

par contre-courant comme pour la Tyr³-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 biologiques¹³⁾, 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: Tyr³-oxytocin, Phe²-Phe³-oxytocin, Phe²-Tyr³-oxytocin, Phe²-Lys⁸-vasopressin, Tyr³-Lys⁸-vasopressin, Phe²-Tyr³-Lys⁸-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 3¹⁻¹¹⁾ possédaient encore les activités caractéristiques de ces hormones à un degré impor-

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

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

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

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

⁵⁾ P. G. KATSOYANNIS, J. Amer. chem. Soc. 79, 109 (1957).

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

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

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

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

¹⁰⁾ R. A. BOISSONNAS & R. L. HUGUENIN, Helv. 43, 182 (1960).

¹¹⁾ R. A. BOISSONNAS & ST. GUTTMANN, Helv. 43, 190 (1960).

tant. Ces modifications se limitaient cependant à la suppression de l'hydroxyle de la tyrosine occupant la position 2⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹¹⁾, ou au remplacement de l'acide aminé occupant la position 3 par un autre acide aminé aliphatique¹⁾²⁾³⁾⁴⁾ ou aromatique¹⁾⁴⁾⁵⁾¹¹⁾ neutre¹²⁾.

Nous avons donc voulu examiner l'influence de modifications plus importantes en introduisant dans ces deux positions des acides aminés portant des groupements que l'on ne trouve pas dans les molécules de ces deux hormones.

Dans le présent travail, nous décrivons la synthèse et les propriétés de nouveaux analogues de l'oxytocine (tab. I) et de la lysine-vasopressine (tab. II) contenant, en position 2 ou 3, de la séroline (fonction alcool), de l'histidine (groupement imidazole) ou du tryptophane (groupement indole).

Les huit analogues contenant de la séroline ou du tryptophane ont été préparés selon le schéma de synthèse que nous avons déjà employé précédemment pour la synthèse de l'oxytocine¹³⁾ et de différents analogues¹⁾⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾. La N-CBO-S-benzyl-L-cystéine est condensée avec l'ester de l'acide aminé devant occuper la position 2, et l'ester dipeptidique ainsi obtenu est saponifié dans son groupe ester. L'ester de l'acide aminé devant occuper la position 3 est alors relié au dipeptide par la méthode à la dicyclohexyl-carbodiimide¹⁴⁾, et l'ester tripeptidique formé est transformé en hydrazide, puis en azide correspondant. Ce dernier est condensé avec le L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinylnyl-L-prolyl-L-leucyl-L-glycinamide¹³⁾ ou avec le L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinylnyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide¹⁰⁾, de façon à obtenir le nonapeptide correspondant.

Une variante de ce schéma a été utilisée pour la synthèse des deux analogues contenant de la phénylalanine en position 2 et de l'histidine en position 3: la N-CBO-S-benzyl-L-cystéine a été condensée avec le L-histidyl-L-phénylalaninate de méthyle¹⁵⁾. Après saponification de la fonction ester, le tripeptide obtenu a été condensé par la méthode à la dicyclohexyl-carbodiimide¹⁴⁾ avec les hexapeptides ci-dessus.

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 homogènes¹⁶⁾ par révélation au moyen d'une série de réactifs différents¹⁷⁾.

Les groupes protecteurs (N-CBO-, S-benzyl- et N-tosyl-) des nonapeptides protégés ont été enlevés par traitement au sodium dans l'ammoniac liquide¹⁸⁾. Après

¹²⁾ Pour une revue sur l'influence de ces modifications sur les propriétés biologiques, voir les articles de H. KONZETZ et de R. A. BOISSONNAS dans «Symposium on polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels» (Londres, 23-24 mars 1959), Pergamon Press, Londres, sous presse.

¹³⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD & J.-P. WALLER, Helv. 38, 1491 (1955).

¹⁴⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).

¹⁵⁾ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, R. L. HUGUENIN, P.-A. JAQUENOUD & ED. SANDRIN, Helv. 41, 1867 (1958).

¹⁶⁾ 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 un produit de réaction secondaire entre le bromure de benzyle formé et la fonction hydrazide.

¹⁷⁾ Voir la partie expérimentale.

¹⁸⁾ V. DU VIGNEAUD, CH. RESSLER, J. M. SWAN, C. W. ROBERTS & P. G. KATSOYANNIS, J. Amer. chem. Soc. 76, 3115 (1954).

oxydation à l'air en solution aqueuse diluée, les nonapeptides cycliques bruts obtenus ont été débarrassés par contre-courant de quelques impuretés peptidiques mineures¹⁹⁾. Les coefficients de partage des analogues de l'oxytocine dans le système sec-butanol – acide acétique 0,017 M sont donnés dans le tableau I; ceux des analogues de la lysine-vasopressine dans le système sec-butanol – acide p-toluenesulfonique 0,08 M, 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 réactifs¹⁷⁾. Chaque analogue s'est montré homogène sous ces différentes conditions d'examen.

Les analogues contenant de la sérine ou de l'histidine possèdent des Rf chromatographiques et des coefficients de partage nettement inférieurs à ceux des hormones dont ils sont dérivés. L'introduction d'un groupe alcool ou imidazole dans des molécules aussi grosses augmente donc déjà notablement la solubilité dans l'eau au détriment des solvants organiques. Cette augmentation est plus marquée dans ce cas que lors de l'introduction d'un groupe phénolique supplémentaire¹¹⁾. Par contre les deux analogues contenant du tryptophane en position 3 ont des Rf très voisins et des coefficients de partage même très légèrement supérieurs à ceux des hormones dont ils sont dérivés.

Les activités oxytociques et vasopressives de ces différents analogues ont été déterminées par le Prof. H. KONZETZ et le Dr B. BERDE de notre Département pharmacologique (Dir.: Dr A. CERLETTI)²⁰⁾.

Aucun des analogues de l'oxytocine contenant de la sérine ou de l'histidine n'a montré une activité oxytocique appréciable (tab. I). Il est remarquable que la tyrosine en position 2 puisse être remplacée par la phénylalanine⁷⁾⁹⁾ avec formation d'un corps possédant encore environ 30% de l'activité oxytocique de la molécule originale, mais que le remplacement de cette tyrosine par la sérine conduise à un produit pratiquement dénué d'activité.

Le remplacement de l'isoleucine en position 3 de l'oxytocine par la valine¹⁾²⁾³⁾⁴⁾, la leucine¹⁾³⁾⁴⁾ ou la phénylalanine¹⁾⁴⁾⁵⁾ conduit à des analogues possédant encore des activités oxytociques importantes¹²⁾. Par contre le remplacement de cette isoleucine par le tryptophane (tab. I), comme son remplacement par la tyrosine¹¹⁾ d'ailleurs, diminue considérablement l'activité.

En ce qui concerne les analogues de la lysine-vasopressine décrits dans ce travail (tab. II), nous voyons qu'aucun d'eux ne possède plus de 1/1000 de l'activité vasopressive de l'hormone originale.

¹⁹⁾ 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). Ces réactions secondaires sont moins importantes dans le cas de la lysine-vasopressine et de ses analogues.

²⁰⁾ Les déterminations des activités biologiques ont été effectuées selon les méthodes précédemment utilisées⁴⁾⁹⁾. Les activités sont exprimées par rapport au «Troisième standard international pour la détermination des activités oxytociques, vasopressives et antidiurétiques». Une communication préliminaire sur les activités biologiques de ces analogues a été donnée par B. BERDE, A. CERLETTI & H. KONZETZ au «Symposium sur l'oxytocine», 17-19 août 1959, Montevideo.

Tableau I. Analogues de l'oxytocine

Formules et noms des analogues	Activités oxytociques en unités intern. par mg	Activités vasopressiques en unités intern. par mg	Coefficient de répartition entre sec-butanol et acide acétique 0,017δM	Rf chromatographiques dans les mélanges:		Mobilités électrophorétiques relatives:
				M 21)	A 21)	
1 H-CyS-Tyr ¹ -Ileu-Glu(NH ₂) ² -Asp(NH ₂) ³ -CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂	5 450	6 450	8 5	9 4	9 0,40	
Oxytocine						
H-CyS-Ser ¹ -Ileu-Glu(NH ₂) ² -Asp(NH ₂) ³ -CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂	< 0,01	< 0,01	< 0,01	—	—	
Ser ² -oxytocine						
H-CyS-Ser ¹ -His ² -Glu(NH ₂) ³ -Asp(NH ₂) ² -CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂	< 0,01	0,03	—	< 0,01	0,05	
Ser ² -His ³ -oxytocine						
H-CyS-His ¹ -Ph ² -Glu(NH ₂) ³ -Asp(NH ₂) ² -CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂	* < 0,01	< 0,01	—	< 0,01	0,16	
His ² -Phe ³ -oxytocine						
H-CyS-Tyr-Try ¹ -Glu(NH ₂) ² -Asp(NH ₂) ³ -CyS-Pro-Leu-Gly-NH ₂	0,04	0,1	0,1	0	0,54	
Try ³ -oxytocine						

21) M = méthyléthylcétone/pyridine/eau (65:15:25);
A = alcool isoamylelique/pyridine/eau (35:35:30);
P = n-butanol/acide acétique/eau (70:10:20).

