

liquide. La réaction est exothermique; après refroidissement, on filtre rapidement le précipité de chlorure d'ammonium formé, sans précautions spéciales puisque l'alcoolate reste en solution dans un milieu qui le protège de l'humidité de l'air. Le filtrat est évaporé sous vide. Le résidu huileux, qui se prend assez rapidement en masse, est séché à 60° sous 10^{-2} – 10^{-3} Torr. Le rendement est quantitatif. Le précipité recueilli contient, en plus du chlorure d'ammonium formé par la réaction, un composé d'addition avec l'ammoniac qui n'a pas été analysé mais dont on a pu constater, à 80°, la décomposition rapide en composés gazeux.

Y[OCH(CF ₃) ₂] ₃	Calc. Y	15,1	C 18,3	F 58,0	H 0,5%
	Tr. "	15,8	–	–	–
La[OCH(CF ₃) ₂] ₃	Calc. La	21,7	C 16,9	F 53,4	H 0,5%
	Tr. "	21,4	" 16,9	" 53,0	" 0,7%
Nd[OCH(CF ₃) ₂] ₃	Calc. Nd	22,4	C 16,8	F 53,0	H 0,5%
	Tr. "	24,0	" 16,8	" 51,9	" 0,7%
Er[OCH(CF ₃) ₂] ₃	Calc. Er	25,0	C 16,2	F 51,2	H 0,5%
	Tr. "	26,1	" 15,8	" 50,4	" 0,6%

La terre rare a été dosée par complexométrie, avec (NH₄)₃H(EDTA) 0,01 M, en présence du tampon urotropine et avec le xylène-orange comme indicateur [7]. Les dosages de C, F, et H ont été effectués par A. Bernhardt, Mikroanalytisches Laboratorium, Elbach, Allemagne.

Ce travail fait partie d'un projet de recherche subventionné par la Lonza SA, Bâle, que nous remercions très chaleureusement de son aide précieuse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] K. S. Mazdhyasni, C. T. Lynch & J. S. Smith, J. Amer. Ceram. Soc. 48, 372 (1965).
- [2] K. S. Mazdhyasni, C. T. Lynch & J. S. Smith, Inorg. Chemistry 5, 342 (1966).
- [3] R. P. N. Sinha, Science & Culture 25, 594 (1960); S. N. Misra, T. N. Misra, R. N. Kapoor & R. C. Mehrotra, Chemistry & Ind. 1963, 120; S. Sankhla, S. N. Misra & R. N. Kapoor, *ibid.* 1965, 382; J. M. Batwara, U. D. Tripathi, R. K. Mehrotra & R. C. Mehrotra, *ibid.* 1966, 1379.
- [4] P. N. Kapoor, R. N. Kapoor & R. C. Mehrotra, Chemistry & Ind. 1968, 1314.
- [5] R. C. Mehrotra, Inorg. chim. Acta Rev. 1, 99 (1967).
- [6] A. Merbach, M.-N. Pitteloud & P. Jaccard, Helv. 55 (1972), sous presse.
- [7] G. Brunisholz, J.-P. Quinche & Abdel Magid Kalo, Helv. 47, 14 (1964).

297. Synthèse en phase solide de l'hormone de libération de l'hormone lutéotrophique (LH-RH)

par Pierre Rivaille¹), Arthur Robinson²), Martin Kamen²) et Gérard Milhaud¹)

Service de biophysique, Faculté de médecine St-Antoine,
27, rue Chaligny, F-75 Paris XIIème

(3 XI 71)

Summary. A rapid and convenient synthesis of LH-RH using the benzylhydramine resin is described.

L'hormone de libération de l'hormone lutéotrophique (LH-RH) a été isolée à partir d'hypothalamus de porc, purifiée et sa séquence déterminée par Shally et coll. [1]. Il s'agit du décapeptide (I):

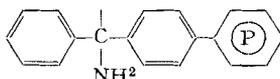
- ¹) Laboratoire associé au C.N.R.S., Laboratoire des Isotopes, Faculté de Médecine St-Antoine, 27 rue Chaligny, (75) Paris 12e, France.
- ²) Department of Chemistry, U.S.C.D., La Jolla, California 92037, U.S.A.

