

Diese Angabe hat auch S. L. JENSEN gemacht³⁾. In Wirklichkeit haben wir aber in unserer Arbeit²⁾ gesagt: «in dem Strukturbild I ist die Stellung der beiden Methoxygruppen allerdings zunächst willkürlich; diese könnten eventuell an zwei anderen gesättigten C-Atomen der beiden Molekelenden (C-Atome 1-3 oder 30-32) stehen.»

Formel II ist daher auch von uns als eines der möglichen Strukturbilder in Erwägung gezogen worden.

Zürich, Chemisches Institut der Universität

³⁾ Acta chem. scand. 13, 381 (1959).

25. Synthèse de la Lys⁸-oxytocine (lysine-vasotocine) et nouvelle synthèse de la lysine-vasopressine

par R. A. BOISSONNAS et R. L. HUGUENIN

(27 XI 59)

L'oxytocine et les vasopressines n'ont pas une spécificité absolue dans leurs actions physiologiques. Les vasopressines possèdent en effet aussi une certaine activité oxytocique intrinsèque¹⁾ et l'oxytocine est également douée d'une faible activité vasopressique²⁾.

Un premier analogue possédant une structure intermédiaire entre celles de ces deux types d'hormones, la Phé³-oxytocine³⁾, avait déjà été synthétisé indépendamment par deux méthodes différentes par notre groupe⁴⁾ et par celui de DU VIGNEAUD⁶⁾.

Cet analogue possédait la même partie cyclique que les vasopressines et la même chaîne latérale que l'oxytocine. Ses activités biologiques étaient nettement plus faibles que les activités principales de ces hormones et se rapprochaient plutôt des activités secondaires de celles-ci, c'est-à-dire qu'il était environ aussi oxytocique que les vasopressines et aussi vasopressique que l'oxytocine. Il représentait donc un intermédiaire peu actif entre ces deux types d'hormones.

Dans un travail plus récent, KATSOYANNIS & DU VIGNEAUD⁷⁾ rapportent la synthèse d'un deuxième analogue de structure intermédiaire, l'Arg⁸-oxytocine (arginine-vasotocine), qui possède cette fois la partie cyclique de l'oxytocine et la chaîne latérale de l'arginine-vasopressine. Son activité vasopressique atteint environ un

¹⁾ E. A. POPENOE, J. C. PIERCE, V. DU VIGNEAUD & H. B. VAN DYKE, Proc. Soc. experim. Biol. Med. 81, 506 (1952); H. C. LAWLER & V. DU VIGNEAUD, *ibid.* 84, 114 (1953).

²⁾ V. DU VIGNEAUD, Experientia, Suppl. II, 14 (1955).

³⁾ Nous employons la même nomenclature que dans notre travail précédent: P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, Helv. 42, 788, note 1 (1959).

⁴⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A.-JAQUENOUD & J.-P. WALLER, Helv. 39, 1421 (1956).

⁵⁾ B. BERDE, W. DOEPFNER & H. KONZETT, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 72, 209 (1957).

⁶⁾ P. G. KATSOYANNIS, J. Amer. chem. Soc. 79, 109 (1957).

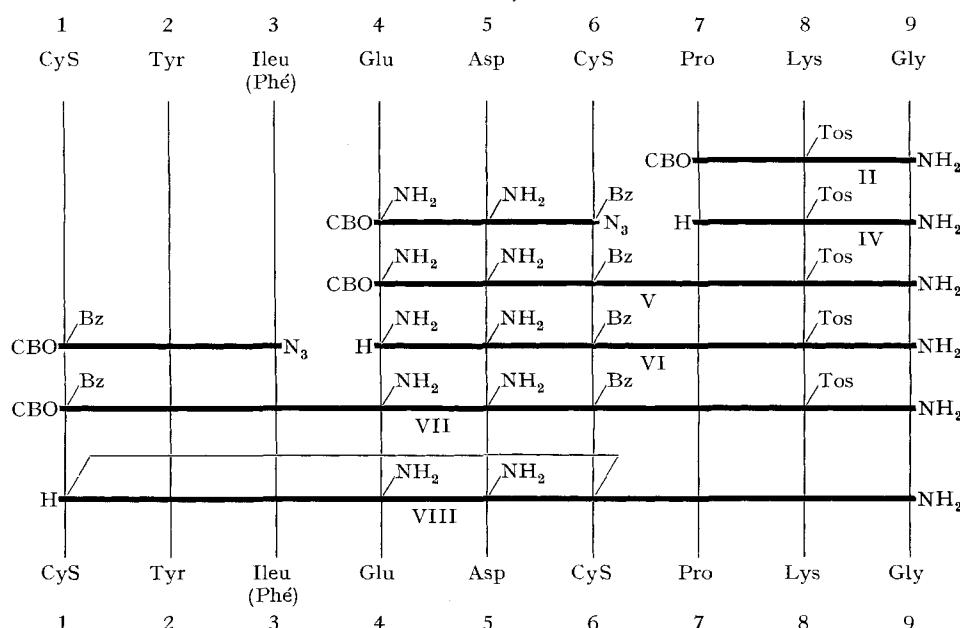
⁷⁾ P. G. KATSOYANNIS & V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry 233, 1352 (1958).

