdot 1CH_3COOH \cdot 2H_2O$ Calc. C 48,5 H 6,7 O 23,5 N 15,4 S 5,9%
(1089,3) Tr. „ 48,1 „ 7,4 „ 23,5 „ 15,5 „ 5,8%

4. Synthèse de la désamino¹-Phe²-Ile³-Orn⁸-vasopressine

β-Benzylthio-propionyl-L-phénylalanyl-L-isoleucinate de méthyle (XVI). On dissout 11,6 g 27,2 mmoles) de N-CBO-L-phénylalanyl-L-isoleucinate de méthyle [16] dans 150 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, laisse séjourner 1 h à 25° et évapore

à sec au vide à 30°. Après triturations répétées dans l'éther sec, dissolution dans du méthanol anhydre et évaporation au vide à 30°, le produit, à l'aspect vitrifié, est dissous dans 20 ml d'eau. On refroidit à 0°, ajoute une solution, également refroidie, de 3,7 g de K_2CO_3 dans 10 ml d'eau et extrait à l'acétate d'éthyle glacé (3 fois 50 ml). La phase organique, contenant le *L*-phénylalananyl-*L*-isoleucinate de méthyle (XV), est rapidement séchée sur $MgSO_4$, filtrée, puis additionnée de 10,2 g (27,2 mmoles) de β -benzylthio-propionate de trichloro-2, 4, 5-phényle [6]. On concentre à 50 ml, au vide à 10°, et laisse séjourner une nuit à 25°. La solution est diluée par 50 ml d'acétate d'éthyle et lavée par HCl 1N, H_2O , $KHCO_3$ 1N, H_2O , puis séchée sur Na_2SO_4 et évaporée au vide à 30°. On élimine le trichlorophénol en dissolvant l'épais sirop obtenu dans 100 ml d'éther et en le reprécipitant par addition de 250 ml d'éther de pétrole. On centrifuge et répète l'opération. Après séchage au vide poussé à 20°, on obtient 9,1 g (71%) de β -benzylthio-propionyl-*L*-phénylalananyl-*L*-isoleucinate de méthyle amorphe, de F. env. 102°. $[\alpha]_D^{22} = -13,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,8$; diméthylformamide). Homogène à la chromatographie sur couche mince (silicagel; benzène/acétone 2:1; révélation par vapeurs d'iode).

$C_{26}H_{34}O_4N_2S$ (470,6)	Calc. C 66,4	H 7,3	O 13,6	N 6,0	S 6,8%
	Tr. „ 66,1	„ 7,4	„ 13,9	„ 6,1	„ 7,0%

*β -Benzylthio-propionyl-*L*-phénylalananyl-*L*-isoleucyl-hydrazide (XVII)*. On dissout 2,35 g (4,0 mmoles) d'ester peptidique XVI dans 20 ml d'hydrazine anhydre et laisse séjourner une nuit à 25°. Le précipité formé est essoré, lavé à l'eau et au méthanol, puis séché au vide à 50°. On obtient 2,24 g de produit (F. 202–204°) qu'on recrystallise dans 10 ml de diméthylformamide chaud. Par refroidissement la solution se prend en une masse épaisse qu'on dilue par 10 ml de méthanol. Après filtration, lavage au moyen du mélange diméthylformamide/méthanol 1:1 puis de méthanol seul et séchage au vide poussé à 50°, on obtient 1,70 g (72%) de β -benzylthio-propionyl-*L*-phénylalananyl-*L*-isoleucyl-hydrazide de F. 208–210°, homogène à la chromatographie sur couche mince (silicagel, méthanol; révélation par vapeurs d'iode). Pour l'analyse, on recrystallise le produit encore une fois dans les mêmes conditions. F. 211°. $[\alpha]_D^{22} = -19,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,6$; diméthylformamide). $E_{1,9}^0 = 0,35$ Try (révélation par chlore et FOLIN).

