

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 Lys<sup>8</sup>-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 Phé<sup>2</sup>-oxytocine possédait encore environ un tiers des propriétés oxytociques de l'oxytocine<sup>1)2)</sup>.

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: Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine, Phé<sup>2</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine, Phé<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine, Tyr<sup>3</sup>-oxytocine, Phé<sup>2</sup>-Phé<sup>2</sup>-oxytocine, Phé<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-oxytocine.

Les méthodes de synthèse que nous avons utilisées sont basées sur le schéma 3+6 que nous avons employé précédemment<sup>1)3)4)5)</sup>.

La N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosine<sup>3)</sup> ou la N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-phénylalanine (VI)<sup>1)</sup> sont condensées par la méthode à la dicyclohexyl-carbodiimide<sup>6)</sup> avec le L-phénylalaninate de méthyle<sup>4)</sup> ou le L-tyrosinate de méthyle<sup>3)</sup>. 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-

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

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

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

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

<sup>5)</sup> R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, Helv. 43, 182 (1960).

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

tosyl-L-lysyl-glycinamide<sup>5)</sup> ou avec le L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide<sup>3)</sup>) en nonapeptides protégés correspondants.

La pureté de tous les peptides protégés intermédiaires a été contrôlée par chromatographie sur papier et par électrophorèse sur papier sous haut voltage, après scission du groupe CBO- du peptide protégé à examiner par le gaz bromhydrique dans l'acide acétique glacial. Tous les produits ainsi obtenus se sont montrés homogènes<sup>7)</sup> par révélation au moyen d'une série de réactifs différents<sup>8)</sup>.

Les groupes protecteurs (N-CBO-, S-benzyl- et N-tosyl-) des nonapeptides protégés ont été enlevés par traitement au sodium dans l'ammoniac liquide<sup>9)</sup>. Après oxydation à l'air en solution aqueuse diluée, les nonapeptides cycliques bruts obtenus ont été débarrassés par contre-courant de quelques impuretés peptidiques mineures<sup>10)</sup>. Les coefficients de partage des analogues de la lysine-vasopressine dans le système sec-butanol - acide p-toluenesulfonique 0,08M sont donnés dans le tableau I et ceux des analogues de l'oxytocine dans le système sec-butanol - acide acétique 0,017M, dans le tableau II.

La pureté de chacun des analogues obtenus a en outre été contrôlée par chromatographie sur papier dans trois systèmes de solvants et par électrophorèse sur papier sous haut voltage à deux pH, la révélation étant chaque fois effectuée par une série de réactifs<sup>8)</sup>. Chaque analogue s'est montré homogène sous ces différentes conditions d'examen.

Des trois nouveaux analogues de la lysine-vasopressine que nous avons préparés (tab. I), le premier (Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine) possède un hydroxyle phénolique de plus que cette hormone, et le deuxième (Phé<sup>2</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine), un hydroxyle phénolique de moins. Dans le troisième (Phé<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine), l'hydroxyle phénolique a été déplacé de l'acide aminé en position 2 à l'acide aminé en position 3.

Si nous comparons les coefficients de partage de ces trois analogues à ceux de la lysine-vasopressine, nous voyons qu'un hydroxyle supplémentaire augmente la solubilité dans l'eau au détriment du solvant organique, que la suppression de l'hydroxyle normalement présent provoque le phénomène contraire et que le déplacement de cet hydroxyle de l'acide aminé en position 2 à l'acide aminé en position 3 ne modifie pratiquement pas le rapport des solubilités.

Les mêmes constatations s'appliquent également aux trois nouveaux analogues de l'oxytocine que nous avons préparés (tab. II). Dans ce cas cependant, la comparaison doit être effectuée non pas avec l'oxytocine elle-même, mais avec la Phé<sup>3</sup>-oxytocine<sup>4)</sup><sup>11)</sup><sup>12)</sup>.

7) Seuls les divers hydrazides ont montré une tache secondaire, dont la proportion croît avec le temps de séjour dans le mélange de scission, et qui est probablement due à une réaction secondaire entre le bromure de benzyle formé et la fonction hydrazide.

8) Voir la partie expérimentale.

9) V. DU VIGNEAUD et coll., J. Amer. chem. Soc. 76, 3115 (1954).

10) Dans le cas des analogues de l'oxytocine, comme dans celui de l'oxytocine elle-même, la cyclisation oxydative donne toujours naissance, à côté du monomère cyclique désiré, à de petites quantités de dimère et de polymères (cf. N. H. RYDON et coll. J. chem. Soc. 1956, 3157, ainsi que CH. RESSLER, Science 128, 1281 (1958)). Ces réactions secondaires sont moins importantes dans le cas de la lysine-vasopressine et de ses analogues.

11) B. BERDE, W. DOEPFNER & H. KONZETT, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 12, 209 (1957).