Pyro Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH₂

I

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

La synthèse en phase solide met en jeu la benzylhydramine-résine (II) proposée par *Pietta & Marshall* [2], qui permet d'obtenir directement des peptides portant un groupement terminal amide lors du clivage par l'acide fluorhydrique liquide [3]. Avec le Dr *Rivier*³⁾, nous avons mis au point une méthode de préparation et d'utilisation de cette résine permettant d'incorporer à une chaîne peptidique 2 à 3 acides aminés par jour à l'aide d'un appareil de synthèse manuel.



II

Cette résine porte un groupe NH₂ sur lequel le premier acide aminé est couplé par méthode classique à la dicyclohexylcarbodiimide (DCCI); la réaction est contrôlée à l'aide de la coloration à la ninhydrine [4]. La résine permet de n'utiliser que les sites les plus réactifs: lorsqu'une quantité suffisante de *t*-Boc-aminoacide a réagi, on inactive par acétylation les sites résiduels qui pourraient donner lieu à des réactions secondaires gênantes [5].

Au cours de la synthèse de la LH-RH, nous avons incorporé, par la méthode à la DCCI, tous les acides aminés sous forme de leur dérivés à fonction amine protégée par le *t*-butoxycarbonyl (*t*-Boc). La fonction guanidyle de l'arginine a été bloquée par un groupe nitro, et la fonction imidazolyle de l'histidine, par un dinitrophényle qui est éliminé ensuite par thiolysse [6].

L'élimination des *t*-Boc est faite par un traitement à l'acide trifluoroacétique dans le chlorure de méthylène, et la neutralisation, par de la triéthylamine dissoute dans le même solvant. Dès l'incorporation du tryptophane, on clive les *t*-Boc à l'aide du mélange CF₃COOH/CH₂Cl₂ contenant de l'éthanedithiol-1,2 (1%) pour éviter l'oxydation de cet acide aminé. Après le traitement acide, la résine est lavée avec du CH₂Cl₂ pur ou additionné d'éthanedithiol-1,2 (1%). Après incorporation du tryptophane, le couplage de l'arginine s'effectue dans le mélange diméthylformamide/CH₂Cl₂ (1:1, *v/v*) [7]; ce mélange est utilisé au cours des couplages suivants et pour les lavages après l'étape de neutralisation. Au bout de deux heures de couplage, la résine est lavée alternativement par du CH₂Cl₂ et du méthanol absolu pour la gonfler, puis la contracter, on élimine ainsi la dicyclohexylurée formée et d'autres impuretés. On effectue alors le test à la ninhydrine [4] qui est négatif dans tous les cas, sauf pour l'arginine qui doit être couplée deux fois à la proline.

Le peptide est séparé de la résine par traitement à l'acide fluorhydrique liquide en présence d'anisole et d'indole pour éviter l'oxydation du tryptophane [3], puis purifié par filtration sur gel. Il apparaît homogène à l'analyse électrophorétique sur papier et à l'analyse chromatographique en couche mince sur gel de silice. L'hydrolyse acide donne la composition suivante en acides aminés:

	Ser	Glu	Pro	Gly	Leu	Tyr	His	Arg
Valeur théorique	1	1	1	2	1	1	1	1
Valeur trouvée	0,88	1,02	0,91	2,0	1,0	1,04	0,95	1,11

³⁾ Salk Institute, La Jolla, California 92037, U.S.A.

Partie expérimentale. – Les *t*-Boc-amino-acides proviennent de la *Fox Chemical Company* (Los Angeles, California). L'analyse des acides aminés est effectuée à l'aide de l'analyseur *Beckman* type 121. La quantité de glycine fixée sur la résine est déterminée après 2 h d'hydrolyse en tube scellé sous vide en présence du mélange HCl conc./acide propionique (1:1, *v/v*) [8] à 130°. L'hydrolyse du peptide purifié est faite en tube scellé sous vide en présence d'HCl 6N (110°–24 h).

1. *Benzyl-cétorésine*. Dans un ballon tricol de 2 l, muni d'un agitateur, on laisse gonfler pendant 2 h, 50 g de polystyrène à 1% de divinylbenzène Bio-rad SX₁ (200–400 mesh) dans 350 ml de nitrobenzène. Dans un autre ballon, on dissout 66 g de AlCl₃ dans 300 ml de nitrobenzène auxquels on ajoute 80 ml de chlorure de benzoyle. Le mélange est versé dans le premier ballon sous bonne agitation, maintenue pendant 2 h à température ambiante. Si la résine gonfle trop, on ajoute du nitrobenzène (100 ml environ). On filtre, lave, avec du dioxane (3 ×), de l'acide acétique (3 ×), du méthanol (3 ×) et enfin, alternativement, avec CH₂Cl₂ et CH₃OH pour faire gonfler et contracter la résine en laissant chaque fois un temps de contact suffisant. On sèche dans un dessiccateur sous vide toute la nuit (rendement 75 g).

