

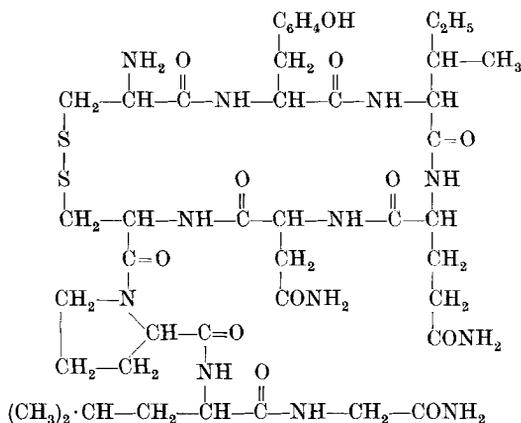
### 179. Une nouvelle synthèse de l'oxytocine

par R. A. Boissonnas, St. Guttman, P.-A. Jaquenoud et J.-P. Waller.

(27 VIII 55)

La structure de l'oxytocine a été établie indépendamment par *Tuppy*<sup>1)</sup> et par *du Vigneaud* et coll.<sup>2)</sup>. Ces derniers ont en outre confirmé cette structure par la synthèse d'un produit possédant les mêmes propriétés que l'hormone naturelle.

Nous rapportons ici une nouvelle synthèse de l'oxytocine, effectuée selon un schéma différent de celui suivi par *du Vigneaud* et coll. à l'exception du dernier stade qui est identique.



L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-L-asparaginyll-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide  
 $\begin{array}{c} | \\ \text{S} \\ \hline \\ \hline \\ \text{S} \end{array}$   
 Oxytocine

La N-CBO-L-leucine<sup>3)</sup> est condensée avec la glycinamide par la méthode à l'anhydride mixte alcoylcarbonique<sup>4)</sup> en N-CBO-L-leucyl-glycinamide (IV). Après élimination du groupe CBO par le gaz bromhydrique dans l'acide acétique anhydre, le dipeptide V est condensé avec la N-CBO-L-proline en N-CBO-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide VI par la même méthode à l'anhydride mixte. Le groupe CBO de ce

<sup>1)</sup> Biochim. biophys. Acta **11**, 449 (1953); *H. Tuppy & H. Michl*, Mh. Chem. **84**, 1011 (1953).

<sup>2)</sup> *V. du Vigneaud, Charlotte Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis & S. Gordon*, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4879 (1953); *V. du Vigneaud, Charlotte Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts & P. G. Katsoyannis*, ibid. **76**, 3115 (1954).

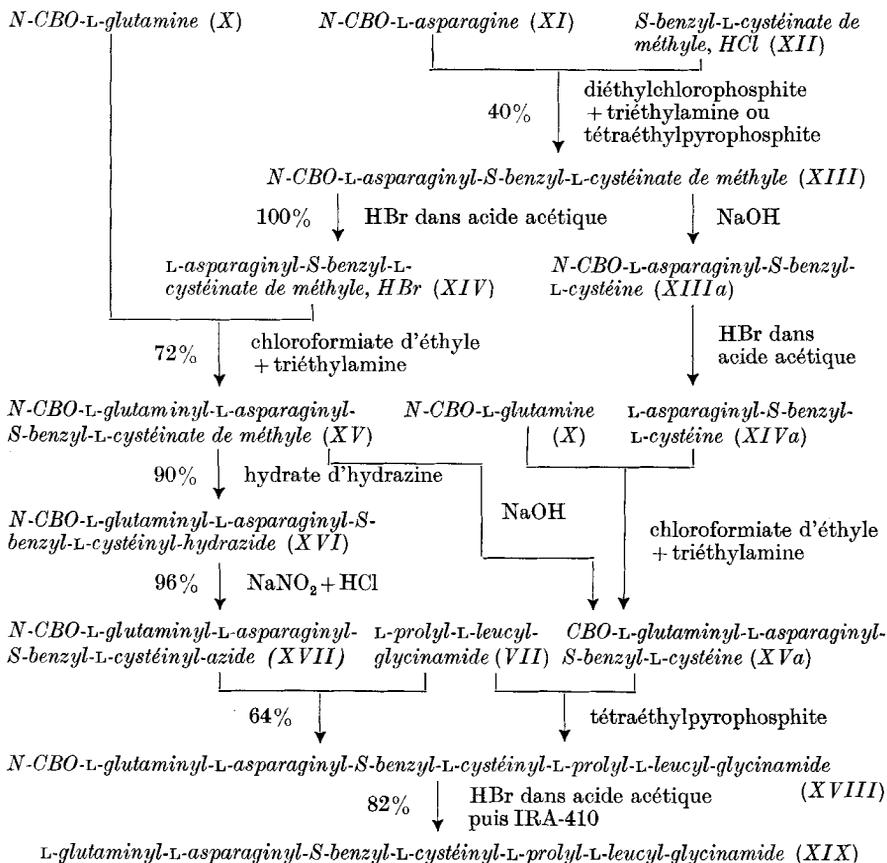
<sup>3)</sup> CBO = carbobenzoxy.

<sup>4)</sup> *R. A. Boissonnas*, Helv. **34**, 874 (1951); *Th. Wieland & H. Bernhard*, Liebigs Ann. Chem. **572**, 190 (1951); *J. R. Vaughan*, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3547 (1951).