Tableau II. Analogues de la lysine-vasopressine

Formules et noms des analogues	Activités oxytociques en unités intern.		Activités vasopressiques en unités intern. par mg		Coef-ficient de réparti-tion entre sec-butanol et acide p-toluène-sulfonique 0,08M		Rf chromato-graphiques dans les mélanges:		Mobilités électro-phorétiques relatives:	
	utérus de rat (*la-pin isolé)	baisse glande mammaire du lapin	utérus de rat pres-sion du coq	baisse pres-sion du rat	pression du chat	M ²¹⁾	A ²¹⁾	P ²¹⁾	pH 1,9	pH 5,8
H-CyS-Tyr-Phé-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂	4	30	46	270	310	0,73	0,34	0,42	0,11	1,02 Try 0,75 His
Lys ⁸ -vasopressine	< 0,01	< 0,01	0,01	0,1	—	0,49	0,05	0,25	0,07	1,14 Try 0,93 His
H-CyS-Sér-Ileu-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂	< 0,01	< 0,02	—	< 0,02	0,04	0,34	0,02	0,07	0,01	1,55 Try 1,00 His
Sér ² -Ileu ³ -Lys ⁸ -vasopressine	< 0,01	—	< 0,01	—	< 0,01	0,33	0,01	0,07	0,01	1,58 Try 1,00 His
H-CyS-Sér-His-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂	< 0,01	—	< 0,01	—	< 0,01	0,33	0,01	0,07	0,01	1,58 Try 1,00 His
Sér ² -His ³ -Lys ⁸ -vasopressine	< 0,01	—	< 0,01	—	< 0,01	0,33	0,01	0,07	0,01	1,58 Try 1,00 His
H-CyS-His-Sér-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂	*	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,08	0,53	0,16	0,25	0,05	1,51 Try 1,00 His
His ² -Lys ⁸ -vasopressine	< 0,01	< 0,01	0,04	< 0,01	—	0,45	0,15	0,25	0,05	1,07 Try 0,81 His
H-CyS-Tyr-Sér-Glu(NH ₂)-Asp(NH ₂)-CyS-Pro-Lys-Gly-NH ₂	< 0,01	< 0,01	0,04	< 0,01	—	0,45	0,15	0,25	0,05	1,07 Try 0,81 His
Sér ³ -Lys ⁸ -vasopressine	< 0,01	0,08	< 0,01	0,07	0,3	0,77	0,28	0,35	0,10	0,99 Try 0,72 His
Try ³ -Lys ⁸ -vasopressine	< 0,01	0,08	< 0,01	0,07	0,3	0,77	0,28	0,35	0,10	0,99 Try 0,72 His

Nous avons vu que le remplacement de la phénylalanine en position 3 de la lysine-vasopressine par l'isoleucine¹⁰⁾ conduit à un analogue ayant encore environ $1/_{10}$ de l'activité vasopressique originale, et que son remplacement par la tyrosine¹¹⁾ laisse subsister encore environ $1/_{100}$ de cette activité. Nous voyons dans le tableau II que son remplacement par le tryptophane n'en laisse subsister que moins de $1/_{1000}$, et son remplacement par la sérine, que moins de $1/_{10\,000}$.

Partie expérimentale²²⁾²³⁾

Les *F.* 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^{-3} Torr (16 h à 60° pour les analyses). Les *évaporations sous vide* ont été conduites dans l'évaporateur rotatif de CRAIG²⁴⁾.

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 isoamylque/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 à 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 & PFLEIDERER²⁵⁾: 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° ; fixation par le nitrate de cuivre alcoolique²⁶⁾); *réactif tyrosine-tryptophane de FOLIN*²⁷⁾, dilué par un volume d'eau (exposition ultérieure à des vapeurs de NH₃ sans séchage préalable); *réactif de l'histidine de PAULY*²⁸⁾, préparé à partir de sulfanilamide; *réactif au chlore-iodure-amidon*²⁹⁾ 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 chromatogramme d'une solution d'amidon à 1% et, après 1 min, vaporisation sur l'autre côté d'une solution d'iodure de potassium à 1%); *réactif au bleu de bromophénol*³⁰⁾.

a) Synthèse de la Sér²-oxytocine

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-sérintate de méthyle (I). On dissout 11,0 g (32 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine et 4,5 ml (32 mmoles) de triéthylamine dans 110 ml de tétrahydrcfurane anhydre. On refroidit à -10° et sous forte agitation on ajoute, goutte à goutte, 3,1 g (34 mmoles) de chloroformate d'éthyle. Après 10 min, on ajoute encore une solution de 4,65 g (30 mmoles) de chlorhydrate de L-sérintate de méthyle³¹⁾ et de 4,5 ml (32 mmoles) de triéthyl-

²²⁾ 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).

²³⁾ Nous remercions de leur collaboration expérimentale dans la préparation des produits de départ et l'exécution des contre-courants, des chromatographies et des électrophorèses: Mlle M. BUCHMANN et MM. E. FLÜCKIGER et J. BORKO.

²⁴⁾ L. C. CRAIG, J. C. GREGORY & W. HAUSMANN, Anal. Chemistry 22, 1462 (1950).

²⁵⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, Angew. Chem. 67, 257 (1955).

²⁶⁾ TH. WIELAND & E. KAWERAU, Nature 168, 77 (1951).

²⁷⁾ O. FOLIN & V. CIOCALTEU, J. biol. Chemistry 73, 629 (1927).

²⁸⁾ R. BLOCK, E. L. DURRUM & G. ZWEIG, Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, p. 95, Academic Press, New York 1955.

²⁹⁾ H. RYDON & P. SMITH, Nature 169, 922 (1952).

³⁰⁾ 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).

³¹⁾ S. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, Helv. 41, 1852 (1958).

amine dans 45 ml de chloroforme, et agite pendant 4 h à 20°. On évapore à sec et redissout dans un mélange de 200 ml d'acétate d'éthyle et de 50 ml d'eau. On lave la solution organique par H₂O, HCl 1N, NH₄OH 1N et NaCl 33%, la séche sur du sulfate de sodium, l'évapore à sec et redissout le résidu dans 100 ml d'éther. Le dipeptide obtenu cristallise après 12 h à 0°. On filtre, lave avec de l'éther froid et de l'éther de pétrole et séche sous vide poussé. On obtient 8,4 g (63%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-sérinate de méthyle cristallin de F. 111°. [α]_D²² = -29,2° ± 0,5° (c = 2,0; méthanol); -31° ± 1° (c = 1,8; diméthylformamide). Rf_M^a = 0,95; E_{1,9}^a = 1,1 Try; E_{5,8}^a = 0,9 His (révélation par ninhydrine, chlore; homogène).

C ₂₂ H ₂₆ O ₆ N ₂ S	Calc. C 59,2	H 5,9	O 21,5	N 6,3	S 7,2%
(446,5)	Tr. ,,	59,3 ,,	6,3 ,,	21,5 ,,	6,0 ,,

Par l'emploi de la méthode à la dicyclohexyl-carbodiimide, on obtient un produit de mêmes propriétés. Cependant le produit brut de synthèse est plus difficile à purifier et le rendement en produit pur n'atteint que 57%.

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-sérine (II). On dissout 10,0 g (22,4 mmoles) de l'ester peptidique I dans 50 ml de méthanol et 50 ml d'acétone et ajoute 26 ml de NaOH 1N et 13 ml d'eau. On garde la solution homogène 1 h à 20°, amène le pH à 2 par adjonction de 7 ml de HCl 4N, concentre au vide jusqu'à 50 ml, ajoute 20 ml d'eau, tritue soigneusement le précipité qui s'est formé, filtre et séche au vide. On redissout les 8,76 g de produit brut obtenu dans 30 ml de méthanol bouillant et laisse 12 h à -20°. Après filtration et séchage, on obtient 7,10 g (74%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-sérine cristalline de F. 178°. [α]_D²⁰ = -23,7° ± 0,5° (c = 1,9; méthanol); -28,9° ± 0,5° (c = 1,8; diméthylformamide). Rf_M^a = 0,65; E_{1,9}^a = 1,0 Try; E_{5,8}^a = 1,0 Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

C ₂₁ H ₂₄ O ₆ N ₂ S	Calc. C 58,3	H 5,6	O 22,2	N 6,5	S 7,4%
(432,5)	Tr. ,,	58,0 ,,	5,6 ,,	22,3 ,,	6,2 ,,

On obtient le même produit, mais avec un rendement de 31% seulement, à partir de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine et du sel de lithium de la L-sérine par la méthode à l'anhydride mixte³²⁾.