⁸⁾ Des propriétés biologiques complémentaires peuvent être tirées du travail de H. B. VAN DYKE, «Vasopressins», présenté au 21^e Congrès intern. de physiologie à Buenos-Aires en août 1959.

tiers de celle des vasopressines et son activité oxytocique, mesurée par différentes méthodes, est également voisine du tiers de celle de l'oxytocine. Il s'agit donc de nouveau d'un analogue présentant des propriétés biologiques intermédiaires entre celle de ces deux types d'hormones, mais avec cette fois-ci un niveau d'activité nettement supérieur à celui de la Phé³-oxytocine mentionnée ci-dessus.

Dans le présent travail, nous rapportons la synthèse de la Lys⁸-oxytocine (lysine-vasotocine), qui possède aussi la partie cyclique de l'oxytocine, mais la chaîne latérale de la lysine-vasopressine.

Schéma de synthèse



La synthèse de cet analogue a été effectuée selon le schéma 3 + (3 + 3) utilisé dans nos synthèses précédentes⁴⁾⁹⁾¹⁰⁾, schéma qui a aussi été partiellement adopté par RUDINGER et coll. dans leur synthèse de l'oxytocine¹¹⁾ et de quelques analogues¹²⁾, ainsi que par DU VIGNEAUD et coll. dans leurs synthèses récentes de l'arginine-vasopressine¹³⁾¹⁴⁾ et de l'Arg⁸-oxytocine⁷⁾.

Le N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinylazide⁹⁾ est condensé avec le L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (IV) en N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (V). Après éloigne-

⁹⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, Helv. 38, 1491 (1955).

¹⁰⁾ P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, Helv. 42, 788 (1959).

¹¹⁾ J. RUDINGER, J. HONZL & M. ZAORAL, Coll. czechosl. chem. Commun. 21, 202 (1956).

¹²⁾ J. RUDINGER, J. HONZL & M. ZAORAL, Coll. czechosl. chem. Commun. 21, 770 (1956).

¹³⁾ P. G. KATSOYANNIS, D. T. GISH, G. P. HESS & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 80, 2558 (1958).

¹⁴⁾ V. DU VIGNEAUD, D. T. GISH, P. G. KATSOYANNIS & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 80, 3355 (1958).

Tableau. Comparaison des propriétés biologiques de la Lys⁸-oxytocine avec celles de l'oxytocine, des vasopressines, de la Phé⁸-oxytocine et de l'Arg⁸-oxytocine

ment du groupe CBO- par le gaz bromhydrique dans l'acide acétique, l'hexapeptide obtenu est condensé avec le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucylazide⁹⁾ en N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (VIIa). La pureté de chacun de ces peptides protégés intermédiaires a été contrôlée, après scission du groupe CBO-, par chromatographie sur papier et par électrophorèse sur papier sous haut voltage¹⁵⁾.

Par scission des groupes S-benzyl-, N-CBO- et N-tosyl- à l'aide du sodium dans l'ammoniac liquide selon DU VIGNEAUD et coll.¹⁶⁾ et oxydation à l'air en solution aqueuse diluée, il a été obtenu une solution brute du nonapeptide cyclique. Celle-ci a été soumise à un contre-courant dans le système butanol secondaire - acide p-toluenesulfonique 0,08 M, qui a permis d'éloigner quelques impuretés peptidiques mineures. Le contenu du sommet principal ($K = 0,61$) s'est montré homogène à la chromatographie sur papier dans trois systèmes de solvants et à l'électrophorèse sur papier sous haut voltage à deux pH, la révélation étant chaque fois effectuée par une série de réactifs¹⁵⁾.