$C_{25}H_{34}O_3N_4S$ (470,6)	Calc. C 63,8	H 7,3	O 10,2	N 11,9	S 6,8%
	Tr. „ 63,6	„ 7,5	„ 10,5	„ 11,6	„ 6,9%

*N-Benzoyloxycarbonyl-*L*-phénylalananyl-*L*-isoleucyl-*L*-glutaminy-*L*-asparaginy-*S*-benzyl-*L*-cystéiny-*L*-prolyl-*N*^δ-tosyl-*L*-ornithyl-glycinamide (XVIII)*. On dissout 8,48 g (8,58 mmoles) d'heptapeptide X et 4,72 g (9,86 mmoles) de N-CBO-*L*-phénylalaninate de trichloro-2, 4, 5-phényle [14] dans 55 ml de diméthylformamide et laisse la solution séjourner 20 h à 25°. On ajoute 80 ml d'acétate d'éthyle, sépare par centrifugation le précipité formé, le suspend dans 250 ml de mélange diméthylformamide/acétate d'éthyle 1:4 puis trois fois dans 250 ml d'acétate d'éthyle, en centrifugeant chaque fois. Après séchage au vide, on triture le produit dans HCl 1N (3 fois 30 ml), lave à l'eau jusqu'à neutralité, sèche au vide puis suspend dans 20 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud, lave au méthanol et sèche au vide poussé à 40°. On obtient ainsi 7,28 g (67%) de N-CBO-*L*-phénylalananyl-*L*-isoleucyl-*L*-glutaminy-*L*-asparaginy-*S*-benzyl-*L*-cystéiny-*L*-prolyl-*N*^δ-tosyl-*L*-ornithyl-glycinamide de F. 237–238°. $[\alpha]_D^{22} = -51,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,1$; acide acétique à 95%).

$C_{61}H_{80}O_{14}N_{12}S_2$ (1269,5)	Calc. C 57,7	H 6,4	O 17,6	N 13,2	S 5,1%
	Tr. „ 57,4	„ 6,9	„ 17,8	„ 13,0	„ 4,9%

*L-Phénylalananyl-*L*-isoleucyl-*L*-glutaminy-*L*-asparaginy-*S*-benzyl-*L*-cystéiny-*L*-prolyl-*N*^δ-tosyl-*L*-ornithyl-glycinamide (XIX)*. On dissout 7,00 g (5,44 mmoles) d'octapeptide protégé XVIII dans 40 ml d'acide acétique anhydre en chauffant à 50°, refroidit à 25°, ajoute 160 ml d'une solution 4N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre et laisse séjourner 1 h à 25°. On introduit la solution dans 1 l d'éther sous vive agitation, filtre et lave abondamment à l'éther le bromhydrate d'octapeptide ayant précipité. Après séchage au vide, le produit est dissous dans 75 ml du mélange diméthylformamide/ H_2O /méthanol 2:2:3, et la solution ainsi obtenue est secouée 10 min avec 100 ml d'amberlite IRA-410 (cycle basique). Après filtration, lavage au moyen du même mélange (3 fois 50 ml), évaporation au vide poussé à 30°, le résidu est trituré dans l'acide acétique 0,05N (3 fois 20 ml) puis séché au vide poussé à 30°. On obtient ainsi 3,89 g (62%) de *L*-phénylalananyl-*L*-isoleucyl-*L*-glutaminy-*L*-asparaginy-*S*-benzyl-*L*-cystéiny-*L*-prolyl-*N*^δ-tosyl-*L*-ornithyl-glycinamide de F. 195–198°. $[\alpha]_D^{22} = -52,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,5$; acide acétique à

95%). $E_{1,9}^0 = 0,47$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,0$; $Rf_M^0 = 0,65$; $Rf_A^0 = 0,7$ (produit chromatographié à l'état de formiate; révélation par ninhydrine et chlore).

$C_{53}H_{74}O_{12}N_{12}S_2 \cdot 1H_2O$ (1153,4)	Calc. C 55,2 H 6,6 O 18,0 N 14,6 S 5,6%
	Tr. „ 54,8 „ 6,8 „ 17,9 „ 14,4 „ 5,5%

β -Benzylthio-propionyl-L-phénylalanyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide (XX). — a) On dissout 2,32 g (2,01 mmoles) d'octapeptide XIX dans 30 ml de diméthylformamide, ajoute 0,90 g (2,40 mmoles) de β -benzylthio-propionate de trichloro-2,4,5-phényle [6] et laisse séjourner 2 jours à 25°. A la solution prise en masse on ajoute 120 ml d'acétate d'éthyle, centrifuge, lave le culot par 50 ml de mélange diméthylformamide/acétate d'éthyle 1:4, puis à l'acétate d'éthyle seul (3 fois 50 ml). Après séchage au vide, le produit est trituré dans HCl 1N (3 fois 10 ml) puis à l'eau jusqu'à neutralité. On sèche à nouveau au vide poussé puis suspend la substance dans 10 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud, lave au méthanol chaud et sèche au vide poussé à 40°. On obtient ainsi 2,21 g (83%) de β -benzylthio-propionyl-L-phénylalanyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide de F. 239–240°. $[\alpha]_D^{23} = -35^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,5$; diméthylformamide).