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

Tableau I. Analogues de la lysine-vasopressine

Formule chimique et désignation	Coefficient de répartition entre sec-butanol et acide p-toluenesulfonique 0,08 M	Activités oxytociques en unités internationales par mg <sup>13)</sup>		Activités vasopressiques en unités internationales par mg <sup>13)</sup>	
		utérus de rat isolé	baisse de la pression sanguine du coq	pression interne de la glande mammaire du lapin	pression sanguine du chat
H-Cys-Tyr-Tyr-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Lys-Gly-NH <sub>2</sub> Tyr <sup>3</sup> -Lys <sup>8</sup> -vasopressine (V)	0,58	~ 0,01	~ 0,1	~ 0,2	1,6 (± 0,2) 2,6 (± 0,7) 0,18 (± 0,08)
H-Cys-Phe-Phe-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Lys-Gly-NH <sub>2</sub> Phe <sup>2</sup> -Lys <sup>8</sup> -vasopressine (XI)	0,84	~ 0,06	~ 1,4	3,0 (± 0,7) 7,9 (± 1,2)	— 29 (± 3)
H-Cys-Phe-Tyr-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Lys-Gly-NH <sub>2</sub> Phe <sup>2</sup> -Tyr <sup>3</sup> -Lys <sup>8</sup> -vasopressine (XVI)	0,75	< 0,01	< 0,01	— 0,14 (± 0,01)	— 0,013 (± 0,002)
H-Cys-Tyr-Phe-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Lys-Gly-NH <sub>2</sub> lysine-vasopressine = Lys <sup>8</sup> -vasopressine <sup>5)</sup>	0,73	5 (± 0,5)	40 (± 5)	~ 45 268 (± 19) 306 (± 13)	~ 250
H-Cys-Tyr-Ileu-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Lys-Gly-NH <sub>2</sub> Ileu <sup>3</sup> -Lys <sup>8</sup> -vasopressine = Lys <sup>8</sup> -oxytocine = lysine-vasotocine <sup>5)</sup>	0,61	20 (± 3)	54 (± 4)	55 (± 5) 39 (± 4)	38 (± 4) ~ 13

Tableau II. Analogues de l'oxytocine

Formule chimique et désignation	Coefficient de répartition entre sec-butanol et acide acétique 0,017 M	Activités oxytociques en unités internationales par mg <sup>13)</sup>		Activités vasopressiques en unités internationales par mg <sup>13)</sup>	
		utérus de rat isolé	baisse de la pression sanguine du coq	pression interne de la glande mammaire du lapin	pression sanguine du rat
H-CyS-Tyr-Tyr-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> Tyr <sup>3</sup> -oxytocine (XVIII)	0,35 (± 0,03)	0,10 (± 0,03)	~ 0,03	1,5 (± 0,3) ~ 0,01	~ 0,01 —
H-CyS-Phe-Phe-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> Phe <sup>2</sup> -Phe <sup>3</sup> -oxytocine (XX)	0,60 3,3 (± 0,3)	5,4 (± 0,9) 24,6 (± 9,0)	~ 0,9 —	— 5,7 (± 0,6)	—
H-CyS-Phe-Tyr-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> Phe <sup>2</sup> -Tyr <sup>3</sup> -oxytocine (XXII)	0,43 —	< 0,01 —	< 0,01 —	< 0,01 —	~ 0,001 —
H-CyS-Tyr-Phe-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> Phe <sup>2</sup> -oxytocine (= oxyppamine) <sup>4) 11) 12)</sup>	0,48 —	~ 20 —	~ 30 —	~ 60 —	~ 5 —
H-CyS-Tyr-Ileu-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> oxytocine 3 <sup>9)</sup>	0,41 —	450 (± 30) —	450 (± 30) —	450 (± 30) —	4 (± 1) —
H-CyS-Phe-Ileu-Glu(NH <sub>2</sub> )-Asp(NH <sub>2</sub> )-CyS-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> Phe <sup>2</sup> -oxytocine 1 <sup>2)</sup>	0,60 —	31,5 (± 2,4) —	63,2 (± 9,0) —	141 ± 21 —	~ 0,4 —

Les activités oxytociques et vasopressiques de ces différents analogues ont été déterminées par le Prof. H. KONZETT et le Dr. B. BERDE de notre Département pharmacologique (Dir.: Dr. A. CERLETTI)<sup>13)</sup> et sont indiquées dans les tab. I et II.

Nous voyons que la Phé<sup>2</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine possède encore près du tiers de l'activité vasopressique de la lysine-vasopressine. Comme la Phé<sup>2</sup>-oxytocine<sup>1)</sup><sup>2)</sup> possédait également environ le tiers de l'activité oxytocique de l'oxytocine, nous pouvons conclure que la présence d'un hydroxyle phénolique n'est pas indispensable pour l'apparition des activités biologiques caractéristiques de ces deux hormones. Si l'on compare les activités de la Phé<sup>2</sup>-Phé<sup>3</sup>-oxytocine avec celles de la Phé<sup>3</sup>-oxytocine<sup>4)</sup><sup>11)</sup><sup>12)</sup>, on remarque également que l'absence de l'hydroxyle phénolique abaisse les activités de ce dernier analogue dans à peu près les mêmes proportions.

Par contre l'hydroxyle phénolique supplémentaire qui se trouve dans la Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine abaisse beaucoup plus fortement les activités de cet analogue par rapport à la lysine-vasopressine. Il en va de même pour l'hydroxyle supplémentaire de la Tyr<sup>3</sup>-oxytocine, qui diminue très fortement les activités de cet analogue par rapport à la Phé<sup>3</sup>-oxytocine.

Quant au déplacement de l'hydroxyle phénolique de l'acide aminé en position 2 sur l'acide aminé en position 3, nous voyons qu'il provoque une baisse des activités biologiques encore plus forte que l'introduction d'un hydroxyle supplémentaire. Cette constatation est d'autant plus intéressante que, comme nous l'avons vu plus haut, un tel déplacement n'entraîne pratiquement aucune modification de la solubilité.

Dans le cas de la lysine-vasopressine, ce déplacement de l'hydroxyle phénolique diminue bien plus fortement l'activité que le remplacement du reste aromatique de la phénylalanine en position 3 par le reste aliphatique de l'isoleucine, comme dans la Ileu<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine<sup>5)</sup>. Ce déplacement de l'hydroxyle phénolique a donc le même résultat qu'une double modification de la molécule.