Les activités biologiques¹⁷⁾ de la Lys⁸-oxytocine, exprimées en unités internationales par mg de produit purifié, sont rassemblées dans un tableau qui contient également, à titre de comparaison, les valeurs correspondantes de l'oxytocine, de la lysine-vasopressine et de l'arginine-vasopressine, ainsi que celles de la Phé³-oxytocine et de l'Arg⁸-oxytocine. On voit que, dans l'ensemble, les activités biologiques de la Lys⁸-oxytocine sont parallèles à celles de l'Arg⁸-oxytocine, mais qu'elles n'atteignent que le tiers de celles-ci, bien que la lysine-vasopressine ait dans la plupart des tests les deux tiers des activités de l'arginine-vasopressine.

Nous avons utilisé le même schéma de synthèse 3 + 6 que ci-dessus pour effectuer une nouvelle synthèse de la lysine-vasopressine, qui avait déjà été préparée selon le schéma 5 + 4 par DU VIGNEAUD et coll.¹⁸⁾.

Par condensation du N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalanylazide⁴⁾ avec le L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (VI) nous avons obtenu le N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (VIIb). Après scission des groupes protecteurs par le sodium dans l'ammoniac liquide¹⁶⁾ et oxydation à l'air en solution aqueuse diluée, nous avons obtenu avec un rendement en activité d'environ 60% une solution brute de lysine-

¹⁵⁾ Voir la partie expérimentale.

¹⁶⁾ V. DU VIGNEAUD, CH. RESSLER, J. M. SWAN, C. W. ROBERTS & P. G. KATSOYANNIS, J. Amer. chem. Soc. 76, 3115 (1954).

¹⁷⁾ Les déterminations d'activité biologique ont été effectuées selon les méthodes précédemment utilisées⁵⁾ par le Prof. H. KONZETZ et le Dr B. BERDE de notre Département pharmacologique (Dir.: Dr A. CERLETTI). Les activités sont exprimées par rapport au «Troisième standard international pour la détermination des activités oxytociques, vasopressives et antidiurétiques». Des communications préliminaires sur les activités de cet analogue ont été données par H. KONZETZ au «Symposium on polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels» (Londres, 23-24 mars 1959) et par B. BERDE, A. CERLETTI & H. KONZETZ au «Symposium on oxytocin» (Montevideo, 17-19 août 1959).

¹⁸⁾ V. DU VIGNEAUD, M. F. BARTLETT & A. JÖHL, J. Amer. chem. Soc. 79, 5572 (1957); cf. aussi: M. F. BARTLETT, A. JÖHL, R. ROESKE, R. J. STEDMAN, F. H. C. STEWART, D. N. WARD & V. DU VIGNEAUD, *ibid.* 78, 2905 (1956).

vasopressine que nous avons purifiée par contre-courant dans le système butanol secondaire-acide p-toluenesulfonique 0,08 M. Le contenu du sommet principal ($K = 0,73$) s'est montré homogène à la chromatographie sur papier dans trois systèmes de solvants et à l'électrophorèse sur papier sous haut voltage à pH 1,9 et à pH 5,8, la révélation étant chaque fois effectuée par une série de réactifs¹⁵⁾.

Les activités biologiques¹⁷⁾ de notre lysine-vasopressine synthétique, exprimées en unités internationales par mg de produit purifié, sont rassemblées dans le tableau, qui contient également les valeurs les plus récentes indiquées par DU VIGNEAUD et coll.¹⁸⁾ pour la lysine-vasopressine naturelle et leur produit synthétique. Les activités que nous avons obtenues correspondent, dans les limites d'erreur des dosages biologiques, aux valeurs indiquées par ces auteurs.

Partie expérimentale¹⁹⁾

Les F_r ont été déterminés sur banc KOFLER et sont corrigés (précision $\pm 2^\circ$). Les séchages au vide ont été effectués sous 10^{-2} à 10^{-8} Torr (16 h à 60° pour les analyses). Les évaporations sous vide ont été conduites dans l'évaporateur rotatif de CRAIG²⁰⁾.