2. *Benzylhydrilamine résine*. Dans un ballon de 1 l muni de «Dean Stark» et d'un agitateur, on chauffe 500 g de formiate d'ammonium à 120–130°C, pendant 1 à 2 h. On ajoute la résine (50 g) en une seule fois et laisse la température monter à 160–165°, en une demi-heure, sous agitation efficace qui est maintenue pendant 6 heures. On filtre, lave à l'eau, puis on traite comme ci-dessus pour la benzylcétorésine. La résine séchée sous vide est chauffée à reflux et agitée pendant 8 h dans HCl 6N. Elle est ensuite filtrée et lavée comme précédemment. La capacité de fixation varie, selon la nature de l'acide aminé, entre 0,3 et 0,5 mMole/g.

3. *Préparation de la LH-RH*. L'appareil utilisé permet d'agiter mécaniquement un tube en pyrex de 25 ml dont le compartiment central contient la résine (2 g). Aux extrémités du tube, 2 filtres de verre fritté sont destinés à l'introduction puis à l'élimination des réactifs (environ 15 ml).

A) *Le couplage des acides aminés comporte les temps suivants*:

a) Libération du groupe aminé. On traite la résine par le mélange CF₃COOH–CH₂Cl₂ (1:1, *v/v*), pendant 1 min, on filtre et on répète l'opération en laissant 15 min au contact.

b) On lave la résine avec CH₂Cl₂ (3 ×, 1 min).

c) On élimine CF₃COOH en traitant deux fois la résine par le mélange Et₃N/CH₂Cl₂ (12,5:87,5, *v/v*) (temps de contact: 1 min, puis 5 min).

d) On lave avec CH₂Cl₂ (8 ×).

e) Pour chaque mMole de glycine fixée initialement sur la résine, on fait réagir 4 mMoles d'acides aminés protégés, dissous dans CH₂Cl₂, à l'exception de la nitroarginine qui est mise en solution dans (CH₃)₂NCHO. Dans le cas présent, la résine avait fixé 0,5 mMole de glycine/g.

f) On laisse 5 min sous agitation en milieu CH₂Cl₂ ou CH₂Cl₂/(CH₃)₂NCHO dans le cas de l'arginine et des acides aminés suivants.

g) On ajoute 2 mMoles de DCCI dissous dans CH₂Cl₂, puis on reprend l'agitation pendant une heure; on ajoute alors 2 autres mMoles de DCCI et on continue à agiter pendant une heure.

h) Lavage successif avec CH₂Cl₂, puis CH₃OH absolu (3 ×).

i) Réaction à la ninhydrine sur un échantillon de la résine.

j) Lavage avec CH₂Cl₂ (3 ×) avant le clivage décrit en (a).

Le couplage de l'arginine et des acides aminés suivants est effectué en milieu (CH₃)₂NCHO–CH₂Cl₂ (1:1, *v/v*). Après l'incorporation du tryptophane et lors des étapes ultérieures, on ajoute 1% d'éthanedithiol-1,2 au CH₂Cl₂–CF₃COOH (étape a) et au CH₂Cl₂ (étape b).

B) *Libération du décapeptide de la résine*: On distille 10 ml d'acide fluorhydrique, passé sur CoF₃, dans le mélange de 1 g de résine, 1 ml d'anisole et 500 mg d'indole. On agite 1 h à 0° puis 1/2 h à température ambiante. On chasse l'acide sous vide, on lave la résine à l'éther et on la reprend par 3 × 10 ml d'acide acétique à 10%. Le filtrat, lyophilysé, laisse 400 mg de produit brut.

C) *Élimination du groupe DNP de l'histidine*: Le produit précédent est repris par une solution méthanol/triéthylamine 0,1M aqueuse amenée à pH 8,2 avec (NH₄)₂CO₃ (1:1, *v/v*). On ajoute 2 ml de mercaptoéthanol et on agite pendant 12 h à température ambiante. On évapore le méthanol et on lyophilysé la solution aqueuse.

D) *Purification*: 40 mg de peptide brut sont placés au sommet d'une colonne de Sephadex G15 (diamètre 2,5 cm, longueur 51 cm, volume mort 80 ml), puis élués à l'aide d'acide acétique 0,1M. On collecte des fractions de 2,5 ml en 9 min et on suit l'élué à l'aide d'un enregistreur UV. à

280 nm. La LH-RH apparaît entre les fractions 47 et 58. Le peptide est purifié deux fois de la même façon et on obtient 10 mg de produit pur.