(XIVa), on obtient la N-CBO-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéine (XVa), qui, par condensation avec la L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (VII) au moyen du tétraéthylpyrophosphite<sup>1)</sup>, donne le même hexapeptide XVIII.

*Synthèse du tripeptide central et de l'hexapeptide.*



En traitant cet hexapeptide par une solution de gaz bromhydrique dans l'acide acétique glacial, on scinde aisément le groupe CBO sans toucher ni au groupe S-benzyle, ni à l'une des trois fonctions amide non peptidiques, ce qui démontre la grande sélectivité de ce réactif<sup>2)</sup>.

La préparation de la N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosine (XXIII) a été améliorée par rapport aux méthodes décrites antérieurement<sup>3)</sup>. Nous avons préparé ce dipeptide soit par la méthode à l'an-

<sup>1)</sup> G. W. Anderson, J. Blodinger & A. D. Welcher, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5309 (1952).

<sup>2)</sup> Cf. F. Leitner, Thèse N° 1230, Université de Genève (1954).

<sup>3)</sup> C. R. Harrington & R. V. Pitt Rivers, Biochem. J. **38**, 417 (1944); C. W. Roberts & V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry **204**, 871 (1953).



aminyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XXVIII). C'est à ce même composé que conduit le schéma de synthèse de *du Vigneaud* et coll.<sup>1)</sup>.

La saponification de l'ester tripeptidique XXV en N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucine (XXVa)<sup>2)</sup>, suivie d'une condensation de celle-ci avec l'hexapeptide XIX au moyen du tétraéthylpyrophosphite, nous a également donné ce composé.

Calculés à partir des acides aminés de départ, les rendements en nonapeptide XXVIII sont plus élevés selon notre méthode aux azides que selon le schéma de *du Vigneaud* et coll.

La réduction dans l'ammoniac liquide du nonapeptide XXVIII que nous avons obtenu, a fourni après oxydation ménagée un produit actif sur la pression sanguine du Coq<sup>3)</sup> et sur l'utérus humain et animal, isolé et in situ<sup>4)</sup>, avec une activité de valeur comparable à celle du produit obtenu par *du Vigneaud* et coll.<sup>1)</sup>.

L'addition de cystéine en fort excès moléculaire (10 à 30 fois) par rapport au nonapeptide XXVIII avant la réduction dans l'ammoniac liquide ou juste avant la réoxydation n'a pas diminué l'activité du produit obtenu. Il en a été de même lorsque la réoxydation a été effectuée en solution vingt fois plus concentrée que celle utilisée par *du Vigneaud* et coll.<sup>1)</sup>. Il semble donc que la fermeture du pont disulfure entre les restes cystéinyle d'une même chaîne soit très nettement favorisée<sup>5)</sup>.

### Partie expérimentale<sup>6)</sup>.

Les F. sont corrigés. Précision  $\pm 2^\circ$ . Rf par chromatographie ascendante (20–23 cm) sur papier *Schleicher & Schüll* 2040b dans le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (60:15:25). Rf\* indique une scission préalable du groupe CBO par l'action d'une solution de gaz bromhydrique 2,5-n. dans l'acide acétique glacial durant 1 h. à 20°. Révélation resp. par la ninhydrine ou par l'isatine.

*N-CBO-L-Leucyl-glycinamide* (IV). Dans une solution de 15,9 g de N-CBO-L-leucine et de 8,8 cm<sup>3</sup> de triéthylamine dans 120 cm<sup>3</sup> de tétrahydro-furanne, on introduit à  $-5^\circ$  6,3 cm<sup>3</sup> de chloroformiate d'éthyle et, après 10 min., une solution de 6,6 g de glycineamide, HCl dans 33 cm<sup>3</sup> de NaOH 2-n. Après agitation pendant 3 h. à temp. ordinaire on éloigne le tétrahydro-furanne au vide, extrait le tout par 200 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle, lave par HCl 3-n. et NH<sub>4</sub>OH 1-n., sèche sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, évapore au vide et reprend par de l'éther. Il cristallise 13 g (67%) de N-CBO-L-leucyl-glycinamide de F. 80°.  $[\alpha]_D^{19} = -10,5^\circ$  (c = 1,8; chloroforme). Rf\* = 0,52.

C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub> (321,36)    Calculé N 13,08%    Trouvé N 13,03%

<sup>1)</sup> *V. du Vigneaud* et coll., J. Amer. chem. Soc. **76**, 3115 (1954).

<sup>2)</sup> *C. W. Roberts* (J. Amer. chem. Soc. **76**, 6203 (1954)) signale qu'il a eu des difficultés à effectuer la saponification de l'ester éthylique de ce tripeptide.

<sup>3)</sup> *J. M. Coon*, Arch. intern. pharmacodynamie **62**, 79 (1939).

<sup>4)</sup> Nous remercions le Dr *E. Cerletti*, du Laboratoire Pharmacologique *Sandoz*, Bâle, qui a effectué ces dosages.

<sup>5)</sup> Cf. *H. N. Rydon*, Nature **175**, 1115 (1955).

<sup>6)</sup> Les analyses ont été effectuées au Laboratoire Microanalytique *Sandoz* (Dr *W. Schöniger*), Bâle.