Les chromatographies sur papier ont été faites par la méthode ascendante (20–23 cm) sur papier « SCHLEICHER & SCHUELL 2040 b lavé ». Rf_M dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:20); Rf_A dans le mélange alcool isoamyle/pyridine/eau (35:35:30); Rf_P dans le mélange n-butanol/acide acétique/eau (70:10:20). Rf^a après scission préliminaire du groupe CBO- par séjour de 1 h à 20° dans une solution 20% de HBr dans l'acide acétique glacial, évaporation au vide et reprise dans le solvant de chromatographie (ou d'électrophorèse).

Les électrophorèses sur papier ont été effectuées dans l'appareil à électrophorèse sous haute tension et refroidissement de WIELAND & PFLEIDERER²¹⁾: au pH 1,9 ($E_{1,9}$) dans le mélange acide formique/acide acétique/eau (15:10:75); au pH 5,8 ($E_{5,8}$) dans le mélange pyridine/acide acétique/eau (9:1:90). $E_{1,9} = 0,8$ His indique qu'à pH 1,9 la substance migre 0,8 fois la distance que migre l'histidine. L'exposant a a la même signification que pour les chromatogrammes.

Les révélations des chromatogrammes et des phérogrammes ont été effectuées par vaporisation des réactifs suivants: solution 0,4% de ninhydrine dans le mélange sec-butanol/acide acétique/eau (89:1:10) (chauffage de 5 min à 100° et fixation par le nitrate de cuivre alcoolique²²⁾); réactif tyrosine-tryptophane de FOLIN²³⁾ dilué par un volume d'eau (exposition ultérieure à des vapeurs de NH_3 sans séchage préalable); réactif au chlore²⁴⁾ modifié (exposition à des vapeurs de chlore pendant 5 min, séjour de 20 min dans un dessiccateur au vide de la trompe à eau, vaporisation sur un côté du papier d'une solution à 1% d'amidon et après 1 min vaporisation sur l'autre côté d'une solution à 1% d'iode de potassium); réactif au bleu de bromophénol²⁵⁾.

N-CBO-L-Proyl-e-N-tosyl-L-lysyl-glycinate d'éthyle (I). A une solution refroidie à -10° de 5,0 g (20 mmoles) de N-CBO-L-proline et de 2,8 ml (20 mmoles) de triéthylamine dans 24 ml de chloroforme anhydre, on ajoute en 30 min sous agitation 2,02 ml (21 mmoles) de chloroformate d'éthyle, agite encore 10 min et ajoute en 10 min une solution de 9,33 g (20 mmoles) de bromhydrate de e-N-tosyl-L-lysyl-glycinate d'éthyle²⁶⁾ et de 2,8 ml (20 mmoles) de triéthylamine. La solution est agitée encore 1 h à 20° , additionnée de 25 ml de chloroforme et lavée par HCl 1 N.

¹⁹⁾ Les microanalyses ont été effectuées dans notre Laboratoire microanalytique (Dr. W. SCHÖNIGER).

²⁰⁾ L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, Anal. Chemistry 22, 1462 (1950).

²¹⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, Angew. Chem. 67, 257 (1955).

²²⁾ TH. WIELAND & E. KAWERAU, Nature 168, 77 (1951).

²³⁾ O. FOLIN & V. CIOCALTEU, J. biol. Chemistry 73, 629 (1927).

²⁴⁾ H. RYDON & P. SMITH, Nature 169, 922 (1952).

²⁵⁾ E. L. DURRUM, J. Amer. chem. Soc. 72, 2943 (1950); H. G. KUNKEL, S. P. TAYLOR & V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry 200, 559 (1953).

²⁶⁾ R. ROESKE, F. H. C. STEWART, R. J. STEDMAN & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 78, 5883 (1956).

H_2O , NH_4OH 1 N, H_2O , séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée au vide. Le résidu est recristallisé une première fois de 35 ml et une seconde fois de 50 ml d'éthanol absolu bouillant. Les cristaux sont chaque fois lavés par 5 ml d'éthanol absolu et par 50 ml d'éther. Après séchage on obtient 9,86 g (80%) de N-CBO-L-proyl- ϵ -N-tosyl-L-lysyl-glycinamide d'éthyle sous forme de fines aiguilles de F. 152° (Litt. 151-151,5°²⁶; 151-152°²⁷). $[\alpha]_D^{21} = -57,0^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$; acide acétique glacial) (Litt.: -55,6°²⁶, -56,8°²⁷) ($c = 1$; acide acétique glacial). $[\alpha]_D^{23} = -29,8^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,1$; diméthylformamide); $-48,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,9$; méthanol). $Rf_M^a = 0,83$; $Rf_P^a = 0,71$; $Rf_A^a = 0,85$; $E_{1,9}^a = 1,0$ Try; $E_{1,8}^a = 0,9$ His (révélation par isatine et chlore; homogène). Soluble dans le chloroforme, la pyridine et le diméthylformamide. Peu soluble dans les alcools, l'acétate d'éthyle et l'acide acétique. Insoluble dans le benzène, l'éther et l'eau.