Une permutation d'acides aminés sans modification apparente des propriétés physiques a, dans ce cas, une influence plus défavorable sur l'activité qu'une modification unique accompagnée d'une modification des propriétés physiques.

#### Partie expérimentale<sup>14)</sup>

Pour le détail des abréviations et des méthodes générales utilisées voir le travail précédent<sup>5)</sup>.

##### a) Synthèse de la Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine (Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-oxytocine)

*N-CBO-S-Benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-tyrosinate de méthyle (I).* On dissout 5,08 g (10,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosine<sup>3)</sup> et 2,14 g (11,0 mmoles) de L-tyrosinate de méthyle<sup>3)</sup> dans 20 ml de pyridine. Après refroidissement à -5°, on ajoute une solution, également refroidie, de 2,57 g (12,5 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide dans 30 ml d'acetonitrile et agite 12 h à 20°. On filtre, évapore le filtrat à sec, tritue le résidu avec de l'éther de pétrole, le re-

<sup>13)</sup> Les déterminations d'activité biologique ont été effectuées selon les méthodes précédemment utilisées<sup>1)</sup><sup>11)</sup>. Les activités sont exprimées par rapport au «Troisième standard international pour la détermination des activités oxytociques, vasopressiques et antidiurétiques». Une communication préliminaire sur les activités biologiques d'une partie de ces analogues a été donnée par B. BERDE, A. CERLETTI & H. KONZETT au «Symposium sur l'oxytocine», 17-19 août 1959, Montevideo.

<sup>14)</sup> Les microanalyses ont été effectuées dans notre Laboratoire microanalytique (Dr. W. SCHÖNIGER). Les spectres UV. ont été pris dans notre Laboratoire spectroanalytique (Dr. H. G. LEEMANN).

dissout dans un mélange de 400 ml d'acétate d'éthyle - eau (1:1), et lave la phase organique par HCl 1 N, puis plusieurs fois alternativement par NH<sub>4</sub>OH 1 N et eau. On sèche sur du sulfate de magnésium, évapore à sec la solution, redissout le résidu dans 150 ml d'acétate d'éthyle bouillant et laisse cristalliser à 0°. Après 12 h on filtre, lave les cristaux par 20 ml d'acétate d'éthyle froid et sèche. On obtient ainsi une première fraction de 2,98 g de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tyrosinate de méthyle cristallin de F. 179°. On évapore le filtrat à sec, triture le résidu dans l'éther, et recristallise de 30 ml d'acétate d'éthyle comme ci-dessus. On obtient une deuxième fraction de 2,66 g de F. 177°, soit un total de 5,64 g (82%).  $[\alpha]_D^{20} = -18,8^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,9$ ; méthanol);  $-29,9^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,1$ ; diméthylformamide). Spectre UV.:  $\lambda_{\text{max}} 280,5 \text{ m}\mu$  ( $\log \epsilon = 3,58$ ), 287  $\text{m}\mu$  ( $\log \epsilon = 3,51$ ) dans diméthylformamide-tributylamine (97:3).  $R_f^a_M = 0,95$ ;  $E_{5,8}^a = 0,6$  His (révélation par ninhydrine, PAULY, FOLIN, chlore; homogène).

$C_{37}H_{39}O_8N_3S$	Calc. C 64,7	H 5,7	O 18,7	N 6,1	S 4,7%
(685,8)	Tr. , ,	64,7 , ,	5,7 , ,	18,5 , ,	6,2 , , 4,6%

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tyrosylhydrazide (II).* On chauffe 4 h à reflux une solution de 2,06 g (3,0 mmoles) de l'ester tripeptidique I dans 30 ml de méthanol contenant 2,06 ml d'hydrate d'hydrazine. On laisse refroidir jusqu'à 20°, filtre, et lave le précipité plusieurs fois à l'eau. Après séchage sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, on obtient 1,89 g (92%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tyrosylhydrazide cristallin de F. 238°.  $R_f^a_M = 0,95$ ;  $E_{1,9}^a = 1,0$  Glu;  $E_{5,8}^a = 0,6$  His (révélation par ninhydrine, FOLIN, PAULY, chlore; cf. 7°).  $[\alpha]_D^{20} = -27,2^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 2,0$ ; diméthylformamide). Spectre UV.:  $\lambda_{\text{max}} 280,5 \text{ m}\mu$  ( $\log \epsilon = 3,63$ ), 287  $\text{m}\mu$  ( $\log \epsilon = 3,56$ ) dans diméthylformamide-tributylamine (97:3). Insoluble dans les solvants organiques sauf le diméthylformamide.

$C_{36}H_{39}O_8N_5S$	Calc. C 63,0	H 5,7	O 16,3	N 10,2	S 4,7%
(685,8)	Tr. , ,	62,8 , ,	5,8 , ,	16,5 , ,	10,3 , , 4,7%

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tyrosylazide (III).* On suspend 1,37 g (2,0 mmoles) de l'hydrazide tripeptidique II dans un mélange de 8 ml de diméthylformamide et de 8 ml d'isopropanol, refroidit à  $-5^\circ$ , ajoute sous forte agitation 1,0 ml de HCl 6 N, et, après que l'hydrazide est entièrement dissous, lentement 0,44 ml de NaNO<sub>2</sub> 5 M. On agite 5 min à  $-5^\circ$  et ajoute 40 ml d'une solution 1 M de NaHCO<sub>3</sub> refroidie à 0°, puis 32 ml d'eau, également refroidie à 0°. La précipitation de l'azide commence à la fin de l'addition du NaHCO<sub>3</sub> et est complète à la fin de l'addition de l'eau. On agite encore 5 min, filtre, essore à fond, lave le précipité en le suspendant dans 20 ml d'eau à 0°, filtre et essore à fond. Après un second lavage dans les mêmes conditions, on sèche au vide poussé. Après 3 h de séchage, on obtient 1,37 g (97%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tyrosylazide, fondant avec décomposition et fort dégagement gazeux vers 140°. Cet azide est utilisé immédiatement pour la préparation des nonapeptides.