$C_{63}H_{84}O_{13}N_{12}S_3 \cdot 1H_2O$ (1331,7)	Calc. C 56,8 H 6,5 O 16,8 N 12,6 S 7,2%
	Tr. „ 56,7 „ 6,4 „ 17,0 „ 12,8 „ 7,4%

b) Ce désamino-nonapeptide protégé a été également préparé par la méthode à l'azide, dans les conditions décrites sous 1, à partir de l'hydrazide XVII et du L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-N^δ-tosyl-L-ornithyl-glycinamide [2], mais dans un état de pureté inférieur à celui obtenu sous a).

Désamino¹-Phe²-Ile³-Orn⁸-vasopressine (XXI). On dissout 1,50 g (1,13 mmole) de désamino-nonapeptide protégé XX dans environ 300 ml d'ammoniac redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute du sodium jusqu'à persistance de la coloration bleue. Après adjonction de 0,8 g de NH₄Cl, on évapore à sec au vide, dissout le résidu dans 900 ml d'acide acétique 0,01N, ajuste le pH à environ 8 au moyen de NH₄OH 4N, ajoute 1,35 ml d'H₂O₂ 1M et agit à température ordinaire jusqu'à réaction négative au nitroprussiate (env. 15 min). Après acidification à pH 4–4,5 au moyen d'acide acétique glacial, on adsorbe le peptide sur 150 ml d'amberlite CG-50 (cycle acide) et, après lavage par 700 ml d'acide acétique à 1% pour éliminer les sels [19], élue la substance par 400 ml d'acide acétique à 50%. L'éluat est évaporé au vide à 30° et le résidu est soumis à une distribution en contre-courant dans le système *s*-butanol/eau/acide acétique 120:160:1. Après 200 transferts, on détermine colorimétriquement [20] sur des aliquotes la position du sommet principal ($K = 0,32$), réunit le contenu des tubes centraux de celui-ci, évapore le *s*-butanol et concentre la solution aqueuse au vide à 30° puis lyophilise. On obtient ainsi 430 mg de poudre contenant 58 mg d'azote peptidique, ce qui correspond à 338 mg (31%) de désamino¹-Phe²-Ile³-Orn⁸-vasopressine (base). $[\alpha]_D^{23} = -119^\circ$ ($c = 1,1$ [base libre; calculé sur la base du dosage d'azote peptidique]; acide acétique 0,1N). $E_{1,9}^0 = 0,6$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,45$ His. $Rf_M^0 = 0,4$; $Rf_P^0 = 0,2$; $Rf_A^0 = 0,45$ (échantillon chromatographié à l'état de chlorhydrate). Un témoin d'arginine-vasopressine a donné les valeurs suivantes: $E_{1,9}^0 = 0,9$ Try; $E_{5,8}^0 = 0,6$ His. $Rf_M^0 = 0,30$; $Rf_P^0 = 0,10$; $Rf_A^0 = 0,45$. L'hydrolyse totale (HCl 6N, 24 h à 110° en l'absence d'air) a fourni les proportions suivantes des acides aminés³): Phe 0,97 (calc. 1,00); Ile 0,97 (1,00); Glu 1,02 (1,00); Asp 1,02 (1,00); Pro 1,01 (1,00); Orn 0,99 (1,00); Gly 0,99 (1,00); NH₃ 2,60 (3,00); total [disulfure mixte de cystéine et d'acide β -mercapto-propionique + demi-cystine]⁴): 0,95 (1,00). Pour l'analyse, un échantillon de peptide est séché au vide poussé, 16 h à 100°.