$\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{N}_4\text{S}$	Calc. C 58,4	H 6,5	O 20,8	N 9,1	S 5,2%
(616,7)	Tr. ,,	58,4 ,,	6,3 ,,	20,5 ,,	9,1 ,,, 5,4%

N-CBO-L-Proyl- ϵ -N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (II). L'amidification a été effectuée, avec un rendement de 80% en produit purifié, selon DU VIGNEAUD et coll.²⁶). F. 183° (Litt. 181-183°). $[\alpha]_D^{21} = -30,7^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,9$; diméthylformamide); $-39,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,1$; méthanol). $Rf_M^a = 0,67$; $Rf_P^a = 0,40$; $Rf_A^a = 0,58$; $E_{1,9}^a = 0,89$ Try; $E_{5,8}^a = 0,83$ His (révélation par isatine et chlore; homogène). Soluble dans diméthylformamide et pyridine. Peu soluble dans méthanol, éthanol, chloroforme et acide acétique. Insoluble dans acétate d'éthyle, benzène et éther.

$\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{N}_4\text{S}$	Calc. C 57,2	H 6,3	O 19,1	N 11,0	S 5,5%
(587,7)	Tr. ,,	57,5 ,,	6,2 ,,	18,9 ,,,	11,8 ,,, 5,5%

L-Proyl- ϵ -N-tosyl-L-lysyl-glycinamide, HBr (III). On dissout 5,0 g (8,5 mmoles) de N-CBO-L-proyl- ϵ -N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (II) dans 25 ml d'une solution 3N de gaz bromhydrique dans l'acide acétique. Après 1 h à 20°, on évapore au vide, triture plusieurs fois le résidu avec de l'éther anhydre jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent. Après filtration et lavage à l'éther, ce produit est dissous dans 20 ml de méthanol anhydre. Cette solution est introduite en un mince filet dans 250 ml d'éther anhydre sous agitation. Après filtration du précipité, celui-ci est dissous de nouveau dans le méthanol et précipité à l'éther comme ci-dessus. Après filtration, lavage à l'éther et séchage au vide poussé, on obtient avec un rendement quantitatif 4,5 g de bromhydrate de L-proyl- ϵ -N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 118° (déc.). $[\alpha]_D^{22} = -20,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,3$; méthanol); $-11,8^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$; diméthylformamide). $Rf_M = 0,67$; $Rf_P = 0,40$; $Rf_A = 0,58$; $E_{1,9} = 0,89$ Try; $E_{5,8} = 0,83$ His (révélation par isatine et chlore; homogène). Soluble dans l'eau, le méthanol et le diméthylformamide. Insoluble dans le chloroforme et l'éther.

$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{N}_5\text{S Br}$	Calc. C 44,9	H 6,0	O 15,0	N 13,2	S 6,0	Br 15,0%
(534,5)	Tr. ,,	44,7 ,,	6,6 ,,	14,9 ,,,	13,4 ,,,	5,5 ,,, 15,6%

L-Proyl- ϵ -N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (IV). Les 4,5 g de bromhydrate de L-proyl- ϵ -tosyl-L-lysyl-glycinamide (III) ci-dessus sont dissous dans 30 ml de méthanol et passés sur une colonne contenant 20 ml d'Amberlite IRA-410 sous forme de base libre²⁸). On lave la colonne par 40 ml de méthanol, évapore le filtrat au vide et sèche le résidu au vide poussé. On dissout ce résidu dans 25 ml de chloroforme, lave par trois fois 8 ml d'eau, sèche sur Na_2SO_4 , verse dans 300 ml d'éther anhydre et filtre. Après lavage à l'éther du précipité et séchage au vide poussé, on obtient 3,4 g (85%) de L-proyl- ϵ -N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 90° (instantané). $[\alpha]_D^{21} = -30,2^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$; acide acétique). $Rf_M = 0,63$; $Rf_P = 0,45$; $Rf_A = 0,57$; $E_{1,9} = 0,89$ Try; $E_{5,8} = 0,83$ His (révélation par isatine, ninhydrine et chlore; homogène). Soluble dans le méthanol, l'éthanol, le chloroforme, l'acide acétique, le diméthylformamide et la pyridine.