*L-Leucyl-glycinamide, HBr (V)*. On dissout à 20° 13,1 g de N-CBO-L-leucyl-glycinamide dans 50 cm<sup>3</sup> d'une solution 2,5-n. de gaz bromhydrique dans l'acide acétique glacial, laisse 1 h., évapore au vide, reprend par 35 cm<sup>3</sup> d'eau, éloigne le bromure de benzyle par extraction à l'éther, évapore plusieurs fois à sec en présence d'éthanol absolu et sèche au vide poussé. On obtient avec un rendement quantitatif le bromhydrate de L-leucyl-glycinamide sous forme d'une masse pulvérulente très hygroscopique.

$C_8H_{18}O_2N_3Br$  (268,16) Calculé Br 29,75% Trouvé Br 30,01%

*N-CBO-L-Prolyl-L-leucyl-glycinamide (VI)*. Dans une solution de 10,3 g de CBO-L-proline et de 5,8 cm<sup>3</sup> de triéthylamine dans 120 cm<sup>3</sup> de tétrahydro-furanne, on introduit à -10° 4,1 cm<sup>3</sup> de chloroformiate d'éthyle et, après 10 min., une solution aqueuse de pH 10 obtenue en dissolvant à froid 11 g de L-leucyl-glycinamide, HBr (V) dans NaOH 1-n. Après agitation pendant 2 h. à 20° la solution neutre est débarrassée sous vide du tétrahydro-furanne et extraite par 200 cm<sup>3</sup> de chlorure de méthylène. On lave par NaOH 1-n. et HCl 3-n., sèche sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, évapore au vide et reprend par de l'acétate d'éthyle chaud. Par refroidissement il cristallise 11,2 g (66%) de N-CBO-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 163°.  $[\alpha]_D^{20} = -71,9^{\circ}$  (c = 2,5; éthanol absolu<sup>1</sup>). Rf\* = 0,52.

$C_{21}H_{30}O_5N_4$  Calculé C 60,27 H 7,23 O 19,12 N 13,39%  
(418,48) Trouvé „ 60,46 „ 7,38 „ 19,07 „ 13,37%

*L-Prolyl-L-leucyl-glycinamide (VII)*. On dissout à 20° 6,3 g de N-CBO-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (VI) dans 20 cm<sup>3</sup> d'une solution 2,5-n. de gaz bromhydrique dans l'acide acétique glacial, évapore au vide après 1 h., reprend par 75 cm<sup>3</sup> d'eau, extrait le bromure de benzyle à l'éther, dilue par de l'eau et ajoute de la base libre d'Amberlite IRA-410 jusqu'à disparition des ions Br'. Après évaporation au vide de la solution, trituration avec de l'acétate d'éthyle du résidu et séchage au vide, on obtient 3,8 g (89%) de L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 120° (instantané) sous forme de cristaux se décomposant par séchage à chaud. Rf = 0,52.

$C_{13}H_{24}O_2N_4$  (284,35) Calculé N 19,66% p. équ. 284 Trouvé N 18,63% p. équ. 274

*γ-L-Glutamate de méthyle, HCl (VIII)*. Dans 140 cm<sup>3</sup> de méthanol on introduit à -10° 20 cm<sup>3</sup> de chlorure de thionyle puis 30 g d'acide L-glutamique, laisse exactement 25 min. à 20°, verse dans 400 cm<sup>3</sup> d'éther, filtre, lave et sèche sur KOH les cristaux obtenus, qui représentent 24 g (60%) de chlorhydrate de γ-L-glutamate de méthyle de F. 161° (litt.<sup>2</sup>): 154°). Rf = 0,25.

$C_6H_{12}O_4NCl$  (197,63) Calculé N 7,09 Cl 17,94% Trouvé N 7,03 Cl 17,93%

*N-CBO-L-Glutamine (X)*. A une solution de 20 g de γ-L-glutamate de méthyle, HCl (VIII), 16,8 g de NaHCO<sub>3</sub> et 4,0 g de NaOH dans 200 cm<sup>3</sup> d'eau à 20°, on ajoute en 3 h. 17 cm<sup>3</sup> de chloroformiate de benzyle à 90%<sup>3</sup> en agitant fortement. On extrait à l'éther la couche aqueuse dont le pH est de 7,5 en fin de réaction, amène au pH 2 par HCl conc., extrait à l'acétate d'éthyle l'huile qui se sépare, sèche sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, évapore au vide, additionne de 30 cm<sup>3</sup> d'éther de pétrole, sépare la couche inférieure, la libère au vide des dernières traces d'éther de pétrole et la dissout dans 140 cm<sup>3</sup> de NH<sub>4</sub>OH conc. saturé à 20° par un courant de NH<sub>3</sub>. Après 16 h. à 20° on concentre au vide jusqu'à un volume de 30 cm<sup>3</sup>, refroidit à -10° et acidifie par HCl conc. Par filtration des cristaux obtenus et recristallisation dans le minimum d'eau bouillante on obtient 20 g (70%) de N-CBO-L-glutamine de F. 135°<sup>4</sup>).  $[\alpha]_D^{20} = +5,8^{\circ}$  (c = 2,0; éthanol). Rf\* = 0,08.

$C_{13}H_{16}O_5N_2$  (280,28) Calculé N 10,00% Trouvé N 10,15%

<sup>1</sup>) Charlotte Ressler & V. du Vigneaud (J. Amer. chem. Soc. **76**, 3107 (1954)) qui ont obtenu le même produit par une autre méthode, trouvent: F. 163—163,5° et  $[\alpha]_D^{18,5} = -73,3^{\circ}$  (c = 2; éthanol 95%).

<sup>2</sup>) S. G. Waley, J. chem. Soc. **1950**, 3244.