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-isoleucinate de méthyle (III). On dissout 4,32 g (10 mmoles) de II et 1,60 g (11 mmoles) de L-isoleucinate de méthyle¹³⁾ dans 50 ml d'acetonitrile, refroidit à -10°, ajoute 2,58 g (1,25 mmole) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite 16 h à 20°. Après quelques minutes déjà la dicyclohexylurée commence à cristalliser et le tripeptide formé cristallise aussi partiellement. On évapore le mélange à sec, reprend dans 50 ml de pyridine, agite quelques instants, puis filtre. On évapore à sec, tritue avec de l'éther de pétrole jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent, redissout dans un mélange de 50 ml de n-butanol et 200 ml d'acétate d'éthyle, lave par HCl 1 N H₂O, NH₄OH 1 N, séche sur du sulfate de sodium et évapore à sec. On recristallise le résidu deux fois dans chaque fois 20 ml de n-butanol bouillant, qui est ensuite refroidi à 0°. On obtient 3,15 g (56%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-isoleucinate de méthyle cristallisé, de F. 134°. [α]_D²² = -25,2° ± 0,5° (c = 1,0; méthanol); -18,2° ± 0,5° (c = 1,0; diméthylformamide). Rf_M^a = 0,95; Rf_A^a = 0,90; Rf_P^a = 0,85; E_{5,8}^a = 0,8 His; E_{1,9}^a = 1,0 Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

C ₂₈ H ₃₇ O ₇ N ₃ S	Calc. C 60,1	H 6,7	O 20,0	N 7,5	S 5,7%
(559,7)	Tr. ,,	59,9 ,,	7,0 ,,	19,8 ,,	7,5 ,,

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-isoleucylhydrazide (IV). On chauffe à reflux une solution de 2,24 g (4,0 mmoles) de l'ester III et de 2,5 ml d'hydrate d'hydrazine dans 25 ml de méthanol pendant 2 h. On laisse pendant 24 h à 20°, filtre, lave par 10 ml de méthanol, par trois fois 10 ml d'éther et par 8 fois 10 ml d'eau. Après séchage au vide sur P₂O₅, on obtient 1,46 g (65%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-isoleucylhydrazide cristallin de F. 234°. [α]_D²⁰ = -12,6° ± 1° (c = 1,0; diméthylformamide). Rf_M^a = 0,95; Rf_A^a = 0,90; Rf_P^a = 0,75; E_{1,9}^a = 1,2 Try; E_{5,8}^a = 0,8 His (révélation par ninhydrine, FOLIN et chlore; cf. 1⁶)).

C ₂₇ H ₃₇ O ₆ N ₅ S	Calc. C 57,9	H 6,7	O 17,1	N 12,5	S 5,7%	équ. 560
(559,7)	Tr. ,,	56,9 ,,	6,8 ,,	17,1 ,,	12,7 ,,	5,5% ,,, 556

³²⁾ R. A. BOISSONNAS, Helv. 34, 874 (1951); TH. WIELAND & H. BERNHARD, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 (1951); J. R. VAUGHAN & R. L. OSATO, J. Amer. chem. Soc. 73, 3547, 5553 (1951); 74, 676 (1952).

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (V). On dissout 672 mg (1,2 mmole) de l'hydrazide IV dans 10 ml de diméthylformamide, refroidit à -5° , ajoute 1,5 ml de HCl 4 N, puis 6,0 ml de diméthylformamide additionnés de 0,26 ml de NaNO₂ 5 N aqueux refroidis à -5° . On agite 5 min puis ajoute 0,84 ml (6,0 mmoles) de triéthylamine et 35 ml d'acétate d'éthyle à -5° . Le chlorhydrate de triéthylamine cristallise. On sèche rapidement sur sulfate de sodium, filtre et ajoute 864 mg (1,2 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide¹³⁾. On évapore l'acétate d'éthyle au vide à 20° et continue à agiter encore 16 h à 20° . On concentre à environ 3 ml à 60° sous vide, ajoute 50 ml d'acétate d'éthyle, filtre et sèche. On suspend le produit brut obtenu (1,41 g) dans 10 ml de méthanol bouillant, agite 5 min, filtre à chaud, répète l'opération encore une fois, puis sèche au vide. On obtient 563 mg (38%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 235°. $[\alpha]_D^{21} = -38,2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). Rf_M^a = 0,65; Rf_A^a = 0,60; E_{1,9}^a = 0,5 Try (révélation par ninhydrine et chlore; homogène).

C₅₉H₈₂O₁₄N₁₂S₂ Calc. C 56,8 H 6,6 O 18,0 N 13,5 S 5,1%
(1247,5) Tr. , 55,5 , 6,6 , 17,8 , 13,7 , 5,9%

Sér²-oxytocine (VI). On dissout 125 mg (0,1 mmole) de l'amide V dans 100 ml d'ammoniac liquide redistillé sur sodium et, sous agitation, ajoute lentement du sodium jusqu'à apparition d'une teinte bleue. Après adjonction de 60 mg de NH₄Cl, on évapore à sec au vide, reprend par 100 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 25 ml, équilibre avec du sec-butanol et place dans le premier tube 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 aliquotes³³⁾. On obtient un sommet principal de K = 0,21 et un sommet secondaire de K = 0,15. Les tubes centraux du sommet principal sont rassemblés et leur contenu, 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_M = 0,48; Rf_A = 0,50; Rf_P = 0,34) et à l'électrophorèse (E_{1,9} = 0,89 Try; E_{5,8} = 0,47 His), par révélation à la ninhydrine, au bleu de bromophénol et au chlor-iodure-amidon.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales²⁰⁾ par mg: moins de 0,01 sur l'utérus de rat isolé, la pression sanguine du poulet, la pression interne de la glande mammaire du lapin, la pression sanguine du rat et l'inhibition de la diurèse du rat.

b) Synthèse de la Sér²-His³-oxytocine

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-histidinate de méthyle (VII). A une solution de 4,32 g (10 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-séristine (II) dans 10 ml de diméthylformamide on ajoute une solution de 1,86 g (11 mmoles) de L-histidinate de méthyle (fraîchement préparé³⁴⁾ à partir de son dichlorhydrate) dans 50 ml d'acetonitrile. La solution homogène est refroidie à -5° , additionnée de 2,58 g (12,5 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agitée 12 h à 20° . On filtre de la dicyclohexylurée formée, évapore le filtrat sous vide, et triture le résidu avec de l'éther de pétrole jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent. On filtre, redissout le précipité dans 400 ml d'acétate d'éthyle et 100 ml d'eau, sépare la couche aqueuse, lave par H₂O, NH₄OH 1 N et NaCl 30%, sèche sur sulfate de sodium et évapore à sec. On redissout le résidu dans un mélange de 50 ml d'acétate d'éthyle et de 20 ml de dioxane à ébullition. Après 6 h à 0°, 4,94 g de tripeptide cristallisent. Après une seconde recristallisation dans le même mélange, on obtient 4,40 g (75%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-histidinate de méthyle cristallin de F. 130°. $[\alpha]_D^{22} = -8,3^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,0$; diméthylformamide); $-14,5^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 2,2$; méthanol). Rf_M^a = 0,95; Rf_A^a = 0,85; Rf_P^a = 0,25 (révélation par ninhydrine, PAULY, chlore; homogène).

C₂₅H₃₈O₇N₅S Calc. C 57,6 H 5,7 O 19,2 N 12,0 S 5,5%
(583,6) Tr. , 56,6 , 5,8 , 19,5 , 12,0 , 5,4%

³³⁾ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 793, 265 (1951).

³⁴⁾ Par dissolution à 0° dans 2 équivalents de NaOH 1,5 N, saturation par K₂CO₃ anhydre, extraction au chloroforme, séchage de la solution sur Na₂SO₄, évaporation au vide et séchage final au vide. Rendement 95%.

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-histidylhydrazide (VIII). A une solution de 1,75 g (3,0 mmoles) de l'ester VII dans 17,5 ml de méthanol, on ajoute 0,50 ml d'hydrate d'hydrazine et garde le tout à 20° pendant 3 jours. On filtre et lave le précipité par 5 ml de méthanol, 5 ml de méthanol-éther (1:1) et 10 ml d'éther. Après séchage sur P₂O₅ au vide poussé, on obtient 1,54 g (88%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-histidylhydrazide cristallin de F. 229°. [α]_D²¹ = -7,6° ± 0,5° (c = 2,0; diméthylformamide). Rf_M^a = 0,80; E_{1,9}^a = 1,3 Try, 0,6 His; E_{5,8}^a = 0,9 His (révélation par ninhydrine, PAULY, FOLIN, chlore; cf. 16)).