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (IV).* On dissout 845 mg (0,95 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide<sup>5</sup>) et 668 mg (0,95 mmole) de l'azide III dans 12 ml de diméthylformamide, agite 30 h à 20° et concentre sous vide. On précipite, par de l'acétate d'éthyle, 1,33 g de nonapeptide brut que l'on purifie par suspension dans 8 ml de méthanol bouillant et filtration à chaud. Après répétition de ce traitement, on obtient 913 mg (62%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 206°.  $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 0,75$ ; diméthylformamide).  $R_f^a_M = 0,95$ ;  $E_{1,9}^a = 0,5$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,5$  Try (révélation par ninhydrine, chlore, FOLIN, PAULY; homogène).

$C_{75}H_{91}O_{17}N_{13}S_3$	Calc. C 58,5	H 5,9	O 17,6	N 11,8	S 6,2%
(1542,8)	Calc. + 1H <sub>2</sub> O , ,	57,7 , ,	6,0 , ,	18,5 , ,	11,7 , , 6,2%
	Tr. , ,	57,8 , ,	6,0 , ,	18,5 , ,	11,9 , , 6,3%

*Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine (Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-oxytocine) (V).* On dissout 308 g (0,2 mmole) de l'amide nonapeptidique IV 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 NH<sub>4</sub>Cl 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 sec-butanol et introduit dans les deux premiers tubes d'un appareil à contre-courant. Après 250 transferts dans

le système sec-butanol - acide p-toluenesulfonique 0,08 M, on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes<sup>15)</sup>. On obtient un sommet principal de  $K = 0,58$ . Le contenu des tubes centraux de ce sommet est réuni, passé sur résine IRA-45 et concentré au vide. Le produit obtenu, qui représente plus de la moitié de l'azote peptidique de départ, est homogène à la chromatographie ( $Rf_M = 0,28$ ;  $Rf_A = 0,33$ ;  $Rf_P = 0,04$ ) et à l'électrophorèse ( $E_{1,9} = 0,98$  Try;  $E_{5,8} = 0,72$  His), par révélation à la ninhydrine, au bleu de bromophénol, au FOLIN et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques<sup>16)</sup>, exprimées en unités internationales par mg: utérus de rat isolé, env. 0,01; baisse pression sanguine du poulet, env. 0,1; pression interne de la glande mammaire du lapin, env. 0,2; pression sanguine du rat  $1,6 \pm 0,2$ ; pression sanguine du chat  $2,6 \pm 0,7$ ; inhibition de la diurèse du rat  $0,18 \pm 0,08$ .

### b) Synthèse de la Phé<sup>2</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine (Phé<sup>2</sup>-Phé<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-oxytocine)

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalanine (VI).* On dissout 8,62 g (25 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine dans 65 ml de tétrahydrofurane anhydre contenant 3,5 ml (25 mmoles) de triéthylamine, refroidit à  $-5^\circ$  et ajoute lentement, sous forte agitation, 2,40 ml (25 mmoles) de chloroformate d'éthyle. Après 20 min on verse rapidement 4,13 g (25 mmoles) de L-phénylalanine dissoute dans 25 ml de NaOH 1 N et 25 ml de tétrahydrofurane et agite vigoureusement pendant 3 h à  $20^\circ$ . On ajoute 150 ml d'eau, filtre, concentre sous vide à environ 200 ml, refroidit à  $0^\circ$  et acidifie à pH 2 sous forte agitation par HCl 2 N. Un précipité abondant se forme, qui se transforme rapidement en cristaux fins. On filtre, lave à l'eau, redissout dans 130 ml d'éthanol bouillant et laisse refroidir à  $0^\circ$ . Après 12 h on filtre, lave par un peu d'éthanol froid, et sèche au vide. On obtient 8,40 g (68%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalanine de F. 158° (Litt.: 157<sup>11</sup>); 157-158°<sup>22</sup>).  $[\alpha]_D^{20} = -36,5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,1$ ; diméthylformamide);  $-22,5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,3$ ; pyridine).  $Rf_M^a = 0,75$ ;  $Rf_A^a = 0,74$ ;  $Rf_P^a = 0,71$ ;  $E_{1,9}^a = 1,0$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,7$  Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{27}H_{28}O_5N_2S$	Calc. C 65,9	H 5,7	O 16,2	N 5,7	S 6,5%	équ.	493
(492,6)	Tr. , ,	65,8 , ,	6,0 , ,	16,1 , ,	5,7 , ,	6,4% , ,	495