$\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_5\text{N}_5\text{S}$	Calc.	C 53,0	H 6,9	O 17,6	N 15,4	S 7,1%
(453,6)	Calc. + 1 H_2O	,,	50,9 ,,	7,1 ,,	20,4 ,,,	14,9 ,,, 6,8%
	Tr.	,,	51,3 ,,,	7,3 ,,,	20,6 ,,,	14,7 ,,, 7,1%

Par hydrogénéation catalytique du N-CBO-L-proyl- ϵ -N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (II) dans du méthanol contenant 5% d'acide acétique en présence du catalyseur de KUHN²⁹) on obtient, après purification dans les mêmes conditions que ci-dessus, le même tripeptide avec un rendement de 78%.

²⁷⁾ H. J. PANNEMAN, A. F. MARX & J. F. ARENS, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 78, 487 (1959).

²⁸⁾ ROHM & HAAS, Philadelphia.

N-CBO-L-Glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (*V*). Une solution de 1,44 g (3,05 mmoles) de L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (*IV*) et de 1,77 g (2,89 mmoles) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinylazide²⁹) dans 15 ml de diméthylformamide est agitée pendant 16 h à température ordinaire. Après concentration au vide à 5 ml, on ajoute à la solution encore chaude (60°) 10 ml d'acétone. Après 30 min, le précipité gélatineux obtenu est filtré, lavé par 8 ml du mélange diméthylformamide – acétone (1:3), redissous dans 4 ml de diméthylformamide et reprécipité par 12 ml d'acétone. Après lavage à l'acétone du précipité et séchage au vide, on obtient 1,75 g (59%) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. (instantané) 155° et F. (avec préchauffage) 140° (déc.). $[\alpha]_D^{22} = -36,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,0$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,58$; $Rf_P^a = 0,27$; $Rf_A^a = 0,43$; $E_{1,9}^a = 0,57$ Try; $E_{5,8}^a = 0,4$ His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène). Soluble dans le diméthylformamide, la pyridine et l'acide acétique. Insoluble dans l'eau, l'acétone, le chloroforme, l'éther, le méthanol, l'éthanol et l'acétate d'éthyle.

$C_{47}H_{62}O_{12}N_{10}S_2$	Calc.	C 55,2	H 6,1	O 18,7	N 13,7	S 6,3%
(1023,2)	Calc. + $\frac{1}{2}$ H ₂ O	, 54,7	, 6,2	, 19,4	, 13,6	, 6,2%
	Tr.	, 54,7	, 6,4	, 19,2	, 13,6	, 6,2%

L-Glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (*VI*). On fait barboter du gaz bromhydrique dans 16 ml d'acide acétique jusqu'à saturation, ajoute 1,1 g (1,07 mmole) de N-CBO-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (*V*) et continue à faire passer le courant de gaz bromhydrique pendant 75 min à 20°. Le produit passe peu à peu en solution. La solution obtenue est évaporée au vide et le résidu est trituré avec de l'éther jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent. Celui-ci est dissous dans 5 ml de méthanol et précipité par introduction de cette solution, sous agitation, dans 60 ml d'éther anhydre. Le précipité est lavé à l'éther et dissous dans 15 ml de méthanol. On fait passer la solution sur une colonne contenant 10 ml d'Amberlite IRA-410 libre²⁸), lave la colonne par 25 ml de méthanol et évapore les filtrats à sec au vide. Le résidu (730 mg) est purifié par contre-courant entre le n-butanol et l'eau. Les tubes contenant le produit le plus soluble dans la phase organique sont réunis. Par évaporation au vide et lavage à l'éther du résidu, on obtient 587 mg (62%) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 95–100° (déc.). $[\alpha]_D^{21} = -45,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,2$; acide acétique). $Rf_M = 0,58$; $Rf_P = 0,38$; $Rf_A = 0,51$; $E_{1,9} = 0,57$ Try; $E_{5,8} = 0,38$ His (révélation par ninhydrine et chlore; homogène). Soluble dans le méthanol, l'acide acétique et le diméthylformamide. Insoluble dans le chloroforme, l'acétate d'éthyle et l'éther.