<sup>3</sup>) Organic Syntheses **23**, 13 (1942).

<sup>4</sup>) Cette méthode de préparation de la N-CBO-L-glutamine donne des rendements supérieurs à ceux des méthodes décrites jusqu'ici (cf. H. K. Miller & H. Waelsch, Arch. Biochemistry **35**, 181 (1952)).

*N-CBO-L-Asparagine (XI)*. On dissout à 60° 10 g de L-asparagine, H<sub>2</sub>O dans 148 cm<sup>3</sup> de NaHCO<sub>3</sub> m., ajoutée à 20° en 2 h. sous forte agitation 11,4 cm<sup>3</sup> de chloroformiate de benzyle à 90%<sup>1)</sup>, extrait à l'éther la solution finale dont le pH est de 7,5, acidifie jusqu'au pH 2 par HCl conc., filtre le précipité cristallin et le recristallise dans de l'eau bouillante. On obtient 11,2 g (64%)<sup>2)</sup> de N-CBO-L-asparagine de F. 163°. Rf\* = 0,06.

C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub> (266,25) Calculé N 10,52% Trouvé N 10,42%

*S-Benzyl-L-cystéinate de méthyle, HCl (XII)*. On introduit à -10° dans 40 cm<sup>3</sup> de méthanol 8,5 cm<sup>3</sup> de chlorure de thionyle puis 12,5 g de S-benzyl-L-cystéine<sup>3)</sup>, chauffe 4 h. à 45°, laisse 16 h. à 20°, évapore au vide, reprend par 15 cm<sup>3</sup> de méthanol et cristallise par addition d'éther<sup>4)</sup>. On obtient 11,2 g (72%) de chlorhydrate de S-benzyl-L-cystéinate de méthyle de F. 150°.  $[\alpha]_D^{25} = -13,9^\circ$  (c = 2,9; eau). Rf = 0,95.

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>NSCl Calculé N 5,35 O 12,22 Cl 13,55%  
(261,77) Trouvé ,, 5,36 ,, 12,11 ,, 13,50%

*N-CBO-L-AsparaginyL-S-benzyl-L-cystéinate de méthyle (XIII)*. a) *Par la méthode au tétraéthylpyrophosphite*. On chauffe 10 min. à 80° un mélange de 2,6 g de S-benzyl-L-cystéinate de méthyle, HCl (XII), 8 cm<sup>3</sup> de diéthylphosphite, 2,4 cm<sup>3</sup> de tri-n-butylamine, et 3,7 cm<sup>3</sup> de tétraéthylpyrophosphite, ajoute 2,6 g de N-CBO-L-asparagine (XI), chauffe encore 1 h. à 80-90°, et ajoute après refroidissement 25 cm<sup>3</sup> de HCl 0,5-n. Le précipité est lavé à l'HCl n. et au NaHCO<sub>3</sub> 0,5-m., séché, dissous dans 20 cm<sup>3</sup> de pyridine bouillante, et additionné immédiatement de 100 cm<sup>3</sup> d'eau bouillante. Par refroidissement et filtration on obtient 1,9 g (40%) de N-CBO-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinate de méthyle de F. 189°.  $[\alpha]_D^{18} = -31,5^\circ$  (c = 2,3; pyridine).

b) *Par la méthode au diéthylchlorophosphite*. On chauffe 5 min. à 60° un mélange de 15,4 g de S-benzyl-L-cystéinate de méthyle, HCl (XII) et de 16,5 cm<sup>3</sup> de triéthylamine dans 235 cm<sup>3</sup> de toluène, agite 2 h. à 20°, introduit 8,8 cm<sup>3</sup> de diéthylchlorophosphite, chauffe 1 h. à 80°, refroidit à 0°, filtre du chlorhydrate de triéthylamine, ajoute à la solution 13,0 g de N-CBO-L-asparagine dans 40 cm<sup>3</sup> de diéthylphosphite, chauffe 2 h. à 100°, laisse refroidir lentement jusqu'à 0°, filtre les cristaux formés, les dissout dans 85 cm<sup>3</sup> de pyridine bouillante, ajoute immédiatement 1350 cm<sup>3</sup> d'eau bouillante, laisse refroidir lentement à 0°, filtre, lave à l'eau et sèche au vide. On obtient ainsi 8,9 g (39%) de N-CBO-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinate de méthyle de F. 196°.  $[\alpha]_D^{19} = -31,9^\circ$  (c = 2,4; pyridine). Rf\* = 0,80.

C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>S Calculé C 58,33 H 5,75 O 20,27 N 8,87 S 6,77%  
(473,53) Trouvé ,, 58,70 ,, 5,75 ,, 19,92 ,, 8,85 ,, 7,11%

*N-CBO-L-AsparaginyL-S-benzyl-L-cystéine (XIIIa)*. On agite 7,8 g de N-CBO-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinate de méthyle (XIII) dans 50 cm<sup>3</sup> de pyridine et 33 cm<sup>3</sup> de NaOH n., filtre d'un léger trouble après 30 min., ajoute 250 cm<sup>3</sup> d'éther, filtre et sèche le précipité, qui est dissous dans 50 cm<sup>3</sup> d'eau et précipité à pH 2 par HCl 3-n. Après filtration, lavage à l'eau et séchage au vide, on obtient 6,1 g (81%) de N-CBO-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéine de F. 200°. Rf\* = 0,60.