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalananyl-L-phénylalaninate de méthyle (VII).* On dissout 7,90 g (16,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalanine (VI) et 3,22 g (18,0 mmoles) de L-phénylalaninate de méthyle (préparé à partir de son chlorhydrate<sup>4</sup>) dans 100 ml d'acetonitrile, refroidit la solution à  $-5^\circ$ , ajoute 4,12 g (20,0 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite à  $20^\circ$ . Après environ 15 min le contenu du ballon se prend en masse. On ajoute 100 ml de pyridine, ce qui provoque la dissolution du tripeptide formé mais laisse un précipité de dicyclohexylurée. On agite encore 21 h, filtre, lave le précipité (3,16 g de dicyclohexylurée) par un peu de pyridine, évapore le filtrat à sec et triture le résidu avec de l'éther de pétrole jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent. Le tripeptide brut est repris dans 200 ml de n-butanol bouillant (dissolution incomplète). Après refroidissement et filtration, on obtient 4,21 g de tripeptide de F. 160°. Le filtrat, après concentration à 50 ml et repos de 2 j à  $0^\circ$ , donne encore 4,18 g de tripeptide de F. 161°. Les deux fractions sont réunies et, après deux recristallisations dans chaque fois 180 ml de méthanol, donnent 7,86 g (75%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalananyl-L-phénylalaninate de méthyle cristallin de F. 163°.  $[\alpha]_D^{20} = -25,0^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,1$ ; pyridine);  $-36,1^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,1$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^a = 0,95$ ;  $Rf_P^a = 0,95$ ;  $E_{1,9}^a = 0,9$  Try;  $E_{5,8}^a = 1,3$  Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{37}H_{39}O_6N_3S$	Calc. C 68,0	H 6,0	O 14,7	N 6,4	S 4,9%	
(653,8)	Tr. , ,	68,0 , ,	6,0 , ,	14,6 , ,	6,2 , ,	5,0%

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalananyl-L-phénylalananylhydrazide (VIII).* On chauffe à reflux une suspension de 6,54 g (10,0 mmoles) de l'ester tripeptidique VII dans un mélange de 150 ml de méthanol et de 5 ml d'hydrate d'hydrazine pendant 2 h. Après encore 24 h à  $20^\circ$ , on filtre et lave le solide cristallin par de l'eau, jusqu'à ce que l'eau de lavage soit neutre. On sèche sur  $P_2O_5$ , puis suspend dans 50 ml de méthanol bouillant. Après refroidissement à  $20^\circ$ , filtration et séchage, on obtient 5,99 g (87%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalananyl-L-phénylalananylhydrazide cristallin de F. 208°.  $[\alpha]_D^{20} = -38,1^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,1$ ; diméthylformamide).

<sup>15)</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).

$Rf_M^a = 0,95$ ;  $Rf_P^a = 0,95$ ;  $E_{1,9}^a = 1,2$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,7$  His (révélation par ninhydrine et chlore; cf. <sup>7</sup>).       $C_{36}H_{39}O_5N_5S$       Calc. C 66,1 H 6,0 O 12,2 N 10,7 S 4,9%  
(653,8)      Tr. „ 66,3 „ 6,2 „ 12,1 „ 10,7 „ 5,2%

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-phénylalanylazide (IX).* On dissout 2,64 g (4,0 mmoles) de l'hydrazide tripeptidique VIII dans un mélange de 32 ml de diméthylformamide, 24 ml d'isopropanol et 2 ml de HCl 6 N. On refroidit à -5° et ajoute sous forte agitation 0,86 ml d'une solution aqueuse de NaNO<sub>2</sub> 5 M, agite 5 min, puis ajoute 26 ml de NaHCO<sub>3</sub> 1 M et 100 ml d'eau refroidie à 0°. On filtre et lave l'azide précipité avec de l'eau glacée. On séche sous vide poussé et obtient 2,66 g (100%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-phénylalanylazide fondant vers 140° avec décomposition et fort dégagement gazeux. On utilise cet azide immédiatement pour la synthèse des nonapeptides.

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-proyl-e-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (X).* On dissout 1,99 g (3,0 mmoles) de l'azide tripeptidique IX et 2,67 g (3,0 mmoles) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-proyl-e-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide<sup>5</sup>) dans 30 ml de diméthylformamide. On agite 48 h à 20°, concentre sous vide, précipite par de l'acétate d'éthyle, garde 2 h à -20°, filtre et séche. On obtient 3,67 g (81%) de produit brut, que l'on purifie par deux lavages successifs dans 20 ml de méthanol bouillant suivis de filtrations à chaud. Après séchage au vide on obtient 2,78 g (61%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-proyl-e-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 222°.  $[\alpha]_D^{21} = -50,0^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,2$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^a = 0,95$ ;  $Rf_A^a = 0,78$ ;  $E_{1,9}^a = 0,5$  Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

$C_{75}H_{91}O_{15}N_{13}S_3$       Calc. C 59,6 H 6,1 O 15,9 N 12,1 S 6,4%  
(1510,8)      Tr. „ 59,4 „ 6,4 „ 16,0 „ 11,7 „ 6,5%

*Phé<sup>2</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine (Phé<sup>2</sup>-Phé<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-oxytocine) (XI).* On dissout 1,51 g (1,0 mmole) de l'amide nonapeptidique X dans 1000 ml d'ammoniac redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air, purifie par contre-courant et passe sur résine comme pour la Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine (V) ci-dessus. Le produit obtenu à partir du sommet principal ( $K = 0,84$ ) représente plus de la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène à la chromatographie ( $Rf_M = 0,27$ ;  $Rf_A = 0,35$ ;  $Rf_P = 0,17$ ) et à l'électrophorèse ( $E_{1,9} = 1,0$  Try;  $E_{5,8} = 0,9$  His), après révélation à la ninhydrine, au bleu de bromophénol et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques<sup>13</sup>), exprimées en unités internationales par mg: utérus de rat isolé, env. 0,06; baisse pression sanguine du poulet, env. 1,4; pression interne de la glande mammaire du lapin  $3,0 \pm 0,7$ ; pression sanguine du rat  $78,8 \pm 11,6$ ; inhibition de la diurèse du rat  $28,6 \pm 2,6$ .