$C_{39}H_{56}O_{10}N_{10}S_2$	Calc.	C 52,7	H 6,3	N 15,7	S 7,2%
(889,1)	Tr.	, 52,6	, 6,8	, 15,9	, 7,0%

N-CBO-S-Benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (*VIIa*). On dissout 666 mg (0,75 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (*VI*) et 595 mg (0,92 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-isoleucylazide²⁹) dans 10 ml de diméthylformamide. Après 16 h d'agitation, on ajoute 50 ml d'acétate d'éthyle, filtre, centrifuge lave le culot par l'acétate d'éthyle et le sèche au vide. Le produit est purifié par deux suspensions de 5 min dans chaque fois 4 ml de méthanol bouillant, suivies de filtration et lavage par 2 ml de méthanol bouillant chaque fois. Après séchage au vide on obtient 600 mg (53%) de N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. instantané 230°. $[\alpha]_D^{19} = -32,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,8$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,96$; $Rf_P^a = 0,58$; $Rf_A^a = 0,81$; $E_{1,9}^a = 0,77$ Try; $E_{5,8}^a = 0,65$ His (révélation par Folin, ninhydrine et chlore; homogène). Légèrement soluble dans le diméthylformamide et l'acide acétique. Insoluble dans les autres solvants usuels.

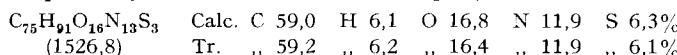
$C_{72}H_{93}O_{16}N_{13}S_3$	Calc.	C 57,9	H 6,3	O 17,1	N 12,2	S 6,4%
(1492,8)	Calc. + 1 H ₂ O	, [57,2	, 6,3	, 18,0	, 12,1	, 6,4%
	Tr.	, 57,0	, 6,4	, 17,7	, 11,8	, 6,2%

²⁹ R. KUHN & J. HAAS, Angew. Chem. 67, 785 (1955).

Lys⁸-oxytocine (Ileu³-Lys⁸-vasopressine) (VIIa). On dissout 302 mg (0,2 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (VIIa) dans 200 ml d'ammoniac redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute lentement du sodium jusqu'à apparition d'une teinte bleue. Après adjonction de 100 mg de NH₄Cl, on évapore à sec au vide, reprend par 200 ml d'acide acétique 0,02 M, ajuste au pH 8,0 et fait passer un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. On acidifie au pH 4,5, concentre au vide à 50 ml, ajoute 800 mg d'acide p-toluenesulfonique, équilibre avec du butanol secondaire et place dans les deux premiers tubes d'un appareil à contre-courant. Après 250 transferts dans le système butanol secondaire - acide p-toluenesulfonique 0,08 M, on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes³⁰⁾. On obtient un sommet principal de K = 0,61. Le contenu des tubes centraux de ce sommet est réuni, passé sur Amberlite IRA-45²⁸⁾ et concentré au vide. Le produit obtenu représente plus de la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène à la chromatographie ($Rf_M = 0,31$; $Rf_A = 0,35$; $Rf_P = 0,14$) et à l'électrophorèse ($E_{1,9} = 1,10$ Try; $E_{5,8} = 0,75$ His), par révélation à la ninhydrine, au bleu de bromophénol, au FOLIN et au chlore.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales¹⁷⁾ par mg: baisse pression sanguine du poulet 54 ± 4 ; utérus de rat isolé $20,0 \pm 2,5$; utérus de chat *in situ* $33,5 \pm 2,1$; pression interne glande mammaire du lapin $55,0 \pm 5,0$; pression sanguine du rat $39,2 \pm 4,0$; pression sanguine du chat $38,3 \pm 4,5$; inhibition de la diurèse du rat, env. 13.

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (VIIb). On dissout 374 mg (0,55 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalanylazide⁴⁾ et 375 mg (0,42 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (VI) dans 2,5 ml de diméthylformamide, agite 30 h à 20°, concentre au vide, ajoute 12,5 ml d'acétate d'éthyle, laisse 2 h à 0°, filtre, lave par 6 ml d'acétate d'éthyle et 6 ml d'éther et sèche au vide poussé. Le produit pulvérulent obtenu est purifié par deux suspensions dans 3 ml de méthanol bouillant pendant 10 min, suivies chaque fois de filtration et lavage par 3 ml de méthanol bouillant. Après séchage, on obtient 347 mg (54%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 205°. $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,2$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,95$; $Rf_P^a = 0,70$; $Rf_A^a = 0,85$; $E_{1,9}^a = 0,4$ Try (révélation par ninhydrine, FOLIN et chlore; homogène).