Analyse chromatographique sur gel de silice *Eastman Kodak Rf 0,24* dans le mélange de solvants *n*-ButOH–AcOH–H₂O (4:1:1, *v/v*). Analyse électrophorétique sur papier *Whatman n° 1*, 400 V, 10 mA. Migration 12 cm en milieu AcOH–HCOOH–H₂O (8:2:90, *v/v*).

4. *Activité biologique chez l'Homme*. Le décapeptide a été administré, par voie veineuse, à deux hommes normaux, à raison de 500 µg et 100 µg, lors de deux épreuves successives pour chaque sujet. Les injections ont été parfaitement tolérées et n'ont donné lieu à aucun trouble ou malaise. L'administration du décapeptide provoque entre la 20ème et la 25ème minute, une augmentation maximale du taux de l'hormone lutéotrophique circulante de 760 et 690% pour une dose de 500 µg, et de 600 et 500% pour une dose de 100 µg, par rapport à la moyenne des valeurs initiales (temps — 10 min et 0 min). En revanche, l'augmentation des taux de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) est soit nulle soit faible (160% de la valeur initiale), puisqu'une augmentation n'est observée qu'une seule fois dans les quatre épreuves, et ceci pour la dose de LH–RH la plus élevée [9]. Chez l'homme, l'activité du produit synthétique est supérieure à celle qui a été observée pour le produit extractif, puisque ce dernier provoque une élévation maximale du taux de LSH de 380% pour une dose de 90 µg et de 400% pour une dose de 810 µg (10), alors que les taux initiaux sont semblables dans les deux études [9] [10].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *A. V. Shally, Y. Baba, A. Arimura & T. W. Redding*, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **42**, 50 (1971); *A. V. Shally, A. Arimura, Y. Baba, R. M. G. Nair, H. Matsuo, T. W. Redding & L. Debelfuk*, *ibid.* **43**, 393 (1971); *H. Matsuo, Y. Baba, R. M. G. Nair, A. Arimura & A. V. Shally*, *ibid.* **43**, 1334 (1971); *Y. Baba, H. Matsuo & A. V. Shally*, *ibid.* **44**, 459 (1971).
- [2] *P. G. Pietta & G. R. Marshall*, *Chem. Commun.* **1970**, 650.
- [3] *J. M. Stewart & J. D. Young*, «Solid Phase Peptide Synthesis», p. 41, W. H. Freeman edit., London 1969.
- [4] *E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger & P. I. Cook*, *Analyt. Biochemistry* **34**, 595 (1970).
- [5] *R. B. Merrifield*, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2149 (1963).
- [6] *F. Chillemi & R. B. Merrifield*, *Biochemistry* **8**, 4344 (1969).
- [7] *F. C. Westall & A. B. Robinson*, *J. org. Chemistry* **35**, 2842 (1970).
- [8] *J. Scotchler, R. Lozier & A. B. Robinson*, *J. org. Chemistry* **35**, 3151 (1970).
- [9] *G. Milhaud, P. Rivaille, P. Garnier, J. L. Chaussain, E. Binet & J. C. Job*, *C.r. hebd. Séances Acad. Sci., Série D*, **273**, 1858 (1971).
- [10] *A. J. Kastin, A. V. Schally, C. Gual, A. R. Midgley, M. C. Miller & A. Cabeza*, *J. clin. Invest.* **50**, 1551 (1971).

298. Steroide und Sexualhormone

241. Mitteilung [1]

Die Partialsynthese von 3β-Methoxy-3α, 9α-oxido-7α-hydroxy-11α-acetoxy-5β-steroiden

von R. Imhof, Frl. E. Gössinger, W. Graf, W. Schnüriger und H. Wehrli
Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich

(12. II. 71)

Summary. The preparation of the title compounds **11**, **37**, and **39** is described. **37** will serve as starting material for a partial synthesis of the steroidal alkaloid batrachotoxinin A (**1**).

Im Rahmen eines Programmes zur Partialsynthese des Steroidalkaloids Batrachotoxinin A (**1**)¹⁾ berichteten wir in den vorangegangenen Mitteilungen über den Aufbau

¹⁾ Vgl. [2] und die dort zitierten weiteren Arbeiten.