### c) Synthèse de la Phé<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine (Phé<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-oxytocine)

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-tyrosinate de méthyle (XII).* On dissout 4,93 g (10,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanine (VI) et 1,95 g (10,0 mmoles) de L-tyrosinate de méthyle<sup>3</sup>) dans 100 ml d'acétonitrile, plonge le récipient dans un mélange réfrigérant à -40° et l'y laisse jusqu'à ce qu'un trouble apparaisse. On sort le récipient du bain pour faire disparaître le trouble, ajoute 2,57 g (12,5 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite 16 h à 20°. On filtre, suspend le précipité sous agitation dans 20 ml de pyridine, agite et filtre. On évapore à sec les deux filtres réunis, triture le résidu avec de l'éther de pétrole, le redissout dans 300 ml d'acétate d'éthyle, lave la solution par HCl 1 N, NH<sub>4</sub>OH 1 N et H<sub>2</sub>O, séche et évapore à sec. On redissout le résidu dans 100 ml d'acétate d'éthyle chaud, ajoute 110 ml d'éther de pétrole et garde pendant 3 h à 0°. Le tripeptide cristallise. Après filtration, lavage à l'éther de pétrole et séchage, on obtient 4,23 g (63%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-tyrosinate de méthyle de F. 152°.  $[\alpha]_D^{21} = -24,6^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,1$ ; méthanol);  $-25,0^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,1$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^a = 0,95$ ;  $Rf_A^a = 0,90$ ;  $Rf_P^a = 0,80$ ;  $E_{1,9}^a = 0,7$  Try;  $E_{5,8}^a = 1,0$  Try (révélation par ninhydrine, FOLIN et chlore; homogène).

$C_{37}H_{39}O_7N_3S$       Calc. C 66,4 H 5,9 O 16,7 N 6,3 S 4,8%  
(669,8)      Tr. „ 66,7 „ 6,0 „ 16,6 „ 6,4 „ 4,8%

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-tyrosylhydrazide (XIII).* On chauffe à reflux, sous agitation, une solution de 3,35 g (5,0 mmoles) de l'ester tripeptidique XII dans 33 ml de méthanol contenant 3,3 ml d'hydrate d'hydrazine. Après 10 min déjà, l'hydrazide commence à

cristalliser. On continue le chauffage et l'agitation pendant encore 2 h, laisse 5 h à 0°, filtre, essore soigneusement, lave deux fois à l'éther, six fois à l'eau et sèche au vide sur  $P_2O_5$ . On obtient 2,58 g (77%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-tyrosylhydrazide cristallin de F. 234°.  $[\alpha]_D^{25} = -35,9^\circ \pm 0,5^\circ$  ( $c = 1,0$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^a = 0,95$ ;  $Rf_P^a = 0,85$ ;  $E_{1,9}^a = 1,0$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,6$  His (révélation par ninhydrine, PAULY, FOLIN, chlore; cf.7)).

$C_{36}H_{39}O_6N_5S$	Calc. C 64,6	H 5,9	O 14,3	N 10,5	S 4,8%
	(669,8)	Tr. ..	64,6 ..	5,7 ..	14,8 .. 10,3 .. 4,6%

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-tyrosylazide (XIV).* On dissout 2,00 g (3,0 mmoles) de l'hydrazide tripeptidique XIII dans un mélange de 24 ml de diméthylformamide, 18 ml d'isopropanol et 1,5 ml de HCl 6 N, refroidit à -5° et, sous forte agitation, ajoute 0,66 ml de  $NaNO_2$  aqueux 5 M. On agite 5 min, ajoute 20 ml de  $NaHCO_3$  1 M et 75 ml d'eau à 0°, agite encore 5 min, filtre, lave le précipité avec 50 ml d'eau, essore et sèche au vide poussé à 0°. Après 3 h de séchage, on obtient 1,98 g (98%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-tyrosylazide sec, fondant à 120° avec un fort dégagement gazeux. L'azide est immédiatement utilisé pour la préparation des nonapeptides.

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-tyrosyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-e-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XV).* On dissout 1,36 g (2,0 mmoles) de l'azide tripeptidique XIV et 1,78 g (2,0 mmoles) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-e-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide<sup>5)</sup> dans 20 ml de diméthylformamide. Après 12 h à 20° sous agitation et concentration au vide, on précipite par adjonction de 100 ml d'éther sec, filtre et lave deux fois de suite dans 20 ml de méthanol bouillant avec filtrations à chaud. Après séchage, on obtient 1,52 g (49%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-phénylalanyl-L-tyrosyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-e-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 200°.  $[\alpha]_D^{25} = -34,5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,0$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^a = 0,90$ ;  $Rf_A^a = 0,85$ ;  $Rf_P^a = 0,75$ ;  $E_{1,9}^a = 0,4$  Try (révélation par ninhydrine, FOLIN et chlore; homogène).