C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>S (459,50) Calculé N 9,14% p. équ. 460 Trouvé N 9,07% p. équ. 448

*N-CBO-L-GlutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinate de méthyle (XV)*. On dissout à 20° 8,5 g de N-CBO-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinate de méthyle (XIII) dans 50 cm<sup>3</sup> d'une solution 2,5-n. de gaz bromhydrique dans l'acide acétique glacial, évapore à sec au vide après 1 h., reprend par 15 cm<sup>3</sup> d'eau, extrait le bromure de benzyle à l'éther,

<sup>1)</sup> Organic Syntheses **23**, 13 (1942).

<sup>2)</sup> Le rendement est donc sensiblement plus élevé que par la méthode de *Bergmann & Zervas* (Ber. deutsch. chem. Ges. **65**, 1192 (1932)) qui utilisent l'oxyde de magnésium.

<sup>3)</sup> *J. L. Wood & V. du Vigneaud*, J. biol. Chemistry **130**, 109 (1939).

<sup>4)</sup> La méthode d'estérification au chlorure de thionyle (cf. *M. Brenner & W. Huber*, Helv. **36**, 1114 (1953)) est beaucoup plus pratique que la méthode classique d'*E. Fischer* à l'HCl gazeux.

ajoute du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhydre jusqu'à ce que le pH monte à 6,5 et verse dans un mélange qu'on a fraîchement préparé en dissolvant 7,0 g de N-CBO-L-glutamine dans  $100 \text{ cm}^3$  de tétrahydro-furanne et  $100 \text{ cm}^3$  de dioxanne et en ajoutant à la suite à  $-5^\circ$   $3,5 \text{ cm}^3$  de triéthylamine et  $2,4 \text{ cm}^3$  de chloroformiate d'éthyle. On agite 4 h. à  $20^\circ$  le mélange de réaction dont le pH est maintenu à 5,5, ajoute  $1000 \text{ cm}^3$  d'eau, refroidit à  $0^\circ$ , filtre les cristaux obtenus, lave, sèche au vide poussé, redissout dans  $145 \text{ cm}^3$  de pyridine bouillante et ajoute immédiatement  $1450 \text{ cm}^3$  d'eau bouillante. Par lent refroidissement à  $0^\circ$ , filtration, lavage à l'eau et séchage au vide on obtient 7,8 g (72%) de N-CBO-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinate de méthyle de F. 239°.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -38,6^\circ$  ( $c = 2,4$ ; acide acétique). Rf\* = 0,50.

$\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{O}_8\text{N}_5\text{S}$	Calculé C 55,89	H 5,86	O 21,27	N 11,64	S 5,33%
(601,66)	Trouvé ,, 55,74	,, 5,75	,, 21,06	,, 11,53	,, 5,54%

N-CBO-L-Glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéine (XVa). On dissout à  $20^\circ$  5,9 g de N-CBO-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéine (XIIIa) dans  $30 \text{ cm}^3$  d'une solution 2,5-n. de gaz bromhydrique dans l'acide acétique glacial, évapore à sec après 1 h., reprend par  $20 \text{ cm}^3$  d'eau, extrait le bromure de benzyle à l'éther, amène le pH à 7,5 par du NaOH 2-n. et verse dans un mélange qu'on a fraîchement préparé en dissolvant 4,0 g de N-CBO-L-glutamine (X) dans  $60 \text{ cm}^3$  de tétrahydro-furanne et  $60 \text{ cm}^3$  de dioxanne et en ajoutant à la suite à  $-5^\circ$   $2,0 \text{ cm}^3$  de triéthylamine et  $1,35 \text{ cm}^3$  de chloroformiate d'éthyle. Le pH est maintenu à 7,5 par addition de NaOH 4-n. et, après agitation pendant 3 h. et addition de  $350 \text{ cm}^3$  d'éther, on filtre et sèche au vide le précipité. On dissout celui-ci dans  $70 \text{ cm}^3$  d'eau, ajoute HCl n. jusqu'à pH 2, filtre et sèche les cristaux obtenus qui sont agités 1 h. à  $20^\circ$  dans de l'acétate d'éthyle. On obtient 4,8 g (64%) de N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéine de F. 190°. Rf\* = 0,20.

$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{O}_8\text{N}_5\text{S}$ (587,63)	Calculé N 11,92%	p. équ. 588	Trouvé N 11,65%	p. équ. 574
---	------------------	-------------	-----------------	-------------

Par dissolution du N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinate de méthyle (XV) dans la diméthylformamide à chaud, refroidissement à  $20^\circ$ , addition de NaOH n. sous agitation jusqu'à ce que le pH se maintienne à 10 pendant 15 min., précipitation à l'alcool-éther, dissolution dans l'eau et précipitation par HCl 3-n., on obtient le même produit. F.  $190^\circ$ , trouvé N 11,51%, p. équ. 568.

N-CBO-L-Glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-hydrazide (XVI). On chauffe 3 h. à reflux sous forte agitation 6,0 g de N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinate de méthyle (XV) dans  $90 \text{ cm}^3$  de méthanol et  $15 \text{ cm}^3$  d'hydrate d'hydrazine, ajoute  $70 \text{ cm}^3$  d'eau à la suspension après refroidissement, lave à l'eau jusqu'à élimination de l'excès d'hydrazine et sèche au vide. On obtient 5,4 g (90%) de N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-hydrazide de F. 258°.