$C_{42}H_{64}O_{11}N_{12}S_2 \cdot 1CH_3COOH \cdot 2H_2O$ (1073,3)	Calc. C 49,2 H 6,8 O 22,4 N 15,7 S 6,0%
	Tr. „ 49,2 „ 6,7 „ 22,3 „ 15,6 „ 6,2%

SUMMARY

Four analogues of the vasopressins have been synthesised: Deamino¹-Orn⁸-vasopressin, Deamino¹-Phe²-Orn⁸-vasopressin, Deamino¹-Ile³-Orn⁸-vasopressin (= Deamino¹-Orn⁸-oxytocin) and Deamino¹-Phe²-Ile³-Orn⁸-vasopressin (= Deamino¹-Phe²-Orn⁸-oxytocin). The two former have been prepared by condensation of tripeptide

azides with an hexapeptide. The two latter have been obtained from the hexapeptide by the recurring method, using active trichlorophenyl esters.

Comparison of the biological activities of these compounds with those of the corresponding analogues still bearing the α -amino group shows that suppression of this amino group decreases the pressoric/antidiuretic ratio of these compounds.

Laboratoires de Chimie pharmaceutique
SANDOZ S. A., Bâle

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **46**, 1669 (1963).
- [2] R. L. HUGUENIN, *Helv.* **47**, 1934 (1964).
- [3] V. DU VIGNEAUD, G. WINESTOCK, V. V. S. MURTI, D. B. HOPE & R. D. KIMBROUGH, *J. biol. Chemistry* **235**, PC 64 (1960); D. B. HOPE, V. V. S. MURTI & V. DU VIGNEAUD, *ibid.* **237**, 1563 (1962).
- [4] W. Y. CHAN & V. DU VIGNEAUD, *Endocrinology* **71**, 977 (1962); R. D. KIMBROUGH, W. D. CASH, L. A. BRANDA, W. Y. CHAN & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **238**, 1411 (1963).
- [5] R. L. HUGUENIN, E. STÜRMER, R. A. BOISSONNAS & B. BERDE, *Experientia* **21**, 68 (1965).
- [6] R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **49**, 695 (1966).
- [7] R. L. HUGUENIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **45**, 1629 (1962).
- [8] E. STÜRMER, R. L. HUGUENIN, R. A. BOISSONNAS & B. BERDE, *Experientia* **21**, 583 (1965).
- [9] P. G. KATSOYANNIS & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **233**, 1352 (1958); B. BERDE, R. L. HUGUENIN & E. STÜRMER, *Experientia* **18**, 444 (1962); M. BODANSZKY, M. A. ONDETTI, C. A. BIRKHIMER & P. L. THOMAS, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 4452 (1964).
- [10] R. A. BOISSONNAS & ST. GUTTMANN, *Helv.* **43**, 190 (1960); J. MEIENHOFER & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 6336 (1960).
- [11] R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, *Helv.* **43**, 182 (1960); voir également [7] (note 8) et [12] (tableau Nr. 8); R. D. KIMBROUGH & V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chemistry* **236**, 778 (1961).
- [12] B. BERDE & R. A. BOISSONNAS, dans «The Pituitary Gland» **3**, p. 624 (Ed.: G. W. HARRIS, Butterworths, London 1965).
- [13] P. A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, cité dans [12].
- [14] J. PLESS & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **46**, 1609 (1963).
- [15] A. SCHÖNBERG & Y. ISKANDER, *J. chem. Soc.* **1942**, 90.
- [16] E. SANDRIN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **46**, 1637 (1963).
- [17] TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* **67**, 257 (1955).
- [18] ST. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **43**, 200 (1960).
- [19] H. B. F. DIXON, *Biochim. biophysica Acta* **34**, 251 (1959).
- [20] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 (1951).

83. Über die adrenale Steroid-Biosynthese *in vitro*

III. Selektive Hemmung der Nebennierenrinden-Funktion

von F. W. Kahnt und R. Neher

(I. XII. 65)

1. Möglichkeiten und praktische Anwendung der pharmakologischen Regulierung der Sekretion der Nebennierenrinde haben in den letzten Jahren erheblich zugenommen [1] [2]. Von den zahlreichen Angriffspunkten, welche das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-System hierzu bietet [2] [3], erschien uns die *direkte Einwirkung* auf die Biosynthese in der Nebennierenrinde selbst von besonderem Interesse, da