Lys⁸-vasopressine (Phé³-Lys⁸-oxytocine) (VIIb). On dissout 305 mg (0,2 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (VIIb) dans 200 ml d'ammoniac liquide. On traite au sodium, oxyde à l'air, purifie par contre-courant et passe sur résine comme pour la Lys⁸-oxytocine (VIIIa) ci-dessus. Le produit obtenu à partir du sommet principal ($K = 0,73$) contient la totalité de l'activité vasopressique de départ et plus de la moitié de l'azote peptidique. Il est homogène à la chromatographie ($Rf_M = 0,34$; $Rf_A = 0,42$; $Rf_P = 0,11$) et à l'électrophorèse $E_{1,9} = 1,02$ Try; $E_{5,8} = 0,75$ His), par révélation à la ninhydrine, au FOLIN, au bleu de bromophénol et au chlore.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales¹⁷⁾ par mg: utérus de rat isolé $5,2 \pm 0,5$; baisse de la pression sanguine du coq, env. 40; pression sanguine du rat 268 ± 19 ; pression sanguine du chat 306 ± 13 ; inhibition de la diurèse du rat, env. 250.

SUMMARY

N-CBO-L-Glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-azide has been condensed with L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide, giving N-CBO-L-glutaminyl L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide, which after split-

³⁰⁾ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* 193, 265 (1951).

ting of the CBO- protecting group has been condensed with N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-azide. Cleavage of the protecting groups of the resulting nonapeptide with sodium in liquid ammonia, oxidation with air in dilute aqueous solution and purification by counter-current distribution afforded Lys⁸-oxytocin, which represents a structural intermediate between oxytocin and lysine-vasopressin and which exhibits the biological properties of both these natural hormones.

By using N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-azide instead of N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-azide, pure synthetic lysine-vasopressin, possessing the same properties as the natural hormone, has been obtained by a new route.

Laboratoires de chimie pharmaceutique SANDOZ, Bâle

26. Synthèse d'analogues de l'oxytocine et de la lysine-vasopressine contenant de la phénylalanine ou de la tyrosine en positions 2 et 3

par R. A. BOISSONNAS et St. GUTTMANN

(27 XI 59)

Il a été montré récemment que l'hydroxyle phénolique de l'oxytocine n'était pas complètement indispensable à l'activité biologique de cette hormone. En effet la Phé²-oxytocine possédait encore environ un tiers des propriétés oxytociques de l'oxytocine¹⁾²⁾.

Dans le présent travail nous avons étendu à la lysine-vasopressine cette étude du rôle de l'hydroxyle phénolique, ce qui nous a conduits à préparer les nouveaux analogues de la lysine-vasopressine et de l'oxytocine qui sont rassemblés en tête des tableaux I et II: Tyr³-Lys⁸-vasopressine, Phé²-Lys⁸-vasopressine, Phé²-Tyr³-Lys⁸-vasopressine, Tyr³-oxytocine, Phé²-Phé²-oxytocine, Phé²-Tyr³-oxytocine.

Les méthodes de synthèse que nous avons utilisées sont basées sur le schéma 3+6 que nous avons employé précédemment¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾.

La N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosine³⁾ ou la N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-phénylalanine (VI)¹⁾ sont condensées par la méthode à la dicyclohexyl-carbodiimide⁶⁾ avec le L-phénylalaninate de méthyle⁴⁾ ou le L-tyrosinate de méthyle³⁾. Les esters des tripeptides obtenus sont transformés en hydrazides, puis en azides. Ceux-ci sont condensés avec le L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-ε-N-

¹⁾ H. KONZETZ & B. BERDE, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 14, 333 (1959); P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, Helv. 42, 788 (1959).

²⁾ M. BODANSKY & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 81, 1258 (1959).

³⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, Helv. 38, 1491 (1955).

⁴⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, Helv. 39, 1421 (1956).

⁵⁾ R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, Helv. 43, 182 (1960).

⁶⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).