$\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{O}_7\text{N}_7\text{S}$	Calculé C 53,89	H 5,86	N 16,30	$-\text{NH}-\text{NH}_2$ 5,17%
(601,67)	Trouvé ,, 53,99	,, 5,96	,, 16,30	,, 5,26%

On obtient le même produit avec le même rendement en travaillant à  $60^\circ$  en solution dans la diméthylformamide additionnée d'hydrate d'hydrazine.

N-CBO-L-Glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-azide (XVII). A une solution de 6,0 g de N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-hydrazide dans  $75 \text{ cm}^3$  d'acide acétique et  $10 \text{ cm}^3$  HCl 3-n. on ajoute à  $-5^\circ$   $10 \text{ cm}^3$  de nitrite de Na m., puis après 10 min.  $350 \text{ cm}^3$  d'eau glacée, filtre le précipité cristallin et lave celui-ci à l'eau et au  $\text{NaHCO}_3$  0,3-m. Après séchage au vide à  $0^\circ$  sur  $\text{P}_2\text{O}_5$  on obtient 5,9 g (96%) de N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-azide de F. 225°.

$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_7\text{N}_8\text{S}$ (612,65)	Calculé N 18,29%	Trouvé N 18,30%
---	------------------	-----------------

N-CBO-L-Glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XVIII). a) Par VII + XVII. On dissout dans  $40 \text{ cm}^3$  de diméthylformamide 6,13 g de N-CBO-L-glutaminyll-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-azide (XVII) fraîchement préparé et 2,94 g de L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (VII). Après 3 jours à  $40^\circ$  sous agitation et lente concentration au vide à la moitié du volume, on refroidit à  $-5^\circ$ , filtre et lave à l'acétate d'éthyle les 4,2 g de cristaux de F. 209° obtenus. Par addition d'acétate

d'éthyle aux eaux-mères et recristallisation dans la diméthylformamide on obtient encore 1,2 g de F. 206°, ce qui donne un total de 5,4 g (64%) de N-CBO-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide. Rf\* = 0,48.

$C_{40}H_{55}O_{10}N_9S$  Calculé C 56,26 H 6,49 O 18,74 N 14,76 S 3,75  $-NH_2$  4,92%  
(853,97) Trouvé „ 56,50 „ 6,43 „ 18,91 „ 14,69 „ 3,79 „ 4,96%

b) *Par VII + XVa + tétraéthylpyrophosphite*. Un mélange de 1,95 g de L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (VII) et de 4,06 g de N-CBO-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéine (XVa) dans 5 cm<sup>3</sup> de diéthylphosphite et 16 cm<sup>3</sup> de tétraéthylpyrophosphite est chauffé 2 h. à 90° et additionné de 100 cm<sup>3</sup> d'éther après refroidissement. Le précipité est trituré dans l'acétate d'éthyle; les cristaux obtenus sont suspendus dans 25 cm<sup>3</sup> de méthanol chaud et filtrés après refroidissement. On obtient ainsi 1,55 g (26%) de N-CBO-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 191°. A partir des eaux-mères, on obtient encore une seconde fraction moins pure.

$C_{40}H_{55}O_{10}N_9S$  (853,97) Calculé N 14,76% Trouvé N 14,51%

*L-GlutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XIX)*. On dissout à 20° 4,27 g de N-CBO-L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide (XVIII) dans 30 cm<sup>3</sup> d'une solution 2,5-n. de gaz bromhydrique dans l'acide acétique glacial, évapore à sec après 1 h., triture avec de l'acétate d'éthyle et de l'acétone jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent, dissout celui-ci dans 300 cm<sup>3</sup> de méthanol et ajoute suffisamment de base libre d'Amberlite IRA-410, préalablement lavée au méthanol, pour qu'il n'y ait plus d'ions Br' dans la solution. Après concentration au vide, reprise par l'acétate d'éthyle et filtration, on obtient 2,95 g (82%) de L-glutaminyL-L-asparaginyL-S-benzyl-L-cystéinyL-L-prolyl-L-leucyl-glycinamide de F. 145° (déc.).  $[\alpha]_D^{19} = -67,3^{\circ}$  (c = 2,3; acide acétique). Rf = 0,48.

$C_{32}H_{49}O_8N_9S$  (719,91) Calculé N 17,51 S 4,45% Trouvé N 17,20 S 4,44%

*L-Tyrosinate de méthyle, HCl (XXI)*. On introduit à -10° dans 35 cm<sup>3</sup> de méthanol 4,0 cm<sup>3</sup> de chlorure de thionyle, puis 9,0 g de L-tyrosine, laisse la solution 2 h. à 20°, chauffe 30 min. à reflux, concentre au vide et ajoute 30 cm<sup>3</sup> d'éther. Par filtration et lavage à l'éther des cristaux formés on obtient 10,8 g (92%) de L-tyrosinate de méthyle, HCl de F. 190°.  $[\alpha]_D^{25} = +74,3^{\circ}$  (c = 3,0; pyridine). Rf = 0,95.