C ₂₇ H ₃₃ O ₆ N ₇ S	Calc.	C 55,6	H 5,7	O 16,5	N 16,8	S 5,5%
(583,7)	Tr.	,, 55,8	,, 6,0	,, 16,9	,, 16,7	,, 5,6%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-histidyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (IX). On suspend 292 mg (0,5 mmmole) de l'hydrazide VIII dans 2,5 ml de diméthylformamide, refroidit à -5°, ajoute 0,625 ml de HCl 4 N et agite vigoureusement. Après dissolution de l'hydrazide, on ajoute en 1 min 2,5 ml de diméthylformamide additionnés de 0,11 ml de NaNO₂ 5 N, également refroidis à -5°. On agite 5 min à -5°, ajoute 0,35 ml (2,5 mmoles) de triéthylamine, puis 360 mg (0,5 mmmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide¹⁹). Après 2 jours d'agitation à 20° et évaporation à sec au vide, on triture le résidu dans l'acétate d'éthyle, puis dans NH₄OH 0,2 N, filtre, sèche sur P₂O₅ au vide et obtient 434 mg de nonapeptide brut. On suspend pendant 10 min sous agitation dans 5 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud, répète ce lavage à chaud avec encore 5 ml de méthanol, filtre, sèche au vide et obtient 247 mg (39%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-histidyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 200°. Rf_M^a = 0,65; E_{1,9}^a = 1,0 Glu (révélation par ninhydrine, PAULY et chlore; homogène).

C ₅₉ H ₇₈ O ₁₄ N ₁₄ S ₂	Calc.	C 55,7	H 6,2	O 17,6	N 15,4	S 5,0%
(1271,5)	Tr.	,, 55,1	,, 6,4	,, 17,8	,, 15,3	,, 5,2%

Sér²-His³-oxytocine (X). On dissout 127 mg (0,1 mmmole) de l'amide IX dans 100 ml d'ammoniac liquide redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air et purifie par contre-courant comme pour la Sér²-oxytocine (VI) ci-dessus.

On obtient un sommet principal de K = 0,05. Les tubes centraux de ce sommet sont réunis et leur contenu, concentré au vide. Le produit obtenu représente environ la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène à la chromatographie (Rf_M^a = 0,22; Rf_A^a = 0,33; Rf_P^a = 0,05) et à l'électrophorèse (E_{1,9}^a = 1,17 Try; E_{5,8}^a = 0,70 His), par révélation à la ninhydrine, au PAULY, au bleu de bromophénol et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales²⁰) par mg: moins de 0,01 sur l'utérus de rat isolé et la pression sanguine du chat; environ 0,03 sur la pression sanguine du poulet.

c) Synthèse de la His²-Phé³-oxytocine

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-phénylalaninate de méthyle (XI). A une solution refroidie à -10° de 3,46 g (10 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine et de 1,40 ml (10 mmoles) de triéthylamine dans 50 ml de tétrahydrofurane anhydre, on ajoute goutte à goutte sous forte agitation 0,96 ml (10 mmoles) de chloroformate d'éthyle. Après 10 min, on ajoute une solution de 4,78 g (10 mmoles) de dibromhydrate de L-histidyl-L-phénylalaninate de méthyle¹⁵) et de 3,36 ml (24 mmoles) de triéthylamine dans 50 ml de chloroforme et agite 4 h à 20°. On évapore à sec, redissout le résidu dans un mélange de 200 ml d'acétate d'éthyle et de 50 ml d'eau, lave par H₂O, NH₄OH 1 N, CH₃COOH 0,1 N, NH₄OH 1 N, sèche et évapore à sec. On recristallise le résidu dans un mélange de 15 ml de méthanol, 150 ml d'éther et 150 ml d'éther de pétrole. On obtient 4,36 g (68%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-phénylalaninate de méthyle cristallisé, ayant, sans préchauffage, un F. 140°, suivi de resolidification en un produit de F. 172°. Si le produit est préchauffé en dessous de 140°, il fond directement à 172°. [α]_D²¹ = -28,6° ± 0,5° (c = 2,0; méthanol); [α]_D²⁰ = -31,8° ± 0,5° (c = 1,9; diméthylformamide). Rf_M^a = 0,80; E_{1,9}^a = 0,8 His; E_{5,8}^a = 0,9 His (révélation par ninhydrine, PAULY, chlore; homogène).

C ₃₄ H ₃₇ O ₆ N ₅ S	Calc.	C 63,4	H 5,8	N 10,9	S 5,0%
(643,8)	Tr.	,, 63,1	,, 5,9	,, 11,0	,, 4,9%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-phénylalanine (XII). A une solution de 1,29 g (2,0 mmoles) de l'ester XI dans 20 ml de méthanol, on ajoute 1,0 ml de NaOH 4 N et laisse 1 h à 20°. On ajoute 1,0 ml de HCl 4 N et évapore à sec à 35° sous vide, en contrôlant que le pH soit à 6–6,5. Le résidu est repris dans 10 ml d'acide acétique 0,1 N, trittré jusqu'à obtention d'un produit cristallin, lavé par l'eau glaciée et séché au vide sur P₂O₅. On obtient 990 mg (79%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-phénylalanine cristalline, de F. 188°. [α]_D²⁰ = -2,7° ± 0,5° (c = 1,8; méthanol); -20,0° ± 0,5° (c = 1,7; pyridine). Rf_M = 0,55; E_{1,9}^a = 0,7 His, 1,1 Glu; E_{5,8}^a = 0,6 His (révélation par ninhydrine, PAULY et chlore; homogène).

C₃₃H₃₅O₆N₅S Calc. C 63,0 H 5,6 O 15,3 N 11,1 S 5,1% équ. 630
(629,7) Tr. „ 63,0 „ 6,0 „ 15,7 „ 10,7 „ 5,3% „ 630

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-phénylalanylhydrazide (XIII). On chauffe à reflux une solution de 1,61 g (2,5 mmoles) de l'ester XI dans 20 ml de méthanol contenant 2 ml d'hydrate d'hydrazine pendant 4 h. Après 12 h à 0° on filtre, lave à l'eau jusqu'à réaction neutre et sèche au vide sur P₂O₅. On obtient 924 mg (57%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-phénylalanylhydrazide cristallin de F. 219°. [α]_D²⁰ = -38,5° ± 0,5° (c = 2,0; diméthylformamide). Rf_M = 0,70; E_{1,9}^a = 0,8 His; E_{5,8}^a = 1,0 His (révélation par ninhydrine, PAULY, FOLIN et chlore; cf. ¹⁶).

C₃₃H₃₇O₅N₇S Calc. C 61,6 H 5,8 O 12,4 N 15,2 S 5,0%
(643,7) Tr. „ 61,5 „ 5,8 „ 12,2 „ 14,9 „ 5,1%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XIV). On dissout 386 mg (0,6 mmole) du tripeptide XII et 432 mg (0,6 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide¹³) dans 2 ml de diméthylformamide, ajoute une solution de 206 mg (1,0 mmole) de dicyclohexyl-carbodiimide dissoute dans un mélange de 2 ml de pyridine et de 5 ml d'acétone, et agite 24 h à 20°. Après 30 min déjà, on obtient un précipité abondant. Après 24 h, on ajoute 6 ml de diméthylformamide, évapore la pyridine et l'acétone dans le vide et obtient ainsi une solution du nonapeptide, alors que la dicyclohexylurée reste insoluble. Après 8 h à -20° on filtre, lave le précipité par 2 ml de pyridine et concentre le filtrat à 2 ml sous vide à 60°. Par adjonction de 40 ml d'acétate d'éthyle, on précipite 578 mg (72%) de nonapeptide brut, qui est suspendu sous agitation dans 4 ml de méthanol bouillant pendant 10 min. Après filtration on suspend encore une fois dans les mêmes conditions dans 4 ml de méthanol bouillant, filtre, sèche et obtient 249 mg (31%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 225°. [α]_D¹⁹ = -51,0 ± 1° (c = 1,0; diméthylformamide). Rf_M = 0,70; Rf_A = 0,70; E_{1,9}^a = 1,0 Try; E_{5,8}^a = 0,5 His (révélation par ninhydrine, PAULY, chlore; homogène).

C₆₅H₈₂O₁₃N₁₄S₂ Calc. C 58,7 H 6,2 O 15,6 N 14,7 S 4,8%
(1331,6) Tr. „ 57,7 „ 6,1 „ 15,6 „ 14,9 „ 5,0%

His²-Phé³-oxytocine (XV). On dissout 133 mg (0,1 mmole) de l'amide XIV dans 100 ml d'ammoniac liquide redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air et purifie par contre-courant comme pour la Sér²-oxytocine (VI) ci-dessus. On obtient un sommet principal de K = 0,16 et un sommet secondaire de K = 0,02. Les tubes centraux du sommet principal sont réunis et leur contenu, concentré au vide. Le produit obtenu représente environ la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène à la chromatographie (Rf_M = 0,43; Rf_A = 0,50; Rf_P = 0,32) et à l'électrophorèse (E_{1,9} = 1,03 Try; E_{5,8} = 0,65 His), par révélation à la ninhydrine, au PAULY, au bleu de bromophénol et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales²⁰) par mg: moins de 0,01 sur la pression sanguine du poulet, la pression sanguine du chat et du rat, et l'utérus de lapin isolé.

d) Synthèse de la Try³-oxytocine

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tryptophanate de méthyle (XVI). On dissout 5,07 g (10,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosine¹³) et 2,40 g (11,0 mmoles) de L-tryptophanate de méthyle³⁵) (préparé à partir de son chlorhydrate¹⁵)³⁵) selon HILLMANN³⁶) dans un

³⁵) E. ABBERHALDEN & M. KEMPE, Z. physiol. Chem. 52, 207 (1907).