$C_{75}H_{91}O_{16}N_{13}S_3$	Calc. C 59,0	H 6,1	O 16,8	N 11,9	S 6,3%
	(1526,8)	Tr. ..	58,7 ..	5,9 ..	17,0 .. 11,9 .. 6,5%

*Phé<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine (Phé<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-oxytocine) (XVI).* On dissout 763 mg (0,5 mmole) de l'amide nonapeptidique XV dans 500 ml d'ammoniac redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air, purifie par contre-courant et passe sur résine comme pour la Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressine (V) ci-dessus. Le produit obtenu à partir du sommet principal ( $K = 0,75$ ) représente plus de la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène à la chromatographie ( $Rf_M = 0,33$ ;  $Rf_A = 0,34$ ;  $Rf_P = 0,05$ ) et à l'électrophorèse ( $E_{1,9} = 1,0$  Try;  $E_{5,8} = 0,8$  His), après révélation à la ninhydrine, au FOLIN, au bleu de bromophénol et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques<sup>13)</sup>, exprimées en unités internationales par mg: baisse de la pression sanguine du coq, moins de 0,01; pression sanguine du rat 0,14 ± 0,01; inhibition de la diurèse du rat 0,013 ± 0,002; contraction de l'utérus isolé de rat, moins de 0,01.

#### d) Synthèse de la Tyr<sup>3</sup>-oxytocine

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tyrosyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XVII).* On dissout 680 mg (0,97 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tyrosylazide (III) et 700 mg (0,97 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide<sup>3)</sup> dans 12,5 ml de diméthylformamide. Après 30 h à 20° sous agitation et concentration au vide, on précipite par l'accétate d'éthyle. Après deux lavages dans chaque fois 8 ml de méthanol bouillant, suivis de filtrations à chaud et séchage, on obtient 623 mg (47%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tyrosyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 210° instantané et F. 218° avec préchauffage.  $[\alpha]_D^{20} = -50,6^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 0,75$ ; diméthylformamide).  $Rf_M^a = 0,95$ ;  $E_{1,9}^a = 0,5$  Try;  $E_{5,8}^a = 0,5$  Try (révélation par ninhydrine, FOLIN et chlore; homogène).

$C_{68}H_{84}O_{15}N_{12}S_2$	Calc. C 59,5	H 6,1	O 17,5	N 12,2	S 4,7%
	(1373,6)	Tr. ..	59,2 ..	6,3 ..	17,5 .. 11,8 .. 5,0%

*Tyr<sup>3</sup>-oxytocine (XVIII).* On dissout 275 mg (0,2 mmole) de l'amide nonapeptidique XVII 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 70 mg de  $NH_4Cl$ , on évapore à sec

au vide, reprend par 200 ml d'acide acétique 0,02 M, ajuste au pH 7,5 et fait passer un courant d'air jusqu'à réaction négative au nitroprussiate. On acidifie à pH 4,5, concentre au vide à 50 ml, équilibre avec du sec-butanol et place dans les deux premiers tubes d'un appareil à contre-courant. Après 250 transferts dans le système sec-butanol-acide acétique 0,017 M, on détermine la courbe de répartition sur des aliquotes<sup>15)</sup>. On obtient un sommet principal de K = 0,35 et un sommet secondaire de K = 0,18. Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré au vide. Le produit obtenu, qui représente environ la moitié de l'azote peptidique mis dans l'appareil, est homogène à la chromatographie (Rf<sub>M</sub> = 0,64; Rf<sub>A</sub> = 0,65; Rf<sub>P</sub> = 0,41) et à l'électrophorèse (E<sub>1,9</sub> = 0,52 Try; E<sub>5,8</sub> = 0,40 His), après révélation à la ninhydrine, au FOLIN, au bleu de bromophénol et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques<sup>13)</sup>, exprimées en unités internationales par mg: utérus de rat isolé 0,10 ± 0,03; baisse pression sanguine du poulet, env. 0,03; pression interne de la glande mammaire du lapin 1,5 ± 0,3; pression sanguine du rat, env. 0,01; pression sanguine du chat, env. 0,01.

#### e) Synthèse de la Phé<sup>2</sup>-Phé<sup>3</sup>-oxytocine

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyL-L-leucyl-glycinamide (XIX).* A une solution de 665 mg (1,0 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalanyl-L-phénylalanylazide (IX) dans 10 ml de diméthylformamide, on ajoute 719 mg (1,0 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyL-L-leucyl-glycinamide<sup>3)</sup>, agite 48 h à 20°, concentre sous vide et précipite le nonapeptide brut par l'acétate d'éthyle. Après 2 h à -20° on filtre, lave à l'éther et sèche. On obtient 1,06 g (79%) de produit brut que l'on purifie par deux lavages successifs dans 7 ml de méthanol bouillant. On obtient ainsi 755 mg (56%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalanyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-L-prolyL-L-leucyl-glycinamide de F. 246°. [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> = -50° ± 1° (c = 1,2; diméthylformamide). Rf<sub>M</sub> = 0,95; Rf<sub>A</sub> = 0,80; E<sub>1,9</sub> = 0,5 Try (révélation par ninhydrine, chlore; homogène).

C<sub>68</sub>H<sub>84</sub>O<sub>13</sub>N<sub>12</sub>S<sub>2</sub> Calc. C 60,9 H 6,3 O 15,5 N 12,5 S 4,8%  
(1341,6) Tr. , 61,0 , 6,6 , 15,2 , 12,2 , 4,9%

*Phé<sup>2</sup>-Phé<sup>3</sup>-oxytocine (XX).* On dissout 268 mg (0,2 mmole) de l'amide nonapeptidique XIX dans 200 ml d'ammoniac redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air et purifie par contre-courant comme pour la Tyr<sup>3</sup>-oxytocine (XVIII) ci-dessus. On obtient un sommet principal de K = 0,60 et un sommet secondaire de K = 0,22. Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré au vide. Le produit obtenu représente environ la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène à la chromatographie (Rf<sub>M</sub> = 0,64; Rf<sub>A</sub> = 0,65; Rf<sub>P</sub> = 0,49) et à l'électrophorèse (E<sub>1,9</sub> = 0,74 Try; E<sub>5,8</sub> = 0,52 His), après révélation à la ninhydrine, au bleu de bromophénol et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques<sup>13)</sup>, exprimées en unités internationales par mg: utérus de rat isolé 3,3 ± 0,3; baisse pression sanguine du poulet, 5,4 ± 0,9; pression interne de la glande mammaire du lapin 24,6 ± 9,0; pression sanguine du rat, env. 0,9; inhibition de la diurèse du rat 5,7 ± 0,6.