$C_{10}H_{14}O_3NCl$  (231,68) Calculé N 6,05% Trouvé N 6,04%

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyL-L-tyrosinate de méthyle (XXII)*. a) *Par la méthode à l'anhydride mixte alcoylcarbonique*. On additionne à -10° une solution de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine<sup>1)</sup> dans le tétrahydro-furanne ou le chloroforme, successivement de quantités équimoléculaires de triéthylamine (ou de tri-n-butylamine), de chloroformiate d'éthyle (ou d'isobutyle) et de tyrosinate de méthyle<sup>2)</sup> (ou de chlorhydrate de tyrosinate de méthyle et de triéthylamine ou de tributylamine). Par évaporation du solvant, reprise dans l'acétate d'éthyle, lavage par HCl n. et NH<sub>4</sub>OH n., séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentration au vide et addition d'éther de pétrole, on obtient des cristaux qui sont recristallisés dans du méthanol par addition de HCl n. Les rendements en N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-tyrosinate de méthyle de F. 80° à 90° sont de 50 à 70%.

b) *Par la méthode au tétraéthylpyrophosphite*. Une solution de 17,2 g de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine et de 9,7 g de L-tyrosinate de méthyle<sup>2)</sup> (ou 11,6 g de L-tyrosinate de méthyle, HCl et 11,9 cm<sup>3</sup> de tri-n-butylamine) dans 35 cm<sup>3</sup> de diéthylphosphite est additionnée de 13,5 cm<sup>3</sup> de tétraéthylpyrophosphite, chauffée 45 min. à 90° et versée après refroidissement dans 250 cm<sup>3</sup> de HCl 0,4-n. Les cristaux qui se séparent sont dissous dans l'acétate d'éthyle, et, après lavage et recristallisation comme ci-dessus, on obtient 21,4 g (82%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyL-L-tyrosine de F. 88°. Rf\* = 0,95.

c) *Par la méthode au diéthylchlorophosphite dans la pyridine*. A une solution de 13,8 g de N-CBO-S-benzyl-L-cystéine et de 9,3 g de L-tyrosinate de méthyle, HCl dans 60 cm<sup>3</sup>

<sup>1)</sup> C. R. Harrington & T. H. Mead, Biochem. J. 30, 1602 (1936); B. Hegedüs, Helv. 31, 742 (1948).

<sup>2)</sup> E. Fischer, Ber. deutsch. chem. Ges. 41, 855, note 2 (1908).

de pyridine on ajoute à 0° 7,3 cm<sup>3</sup> de diéthylechlorophosphite, chauffe 1 h. à 110°, ajoute après refroidissement 200 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle et 150 cm<sup>3</sup> d'eau. La phase organique est séparée, et, après lavage et recristallisation comme ci-dessus, on obtient 16,9 g (81%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosinate de méthyle de F. 89°. Rf\* = 0,95.

C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub> N <sub>2</sub> S	Calculé C 64,35	H 5,79	O 18,37	N 5,36	S 6,13%
(522,60)	Trouvé ,, 63,48	,, 5,60	,, 18,34	,, 5,47	,, 6,50%

*N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosine (XXIII)*. Une solution de 15,7 g de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosinate de méthyle (XXII) dans 60 cm<sup>3</sup> de méthanol est additionnée de 20 cm<sup>3</sup> de NaOH 4-n. Après 1 h. à 20° on ajoute lentement 85 cm<sup>3</sup> de HCl n. Le précipité est recristallisé d'un mélange éthanol-eau. On obtient 12,5 g (82%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosine de F. 200° (litt.<sup>1</sup>) F. 198–200°.  $[\alpha]_D^{21,5} = +5,45^{\circ}$  (c = 2,0; NaOH 1-n.). Rf\* = 0,73.

C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> N <sub>2</sub> S	Calculé C 63,76	H 5,55	O 18,88	N 5,51	S 6,30%
(508,57)	Trouvé ,, 62,82	,, 5,42	,, 18,64	,, 5,44	,, 6,49%

*L-Isoleucinate de méthyle (XXIV)*. On ajoute à 15 cm<sup>3</sup> de méthanol à –10° 4 cm<sup>3</sup> de chlorure de thionyle puis 6,5 g de L-isoleucine, chauffe 3 h. à 50°, refroidit à –10°, ajoute 2,2 cm<sup>3</sup> de chlorure de thionyle, chauffe encore 1 h. ½ à 50°, laisse reposer 16 h. à 20°, évapore au vide, reprend dans 5 cm<sup>3</sup> d'eau et extrait à 0° par 150 cm<sup>3</sup> d'éther après addition de 4 cm<sup>3</sup> de NH<sub>4</sub>OH conc. La couche étherée est lavée par un peu d'eau et séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'éther est éloigné au vide et le résidu est distillé à 74°/11 mm Hg (bain 100–110°). On obtient 4,8 g (67%) de L-isoleucinate de méthyle, qui se transforme en quelques jours en dicétopipérazine.

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (XXV)*. Dans une solution de 15,2 g de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosine (XXIII) et de 4,2 cm<sup>3</sup> de triéthylamine dans 65 cm<sup>3</sup> de tétrahydro-furanne, on introduit à –10° 2,9 cm<sup>3</sup> de chloroformiate d'éthyle et, après 10 min., 3,6 g de L-isoleucinate de méthyle (XXIV). On agite 3 h. à 20°, chauffe 5 min. à 50°, évapore le tétrahydro-furanne au vide, dissout dans 125 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle, lave par HCl n. et NH<sub>4</sub>OH n., sèche sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, évapore l'acétate d'éthyle jusqu'à 75 cm<sup>3</sup> et précipite par l'éther de pétrole. Après deux recristallisations dans le mélange acétate d'éthyle-éther de pétrole, on obtient 11,5 g (60%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle F. 135°.  $[\alpha]_D^{19,5} = -32,3^{\circ}$  (c = 2,9; méthanol). Rf\* = 0,95.