³⁶) G. HILLMANN, Z. Naturforsch. 1, 682 (1946).

mélange de 40 ml de pyridine et de 60 ml d'acétonitrile, refroidit à -5° , ajoute 2,58 g (12,5 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide et agite 24 h à 20° . On filtre, évapore à sec, triture le résidu avec de l'éther de pétrole jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent, redissout dans 200 ml d'acétate d'éthyle, lave par HCl 1 N, H_2O , NH_4OH 1 N, sèche et évapore à sec. On obtient 6,94 g de tripeptide brut. Celui-ci, après deux recristallisations consécutives par dissolution dans un mélange de 25 ml d'acétate d'éthyle et de 2 ml de méthanol et adjonction de 50 ml d'éther, donne 5,53 g (78%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tryptophanate de méthyle cristallin de F. 110°. $[\alpha]_D^{19} = -20,0^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 2,0$; méthanol); $[\alpha]_D^{21} = -16,8^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = -2,2$; diméthylformamide). Spectre UV.: $\lambda_{max}^{282} \text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,88$), $274 \text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,83$), $290 \text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,79$), dans diméthylformamide-tributylamine (97:3). $Rf_M^a = 0,95$; $E_{1,9}^a = 0,7 \text{ Try}$; $E_{5,8}^a = 1,0 \text{ Try}$ (révélation par ninhydrine, FOLIN, PAULY, chlore; homogène).

$C_{39}H_{40}O_7N_4S$ Calc. C 66,1 H 5,7 O 15,8 N 7,9 S 4,5%
(708,8) Tr. , 66,0 , 6,0 , 15,8 , 7,6 , 4,5%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tryptophane (XVII). A une solution de 708 mg (1,0 mmole) de l'ester XVI dans 2 ml de méthanol, on ajoute 0,5 ml de NaOH 4 N aqueux et garde la solution limpide pendant 1 h à 20° . On ajoute 10 ml d'eau, extrait par un peu d'acétate d'éthyle et acidifie la phase aqueuse par HCl 1 N. On agite 2 h à 0° , filtre, essore, dissout le précipité dans 2 ml de méthanol et précipite par adjonction de 15 ml d'eau. On filtre, lave à l'eau, sèche au vide sur P_2O_5 et KOH et obtient 481 mg (69%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tryptophane cristallin de F. 155°. $[\alpha]_D^{21} = -16,1^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1,1$; méthanol); $-16,8^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,95$; $E_{1,9}^a = 0,8 \text{ Try}$; $E_{5,8}^a = 1,0 \text{ Try}$ (révélation par ninhydrine, FOLIN, PAULY et chlore; homogène).

$C_{38}H_{38}O_7N_4S$ Calc. C 65,7 H 5,5 O 16,1 N 8,1 S 4,6%
(694,8) Tr. , 65,7 , 5,6 , 15,9 , 7,9 , 4,6%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tryptophanylhydrazide (XVIII). On chauffe à reflux, sous agitation, 2,82 g (4,0 mmoles) de l'ester XVI dans 60 ml de méthanol contenant 3,00 ml d'hydrate d'hydrazine. L'hydrazide formé cristallise déjà après quelques minutes. On continue le chauffage encore pendant 4 h et garde le mélange encore 12 h à 20° . On filtre, lave le précipité à l'eau jusqu'à réaction neutre de l'eau de lavage et sèche au vide sur P_2O_5 . On obtient 2,53 g (90%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tryptophanylhydrazide cristallin de F. 232°. $[\alpha]_D^{19} = -22,9^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 1,7$; diméthylformamide). Spectre UV.: $\lambda_{max}^{281} \text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,90$), $285 \text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,89$), dans diméthylformamide-tributylamine (97:3). $Rf_M^a = 0,95$; $E_{1,9}^a = 1,1 \text{ Try}$; $E_{5,8}^a = 1,0 \text{ Try}$ (révélation par ninhydrine, FOLIN, PAULY, chlore, cf. 16)).

$C_{38}H_{40}O_6N_6S$ Calc. C 64,4 H 5,7 O 13,5 N 11,9 S 4,5%
(708,8) Tr. , 64,5 , 5,2 , 13,7 , 11,7 , 4,9%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tryptophanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XIX) On dissout 1,42 g (2,0 mmoles) de l'hydrazide XVIII dans un mélange de 8 ml de diméthylformamide, 8 ml d'isopropanol et 1,3 ml de HCl 6 N, refroidi à -5° . Sous forte agitation, on introduit encore 0,88 ml de $NaNO_2$ 2,5 M, agite encore 5 min à -5° , puis ajoute 10 ml de $NaHCO_3$ 1 M et 32 ml d'eau à 0° . L'azide formé précipite sous la forme d'une huile très visqueuse que l'on extrait par trois portions de 25 ml d'acétate d'éthyle à 0° . On lave la solution organique par H_2O et NaCl 30%, sèche rapidement sur Na_2SO_4 , filtre et ajoute 1,44 g (2,0 mmoles) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide¹³⁾ dissous dans 26 ml de diméthylformamide. On évapore l'acétate d'éthyle au vide à 15° , agite la solution restante 36 h à 20° , concentre à 3 ml et précipite par l'acétate d'éthyle. On lave 10 min par suspension dans 20 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud, lave une seconde fois dans les mêmes conditions, filtre et sèche au vide. On obtient 1,46 g (52%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tryptophanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 220°. $[\alpha]_D^{21} = -42,0^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,95$; $Rf_A^a = 0,75$; $Rf_P^a = 0,80$; $E_{1,9}^a = 0,4 \text{ Try}$ (révélation par ninhydrine, FOLIN, PAULY, chlore; homogène). Spectre UV.: $\lambda_{max}^{283} \text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,91$), $291 \text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 3,81$), dans diméthylformamide-tributylamine (97:3).

$C_{70}H_{85}O_{14}N_{14}S_2$ Calc. C 60,2 H 6,1 O 16,0 N 12,8 S 4,6%
(1396,6) Tr. , 58,9 , 6,2 , 16,3 , 12,8 , 4,5%

Try³-oxytocine (XX). On dissout 140 mg (0,1 mmole) de l'amide XIX dans 100 ml d'ammoniac redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air et purifie par contre-courant comme pour la Sér²-oxytocine (VI) ci-dessus. On obtient un sommet principal de $K = 0,54$ et un sommet secondaire de $K = 0,19$. Le contenu des tubes centraux du sommet principal est réuni et concentré au vide. Le produit obtenu contient environ la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène à la chromatographie ($Rf_M = 0,62$; $Rf_A = 0,62$; $Rf_P = 0,24$) et à l'électrophorèse ($E_{1,9} = 0,63$ Try; $E_{5,8} = 0,42$ His), par révélation à la ninhydrine, au FOLIN, au PAULY, au bleu de bromophénol et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales²⁰⁾ par mg: utérus isolé de rat $0,04 \pm 0,01$; pression sanguine du poulet, env. 0,1; pression interne de la glande mammaire du lapin $0,10 \pm 0,06$; léger effet dépressif sur la pression sanguine du rat et du chat.

e) Synthèse de la Sér²-Lys⁸-oxytocine (Sér²-Ileu³-Lys⁸-vasopressine)

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-proyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XXI). On dissout 672 mg (1,2 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-isoleucylhydrazide (IV) dans 10 ml de diméthylformamide, refroidit à -5° , ajoute 1,5 ml de HCl 4 N, puis 6,0 ml de diméthylformamide additionnées de 0,26 ml de NaNO₂ 5 M aqueux et également refroidis à -5° . On agite 5 min puis ajoute 0,84 ml (6,0 mmole) de triéthylamine et 35 ml d'acétate d'éthyle à -5° . Le chlorhydrate de triéthylamine cristallise. On séche rapidement sur du sulfate de sodium, filtre et ajoute 1,07 g (1,2 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-proyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide¹⁰⁾. On met la solution obtenue sur un évaporateur rotatif pendant 6 h à 20° pour évaporer l'acétate d'éthyle, et on agite encore 48 h à 20° . On concentre au vide jusqu'à 3 ml et précipite le nonapeptide brut par adjonction de 50 ml d'acétate d'éthyle. On obtient 1,68 g (99%) de produit brut, que l'on suspend avec agitation dans 10 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud; on répète le lavage dans les mêmes conditions, et séche au vide poussé. On obtient 531 mg (31%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-isoleucyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-proyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 214°. $[\alpha]_D^{21} = -35 \pm 2^\circ$ ($c = 1,1$; diméthylformamide). $Rf_M = 0,65$; $Rf_A = 0,60$; $E_{1,9}^a = 0,5$ Try (révélation par ninhydrine, chlore; homogène).