#### f) Synthèse de la Phé<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-oxytocine

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalanyl-L-tyrosyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyL-L-leucyl-glycinamide (XXI).* On dissout 660 mg (0,97 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalanyl-L-tyrosylazide (XIV) et 700 mg (0,97 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyL-L-leucyl-glycinamide<sup>3)</sup> dans 10 ml de diméthylformamide, agite 12 h à 20° et évapore à sec au vide poussé. On tritue le résidu avec de l'éther sec, filtre, lave deux fois avec 10 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud et sèche. On obtient 560 mg (43%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalanyl-L-tyrosyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyL-L-leucyl-glycinamide de F. 218°. [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> = -44,5° ± 1° (c = 1,0; diméthylformamide). Rf<sub>M</sub> = 0,90; Rf<sub>A</sub> = 0,85; Rf<sub>P</sub> = 0,75; E<sub>1,9</sub> = 0,5 Try (révélation par ninhydrine, FOLIN, chlore; homogène).

C<sub>68</sub>H<sub>88</sub>O<sub>14</sub>N<sub>12</sub>S<sub>2</sub> Calc. C 60,2 H 6,2 O 16,5 N 12,4 S 4,8%  
(1337,6) Tr. , 59,7 , 6,3 , 16,5 , 12,3 , 5,1%

*Phé<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-oxytocine (XXII).* On dissout 267 mg (0,2 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-phénylalanyl-L-tyrosyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyL-L-leucyl-glycinamide (XXI) dans 200 ml d'ammoniac redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air et purifie

par contre-courant comme pour la Tyr<sup>3</sup>-oxytocine (XVIII) ci-dessus. On obtient un sommet principal de  $K = 0,43$  et un sommet secondaire de  $K = 0,16$ . Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et évaporé au vide. Le produit obtenu représente environ la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène à la chromatographie ( $Rf_M = 0,69$ ;  $Rf_A = 0,55$ ;  $Rf_B = 0,39$ ) et à l'électrophorèse ( $E_{1,9} = 0,58$  Try;  $E_{5,8} = 0,42$  His), après révélation par la ninhydrine, le bleu de bromophénol, le FOLIN et le chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques<sup>13)</sup>, exprimées en unités internationales par mg: baisse de la pression sanguine du coq, moins de 0,01; pression sanguine du rat, moins de 0,01; inhibition de la diurèse du rat, env. 0,001; contraction de l'utérus isolé de rat, moins de 0,01.

#### SUMMARY

The following analogues of oxytocin and lysine-vasopressin have been synthesized: Tyr<sup>3</sup>-oxytocin, Phe<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup>-oxytocin, Phe<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-oxytocin, Phe<sup>2</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressin, Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressin, Phe<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Lys<sup>8</sup>-vasopressin.

The method of synthesis is based on the condensation of the azides of tripeptides, formed by coupling N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosine or N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-phenylalanine with L-phenylalanine methylester or L-tyrosine methyl-ester, with L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide or L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide. Cleavage of the protecting groups of the resulting nonapeptides with sodium in liquid ammonia, oxidation with air in diluted aqueous solution and purification by counter-current distribution, affords the desired cyclic nonapeptide amides.

The relations between the constitutions and the biological activities of these new analogues are discussed.

Laboratoires de Chimie pharmaceutique SANDOZ, Bâle

### 27. Synthèse de dix analogues de l'oxytocine et de la lysine-vasopressine, contenant de la sérine, de l'histidine ou du tryptophane en position 2 ou 3

par St. GUTTMANN et R. A. BOISSONNAS

(27 XI 59)

Parmi les différents analogues de l'oxytocine et de la vasopressine synthétisés jusqu'ici, la plupart de ceux présentant des modifications en position 2 ou 3<sup>1-11)</sup> possédaient encore les activités caractéristiques de ces hormones à un degré impor-

<sup>1)</sup> R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, Helv. 39, 1421 (1956).

<sup>2)</sup> R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, J.-P. WALLER, H. KONZETZ & B. BERDE, Nature 178, 260 (1956).

<sup>3)</sup> J. RUDINGER, J. HONZL & M. ZAORAL, Coll. czechoslov. chem. Commun. 21, 770 (1956).

<sup>4)</sup> B. BERDE, W. DOEPFNER & H. KONZETZ, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 12, 209 (1957).

<sup>5)</sup> P. G. KATSOYANNIS, J. Amer. chem. Soc. 79, 109 (1957).

<sup>6)</sup> P. G. KATSOYANNIS & V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chem. 233, 1352 (1958).

<sup>7)</sup> P.-A. JAQUENOUD & R. A. BOISSONNAS, Helv. 42, 788 (1959).

<sup>8)</sup> M. BODANSKY & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. 81, 1258, 6072 (1959).

<sup>9)</sup> H. KONZETZ & B. BERDE, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 14, 333 (1959).

<sup>10)</sup> R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, Helv. 43, 182 (1960).

<sup>11)</sup> R. A. BOISSONNAS & ST. GUTTMANN, Helv. 43, 190 (1960).