C <sub>34</sub> H <sub>41</sub> O <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S	Calculé C 64,23	H 6,50	O 17,62	N 6,61	S 5,04%
(635,75)	Trouvé ,, 64,09	,, 6,53	,, 17,69	,, 6,60	,, 5,25%

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucine (XXVa)*. Une solution de 0,32 g de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (XXV) dans 0,9 cm<sup>3</sup> de dioxane et 0,3 cm<sup>3</sup> de NaOH 4-n. est laissée 1 h. ½ à 20° et acidifiée jusqu'au pH 2 par HCl n. Le précipité est recristallisé plusieurs fois dans le mélange éthanol-eau. On obtient 0,22 g (67%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucine de F. 155° (litt.<sup>2</sup>) 161–163°. Rf\* = 0,95.

C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S	Calculé C 63,75	H 6,32	O 18,01	N 6,76	S 5,15%	p. équ. 622
(621,72)	Trouvé ,, 63,47	,, 6,23	,, 17,91	,, 6,69	,, 5,34%	,, 622

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-hydrazide (XXVI)*. A une solution de 6,3 g de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucinate de méthyle (XXV) dans 30 cm<sup>3</sup> de méthanol on ajoute 7,5 cm<sup>3</sup> d'hydrate d'hydrazine, chauffe 2 h. à 60°, ajoute 100 cm<sup>3</sup> d'eau après refroidissement, lave à l'eau le précipité jusqu'à disparition de l'hydrazine et sèche au vide poussé. On obtient 5,8 g (92%) de N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-hydrazide de F. 238°.

C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>6</sub> N <sub>3</sub> S	Calculé C 62,34	H 6,50	O 15,10	N 11,02	S 5,04%
(635,76)	Trouvé ,, 62,08	,, 6,40	,, 15,39	,, 10,82	,, 5,36%

<sup>1</sup>) C. R. Harrington & R. V. Pitt Rivers, Biochem. J. **38**, 417 (1944).

<sup>2</sup>) C. W. Roberts, J. Amer. chem. Soc. **76**, 6203 (1954).

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-azide (XXVII)*. On dissout rapidement à 50° 3,2 g de *N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-hydrazide (XXVI)* dans 110 cm<sup>3</sup> d'acide acétique et 15 cm<sup>3</sup> de HCl n., refroidit à -10° et ajoute immédiatement 5,5 cm<sup>3</sup> de nitrite de Na m. Après 5 min. on ajoute 200 cm<sup>3</sup> d'eau, filtre, lave à l'eau et NaHCO<sub>3</sub> 0,5-m. et sèche au vide poussé à 0° sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et KOH. On obtient 3,0 g (93 %) de *N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-azide* de F. 125° (déc.).

*N-CBO-S-Benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyll-leucyl-glycinamide (XXVIII)*. On dissout dans 20 cm<sup>3</sup> de diméthylformamide 2,2 g de *L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyll-leucyl-glycinamide (XIX)* et 2,5 g de *N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-azide (XXVII)*. Après 3 jours à 20° sous agitation et lente concentration au vide à la moitié du volume, on ajoute 200 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle, filtre, lave le précipité à l'acétate d'éthyle puis au méthanol et sèche au vide. On obtient 2,54 g (62%) de *N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyll-leucyl-glycinamide* de F. 241° (litt.<sup>2)</sup> 224-225°).  $[\alpha]_D^{20} = -51,5^0$  (c = 2,5; acide acétique). Rf\* = 0,90.

C <sub>65</sub> H <sub>86</sub> O <sub>14</sub> N <sub>12</sub> S <sub>2</sub>	Calculé C 58,98	H 6,55	O 16,92	N 12,70	S 4,84%
(1323,56)	Trouvé ,, 58,60	,, 6,44	,, 17,02	,, 12,76	,, 5,07%

Le même composé est obtenu avec un rendement de 35% par condensation, dans le diéthylphosphite en présence de tétraéthylpyrophosphite, de *N-CBO-S-benzyl-L-cystéinyl-L-tyrosyl-L-isoleucine (XXVa)* et de *L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cystéinyl-L-prolyll-leucyl-glycinamide (XIX)*, précipitation à l'éther et purification comme ci-dessus.

Par réduction au sodium dans l'ammoniac liquide et réoxydation par aération de la solution aqueuse selon *du Vigneaud* et coll.<sup>1)</sup> on obtient un produit d'une activité biologique de valeur comparable à celle du produit obtenu par ces auteurs.

#### SUMMARY.

A new synthesis of oxytocin is described. *N-CBO-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-azide* is reacted with *L-prolyll-L-leucyl-glycinamide* to give *N-CBO-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide*. After removal of the CBO group by HBr in acetic acid this hexapeptide is condensed with *N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-azide* to give the nonapeptide *N-CBO-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-isoleucyl-L-glutaminyll-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyll-L-leucyl-glycinamide* already obtained by *du Vigneaud* and coworkers through another route. Reduction with sodium in liquid ammonia and reoxydation gives biologically active material.

Laboratoire de Chimie Organique et Pharmaceutique  
de l'Université (Dir.: Prof. E. Cherbuliez), Genève.

Laboratoires de Chimie Pharmaceutique *Sandoz*  
(Dir.: Prof. A. Stoll), Bâle.

<sup>1)</sup> *V. du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts & P. G. Katsoyannis, J. Amer. chem. Soc. 76, 3115 (1954).*