$C_{66}H_{89}O_{16}N_{13}S_3$ Calc. C 56,0 H 6,3 N 12,8 S 6,8%
(1416,7) Tr. .. 54,2 .. 6,4 .. 18,4 .. 12,5 .. 6,8%

Sér²-Lys⁸-oxytocine (Sér²-Ileu³-Lys⁸-vasopressine) (XXII). On dissout 142 mg (0,1 mmole) de l'amide XXI dans 100 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 NH₄Cl, on évapore à sec au vide, reprend par 100 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 25 ml, ajoute 400 mg d'acide p-toluenesulfonique, équilibre avec du sec-butanol et place dans le premier tube 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 aliquotes³²⁾. On obtient un sommet principal de $K = 0,49$. Le contenu des tubes centraux de ce sommet est réuni, passé sur résine IRA-45³⁷⁾ et concentré au vide. Le produit obtenu, qui représente plus de la moitié de l'azote peptidique de départ, est homogène à la chromatographie ($Rf_M = 0,05$; $Rf_A = 0,25$; $Rf_P = 0,07$) et à l'électrophorèse ($E_{1,9} = 1,14$ Try; $E_{5,8} = 0,93$ His), par révélation à la ninhydrine, au bleu de bromophénol et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales²⁰⁾ par mg: utérus de rat isolé, pression sanguine du poulet, moins de 0,01; pression interne de la glande mammaire du lapin, env. 0,01; inhibition de la diurèse du rat, env. 0,06; pression sanguine du rat, env. 0,1.

f) Synthèse de la Sér²-His³-Lys⁸-oxytocine (Sér²-His³-Lys⁸-vasopressine)

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-histidyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-proyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XXIII). A une suspension de 846 mg (1,45 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-histidylhydrazide (VIII) dans 7,25 ml de diméthylformamide refroidi à -5° , on ajoute 1,81 ml de HCl 4 N, agite jusqu'à dissolution totale et ajoute

³⁷⁾ ROHM & HAAS Co., Philadelphia, USA.

encore 7,25 ml de diméthylformamide additionnés de 0,32 ml de NaNO₂ 5 M, également refroidis à -5°. Après 5 min d'agitation, on ajoute 1,01 ml (7,25 mmoles) de triéthylamine, puis 1,29 g (1,45 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide¹⁰, évapore sous vide pendant 5 h à 0° pour enlever l'eau et garde 48 h à 0°. On concentre à environ 3 ml au vide à 60°, triture avec de l'acétate d'éthyle, puis avec du NH₄OH 0,2 N, centrifuge et sèche le précipité au vide. Le nonapeptide brut (1,75 g) est suspendu pendant 5 min dans 15 ml de méthanol bouillant. On filtre à chaud, suspend dans 15 ml de méthanol bouillant, filtre et sèche au vide. On obtient 1,00 g (48%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-séryl-L-histidyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 190°. [α]_D²² = -36,9° ± 1° (c = 1,0; diméthylformamide). Rf_M = 0,75; E_{1,9}^a = 1,0 His; E_{5,8}^a = 0,6 Try (révélation par ninhydrine, PAULY, chlore; homogène).

C₆₆H₈₅O₁₆N₁₅S₃ Calc. C 55,0 H 5,9 O 17,9 N 14,6 S 6,7%
(1440,7) Tr. , 55,4 , 6,2 , 18,5 , 14,2 , 6,7%

Sér²-His³-Lys⁸-oxytocine (Sér²-His³-Lys⁸-vasopressine) (XXIV). On dissout 144 mg (0,1 mmole) de l'amide XXIII dans 100 ml d'ammoniac liquide redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air, purifie par contre-courant et passe sur résine comme pour la Sér²-Lys⁸-oxytocine (XXII) ci-dessus. Le produit obtenu à partir du sommet principal (K = 0,34) représente plus de la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène à la chromatographie (Rf_M = 0,02; Rf_A = 0,07; Rf_B = 0,01) et à l'électrophorèse sur papier (E_{1,9} = 1,55 Try; E_{5,8} = 1,00 His), par révélation à la ninhydrine, au PAULY, au bleu de bromophénol et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales²⁰ par mg: pression sanguine du chat 0,04; pression sanguine du rat et pression sanguine du poulet, moins de 0,02; utérus de rat isolé, moins de 0,01.

g) Synthèse de la His²-Sér³-Lys⁸-oxytocine (His²-Sér³-Lys⁸-vasopressine)

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-histidinate de méthyle (XXV). A une solution de 17,25 g (50 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine et de 7,00 ml (50 mmoles) de triéthylamine dans 250 ml de tétrahydrofurane, on ajoute goutte à goutte à -10° 4,9 ml (50 mmoles) de chloroformate d'éthyle. On agite 10 min, puis ajoute une solution de 12,2 g (50 mmoles) de dichlorhydrate d'histidinate de méthyle et de 14,0 ml (100 mmoles) de triéthylamine dans 250 ml de chloroforme. On agite 4 h à 20°, évapore à sec au vide, redissout le résidu dans 1000 ml d'acétate d'éthyle, lave cette solution par H₂O, NH₄OH 1 N et NaCl 30%, sèche sur sulfate de sodium, filtre et évapore à sec au vide. On dissout le résidu dans 150 ml de méthanol chaud, ajoute 500 ml d'éther et garde pendant 16 h à -20°. On filtre, sèche le précipité au vide et obtient ainsi 10,77 g d'ester dipeptidique cristallin de F. 144°. Le filtrat est évaporé à sec et le résidu, cristallisé dans le méthanol par addition d'éther comme ci-dessus. On obtient une deuxième fraction de 5,20 g de F. 144° également, soit un total de 15,97 g (64%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidinate de méthyle. [α]_D²⁰ = -32,2° ± 0,5° (c = 1,9; méthanol); -36,5° ± 0,5° (c = 2,0; diméthylformamide). Rf_M = 0,80; E_{1,9}^a = 0,8 His; E_{5,8}^a = 1,2 His (révélation par ninhydrine, PAULY, chlore; homogène).

C₂₅H₂₈O₅N₄S Calc. C 60,5 H 5,7 O 16,1 N 11,3 S 6,4%
(496,6) Tr. , 60,7 , 6,0 , 16,2 , 11,0 , 6,7%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-histidine (XXVI). A une solution refroidie à -5° de 13,8 g (40 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine et de 5,60 ml (40 mmoles) de triéthylamine dans 200 ml de tétrahydrofurane, on ajoute 3,84 ml (40 mmoles) de chloroformate d'éthyle sous forte agitation. Après 10 min, on ajoute 10,5 g (50 mmoles) de L-histidine, HCl, H₂O dissous dans 96,0 ml de NaOH 1 N. On agite 1 h à pH 7, ajoute 48,0 ml de HCl 1 N, concentre sous vide jusqu'à 100 ml et extrait par trois portions de 100 ml de n-butanol. Le n-butanol est lavé par 100 ml d'eau et évaporé à sec. On triture le résidu avec de l'éther et le cristallise par dissolution dans 30 ml de méthanol bouillant, puis refroidissement. On obtient ainsi 9,24 g (48%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidine cristalline, de F. 152°. [α]_D²¹ = -29,8° ± 0,5° (c = 2,1; diméthylformamide); -27,2° ± 0,5° (c = 2,3; HCl 2 N - méthanol (1:1)); -27,5° ± 0,5° (c = 2,0; pyridine). Rf_M = 0,35; E_{1,9}^a = 0,7 His; E_{5,8}^a = 0,7 His (révélation par ninhydrine, PAULY et chlore; homogène).

C₂₄H₂₆O₅N₄S Calc. C 59,8 H 5,4 O 16,6 N 11,6 S 6,6%
(482,5) Tr. , 59,3 , 5,3 , 16,6 , 11,5 , 6,8%

Par saponification du N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidinate de méthyle (XXV) on obtient le même produit. Cependant, le rendement est légèrement plus faible et la purification plus difficile.

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-sérinate de méthyle (XXVII). A une solution de 965 mg (2,0 mmoles) du dipeptide XXVI, de 342 mg (2,2 mmoles) de chlorhydrate de L-sérinate de méthyle³¹⁾ et de 0,294 ml (2,1 mmoles) de triéthylamine dans 5 ml de pyridine refroidie à -5°, on ajoute une solution, également refroidie à -5°, de 515 mg (2,5 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide dans 10 ml d'acétonitrile. On agite la solution obtenue pendant 12 h à 20°, filtre et évapore le filtrat à sec sous vide. Le résidu huileux est tritiqué avec de l'éther de pétrole jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent. On filtre, redissout le solide dans un mélange de 60 ml d'acétate d'éthyle et de 10 ml de n-butanol, lave par H₂O, NaCl 30%, NH₄OH 1N, H₂O, et sèche sur sulfaté de sodium. Après évaporation à sec, le résidu huileux est redissous dans 5 ml de n-butanol et additionné de 30 ml d'éther. La solution se trouble et un précipité huileux se forme, qui cristallise après 12 h à 20°. On filtre, lave à l'éther, puis à l'éther de pétrole, et sèche sous vide poussé. On obtient 812 mg (71%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-sérinate de méthyle cristallin de F. 97°. Rf_M^a = 0,70; E_{1,9}^a = 0,8 His (révélation par ninhydrine, PAULY, chlore; homogène).

C ₂₅ H ₃₃ O ₇ N ₅ S	Calc. C 57,6	H 5,7	O 19,2	N 12,0	S 5,5%
(583,6)	Tr. , ,	57,6 , ,	6,0 , ,	18,4 , ,	12,0 , , 5,4%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-sérylhydrazide (XXVIII). On dissout 760 mg (1,3 mmole) de l'ester XXVII dans 7,5 ml de méthanol bouillant, ajoute 0,22 ml d'hydrate d'hydrazine et garde 4 jours à 20°. On filtre et lave le précipité par 5 ml de méthanol, 5 ml de méthanol-éther (1:1) et 15 ml d'éther. Après séchage au vide sur P₂O₅, on obtient 415 mg (55%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-sérylhydrazide cristallin de F. 180°. Rf_M^a = 0,80; E_{1,9}^a = 0,9 His (révélation par ninhydrine, FOLIN, PAULY, chlore; cf. 16)).

C ₂₇ H ₃₃ O ₆ N ₇ S	Calc.	C 55,6	H 5,7	O 16,5	N 16,8	S 5,5%
(583,7)	.. + 1/2H ₂ O	54,8 ..	5,8 ..	17,5 ..	16,6 ..	5,4%
	Tr. , ,	55,0 , ,	5,7 , ,	17,1 , ,	16,3 , ,	5,4%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-séryl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XXIX). On suspend 362 mg (0,62 mmole) de l'hydrazide XXVIII dans 3,1 ml de diméthylformamide, refroidit à -5°, ajoute sous agitation 0,775 ml de HCl 4 n et, après dissolution de l'hydrazide, 3,1 ml de diméthylformamide additionnés de 0,14 ml de NaNO₂ 5 M aqueux et refroidis à -5°. Après avoir agité 5 min à -5°, on ajoute 0,434 ml (3,1 mmoles) de triéthylamine, puis 551 mg (0,62 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide¹⁵⁾. On élimine l'eau par évaporation de 5 h au vide à 0°, laisse reposer encore 48 h à 0°, puis concentre à 2 ml au vide à 60° et précipite à l'acétate d'éthyle. On tritue le précipité avec de l'acétate d'éthyle et avec NH₄OH 0,2 n, centrifuge et sèche le précipité. On obtient 656 mg de nonapeptide brut, que l'on suspend 5 min dans 5 ml de méthanol bouillant. On filtre à chaud, suspend à nouveau dans 5 ml de méthanol bouillant, filtre et sèche au vide poussé. On obtient 252 mg (28%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-séryl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 184°. Rf_M^a = 0,65; E_{1,9}^a = 1,0 Try; E_{5,8}^a = 0,5 His (révélation par ninhydrine, PAULY, chlore; homogène).

C ₆₆ H ₈₅ O ₁₆ N ₁₅ S ₃	Calc. C 55,0	H 5,9	O 17,9	N 14,6	S 6,7%
(1440,7)	Tr. , ,	55,0 , ,	6,0 , ,	18,6 , ,	14,5 , , 6,7%

His²-Sér³-Lys⁸-oxytocine (His²-Sér³-Lys⁸-vasopressine) (XXX). On dissout 144 mg (0,1 mmole) de l'amide XXIX dans 100 ml d'ammoniac liquide redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air, purifie par contre-courant et passe sur résine comme pour la Sér²-Lys⁸-oxytocine (XXII) ci-dessus. Le produit obtenu à partir du sommet principal (K = 0,33) représente plus de la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène à la chromatographie (Rf_M = 0,01; Rf_A = 0,07; Rf_P = 0,01) et à l'électrophorèse (E_{1,9}^a = 1,58 Try; E_{5,8}^a = 1,00 His), par révélation à la ninhydrine, au PAULY, au bleu de bromophénol et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales²⁰⁾ par mg: moins de 0,01 sur la pression sanguine du chat, l'utérus de rat isolé et la pression interne de la glande mammaire du lapin.

h) Synthèse de la His²-Phé³-Lys⁸-oxytocine (His²-Lys⁸-vasopressine)

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-e-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XXXI). On dissout 378 mg (0,60 mmole) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-phénylalanine (XII) et 533 mg (0,60 mmole) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-e-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide¹⁹⁾ dans 2 ml de diméthylformamide. On ajoute 206 mg (1,0 mmole) de dicyclohexyl-carbodiimide dissous dans 5 ml d'acétonitrile et 2 ml de pyridine et agite 24 h à 20°. La dicyclohexylurée commence à précipiter après quelques minutes et le nonapeptide formé, après une heure environ. On ajoute encore 8 ml de diméthylformamide, agite quelques heures, élimine la pyridine et l'acétonitrile au vide, garde 8 h à -20°, filtre, lave le précipité par 2 ml de pyridine, concentre le filtrat à 2 ml au vide à 60° et ajoute 40 ml d'acétate d'éthyle. Après filtration et séchage, on obtient 754 mg de nonapeptide brut. On suspend dans 5 ml de méthanol bouillant pendant 5 min, filtre à chaud, suspend dans encore 5 ml de méthanol bouillant pendant 5 min, filtre à chaud et sèche au vide. On obtient 306 mg (34%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-histidyl-L-phénylalanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-e-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 200°. $[\alpha]_D^{19} = -42,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,0$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,70$; $Rf_A^a = 0,75$; $E_{1,9}^a = 1,0$ Try; $E_{5,8}^a = 1,5$ Try (révélation par ninhydrine, PAULY, chlore; homogène).

$C_{72}H_{89}O_{15}N_{15}S_3$ Calc. C 57,5 H 6,0 O 16,0 N 14,0 S 6,4%
(1500,8) Tr. , , 57,0 , , 6,2 , , 16,0 , , 13,7 , , 6,5%

His²-Phé³-Lys⁸-oxytocine (His²-Lys⁸-vasopressine) (XXXII). On dissout 150 mg (0,1 mmole) de l'amide XXXI dans 100 ml d'ammoniac liquide redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air, purifie par contre-courant et passe sur résine comme pour la Sér³-Lys⁸-oxytocine (XXII) ci-dessus. Le produit obtenu à partir du sommet principal ($K = 0,53$) représente plus de la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène à la chromatographie ($Rf_M = 0,16$; $Rf_A = 0,25$; $Rf_p = 0,05$) et à l'électrophorèse ($E_{1,9}^a = 1,51$ Try; $E_{5,8}^a = 1,00$ His), par révélation à la ninhydrine, au PAULY, au bleu de bromophénol et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales²⁰⁾ par mg: utérus isolé de lapin, pression interne de la glande mammaire du lapin, pression sanguine du coq et pression sanguine du rat, moins de 0,01; pression sanguine du chat, env. 0,08.

i) Synthèse de la Sér³-Lys⁸-oxytocine (Sér³-Lys⁸-vasopressine)

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle (XXXIII). On dissout 5,08 g (10,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosine¹⁹⁾ et 1,19 g (10,0 mmoles) de L-sérinate de méthyle (préparé fraîchement³⁸⁾ à partir de son chlorhydrate³¹⁾) dans 20 ml de pyridine, refroidit à -5° et ajoute une solution également refroidie à -5° de 2,52 g (12,5 mmoles) de dicyclohexyl-carbodiimide dans 60 ml d'acétonitrile, agite 12 h à 20°, filtre et évapore le filtrat à sec. Après trituration répétée avec de l'éther de pétrole, on dissout le résidu dans 200 ml d'acétate d'éthyle, lave par HCl 1 N, H₂O, NH₄OH 1 N, sèche sur du sulfate de sodium et évapore à sec. On reprend le résidu dans 100 ml d'acétate d'éthyle bouillant (dissolution incomplète!), refroidit à 0° et filtre. On obtient 2,30 g de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-sérinate de méthyle cristallin de F. 186°. Le filtrat est concentré à 30 ml et gardé 12 h à 0°. Par filtration, on obtient 2,13 g de produit impur de F. 130-150° qui, après suspension dans 8 ml d'acétate d'éthyle bouillant et repos de 12 h à 0°, donnent encore 1,57 g de tripeptide cristallin de F. 186°, soit un total de 3,87 g (64%). $[\alpha]_D^{19} = -26,9^\circ \pm 0,5^\circ$ ($c = 1,8$; méthanol); -24,0° ± 0,5° ($c = 1,8$; diméthylformamide). $Rf_M^a = 0,95$; $E_{1,9}^a = 0,9$ Try; $E_{5,8}^a = 0,7$ His (révélation par ninhydrine, FOLIN, PAULY, chlore; homogène).

$C_{31}H_{35}O_8N_3S$ Calc. C 61,1 H 5,8 O 21,0 N 6,9 S 5,2%
(609,7) Tr. , , 61,3 , , 5,8 , , 20,8 , , 7,2 , , 5,2%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-sérylhydrazide (XXXIV). On porte à ébullition une solution de 1,83 g (3,0 mmoles) de l'ester XXXIII dans 18 ml de méthanol contenant 1,8 ml

³⁸⁾ Une solution du chlorhydrate dans le chloroforme est additionnée d'un équivalent de triéthylamine. Le chlorhydrate de triéthylamine est précipité par addition d'éther et le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite. L'huile restante contient la totalité de l'ester sous forme libre, avec encore des traces de chlorhydrate de triéthylamine.

d'hydrate d'hydrazine, puis laisse refroidir à 20°. Après 3 jours on filtre, lave le précipité à l'eau jusqu'à réaction neutre du filtrat et sèche sur P₂O₅. On obtient 1,56 g (85%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-sérylhydrazide cristallin de F. 270° env. [α]_D²⁰ = -28,4° ± 0,5° (c = 1,7; diméthylformamide). Rf_M^a = 0,95; Rf_P^a = 0,80; E_{1,9}^a = 0,7 His; E_{5,8}^a = 0,7 His (révélation par ninhydrine, PAULY, FOLIN, chlore; cf.¹⁶). Insoluble dans les solvants organiques sauf la diméthylformamide.

C₃₀H₃₅O₇N₅S Calc. C 59,1 H 5,8 O 18,4 N 11,5 S 5,3%
(609,7) Tr. , , 5,7 , , 18,4 , , 11,1 , , 5,5%

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-séryl-L-glutaminyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XXXV). On dissout 1,22 g (2,0 mmoles) de l'hydrazide XXXIV dans 10 ml de diméthylformamide, refroidit à -5°, ajoute 2,5 ml de HCl 4 N, puis 10 ml de diméthylformamide additionnés de 0,50 ml de NaNO₂ 5 M aqueux et également refroidis à -5°. On agite 5 min et ajoute 1,4 ml (10 mmoles) de triéthylamine et 20 ml d'acétate d'éthyle refroidis à -5°. La majeure partie du chlorhydrate de triéthylamine cristallise, mais l'azide tripeptidique reste en solution. On sèche rapidement sur sulfate de sodium, filtre, ajoute 1,78 g (2,0 mmoles) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide¹⁰), évapore l'acétate d'éthyle sous vide à 0°, agite 36 h à 20° et concentre à 5 ml sous vide à 60°. On précipite le nonapeptide brut par adjonction de 100 ml d'éther sec, filtre, triture le précipité dans NH₄OH 0,2 N, filtre, lave, essore, triture dans 10 ml de méthanol, filtre et sèche. Le produit n'étant pas encore assez pur, on l'agitie 5 min dans 10 ml de méthanol bouillant, filtre à chaud, répète ce traitement encore une fois et sèche sous vide poussé. On obtient 937 mg (32%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-séryl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 196°. [α]_D²² = -35,7° ± 1° (c = 1,0; diméthylformamide). Rf_M^a = 0,85; Rf_A^a = 0,75; Rf_P^a = 0,60; E_{1,9}^a = 0,5 Try (révélation par ninhydrine, FOLIN, PAULY, chlore; homogène).

C₆₉H₈₇O₁₇N₁₃S₃ Calc. C 56,5 H 6,0 O 18,5 N 12,4 S 6,6%
(1466,7) Tr. , , 55,6 , , 6,2 , , 18,5 , , 12,2 , , 6,7%

Sér³-Lys⁸-oxytocine (Sér³-Lys⁸-vasopressine) (XXXVI). On dissout 147 mg (0,1 mmole) de l'amide XXXV dans 100 ml d'ammoniac redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air, purifie par contre-courant et passe sur résine comme pour la Sér²-Lys⁸-oxytocine (XXII) ci-dessus. Le produit obtenu à partir du sommet principal (K = 0,45) représente plus de la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène par chromatographie (Rf_M = 0,15; Rf_A = 0,25; Rf_P = 0,05) et par électrophorèse (E_{1,9} = 1,07 Try; E_{5,8} = 0,81 His), par révélation à la ninhydrine, au bleu de bromophénol, au FOLIN, et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales²⁰ par mg: utérus de rat isolé, pression sanguine du poulet, pression sanguine du rat, moins de 0,01; utérus de chat *in situ* env. 0,04; pression interne de la glande mammaire du lapin, env. 0,04; inhibition de la diurèse du rat, env. 0,02.

j) Synthèse de la Try³-Lys⁸-oxytocine (Try³-Lys⁸-vasopressine)

N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tryptophanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide (XXXVII). On dissout 1,42 g (2,0 mmoles) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tryptophanylhydrazide (XVIII) dans un mélange refroidi à -5° de 8 ml de diméthylformamide, 8 ml d'isopropanol et 1,3 ml de HCl 6 N. Sous forte agitation on introduit 0,88 ml de NaNO₂ 2,5 M, agite encore 5 min à -5°, puis ajoute 10 ml de NaHCO₃ 1 M et 32 ml d'eau à 0°. L'azide formé précipite sous la forme d'une huile très visqueuse, que l'on extrait par trois portions de 25 ml d'acétate d'éthyle à 0°. On lave la solution organique par l'eau, puis par NaCl 30%, sèche rapidement sur sulfate de sodium, filtre et ajoute 1,78 g (2,0 mmoles) de L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide¹⁰ dissous dans 26 ml de diméthylformamide. On évapore l'acétate d'éthyle au vide à 15°, agite la solution restante 36 h à 20°, concentre à 3 ml au vide et précipite le nonapeptide brut par l'acétate d'éthyle. Le précipité est suspendu 5 min dans 20 ml de méthanol bouillant. On filtre à chaud, répète le lavage au méthanol, filtre et sèche. On obtient 2,05 g (65%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-tryptophanyl-L-glutaminyl-L-asparaginyl-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-ε-N-tosyl-L-lysyl-glycinamide de F. 214°. [α]_D²¹ = -39,9° ± 1° (c = 1,0; diméthylformamide). Rf_M^a = 0,95; Rf_A^a = 0,85; Rf_P^a = 0,80; E_{1,9}^a = 0,4 Try (révélation par nin-

hydrine, FOLIN et chlore; homogène). Spectre UV.: λ_{max} 282 m μ ($\log \epsilon = 3,92$), 292 m μ ($\log \epsilon = 3,79$), dans diméthylformamide-tributylamine (97:3).

$\text{C}_{77}\text{H}_{92}\text{O}_{16}\text{N}_{14}\text{S}_3$	Calc.	C 59,1	H 5,9	O 16,3	N 12,6	S 6,1%
(1565,8)	Calc. + 2H ₂ O	,, 57,7	,, 6,0	,, 18,0	,, 12,2	,, 6,0%
	Tr.	,, 57,7	,, 6,0	,, 18,6	,, 12,2	,, 6,3%

Try³-Lys⁸-oxytocine (Try³-Lys⁸-vasopressine) (XXXVII). On dissout 157 mg (0,1 mmole) de l'amide XXXVII dans 100 ml d'ammoniac redistillé. On traite au sodium, oxyde à l'air, purifie par contre-courant et passe sur résine comme pour la Sér²-Lys⁸-oxytocine (XXII) ci-dessus. Le produit obtenu à partir du sommet principal ($K = 0,77$) représente plus de la moitié de l'azote peptidique de départ et est homogène par chromatographie ($Rf_M = 0,28$; $Rf_A = 0,35$; $Rf_P = 0,10$) et par électrophorèse ($E_{1,9} = 0,99$ Try; $E_{5,8} = 0,72$ His), par révélation à la ninhydrine, au FOLIN, au PAULY, au bleu de bromophénol, et au chlore-iodure-amidon.

Activités biologiques, exprimées en unités internationales²⁰ par mg: pression sanguine du poulet 0,08; pression sanguine du rat 0,07; pression sanguine du chat 0,3; utérus de rat isolé et pression interne de la glande mammaire du lapin, moins de 0,01.

SUMMARY

The following analogues of oxytocin and lysine-vasopressin have been synthesized: Ser²-oxytocin, Ser²-His³-oxytocin, His²-Phe³-oxytocin, Try³-oxytocin, Ser²-Ileu³-Lys⁸-vasopressin, Ser²-His³-Lys⁸-vasopressin, His²-Ser³-Lys⁸-vasopressin, His²-Lys⁸-vasopressin, Ser³-Lys⁸-vasopressin, Try³-Lys⁸-vasopressin.

The method of synthesis is based on the condensation of tripeptides, formed by coupling N-CBO-S-benzyl-L-cysteine with the amino-acids occupying the positions 2 and 3, 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, which are shown to be homogeneous by paper chromatography and paper electrophoresis under different conditions.

The oxytocic or vasopressic activities of all these new analogues are lower than $1/1000$ to $1/10000$ of the corresponding activities of the parent normal hormones.

Laboratoires de Chimie pharmaceutique SANDOZ, Bâle